



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

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΟΛΟΚΛΗΡΩΜΕΝΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΣΙΑΣ
& ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ ΤΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ**

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Μελέτη της φυτοπροστατευτικής δράσης μικροοργανισμών προερχόμενων από εδάφη με υψηλή αλατότητα, σε αβιοτικές και βιοτικές καταπονήσεις



Νικόλαος Ι. Πιπεράκης

Επιβλέπων καθηγητής:

Σωτήρης Τζάμος, Αναπληρωτής Καθηγητής ΓΠΑ

Αθήνα 2024

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

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Μελέτη της φυτοπροστατευτικής δράσης μικροοργανισμών προερχόμενων
από εδάφη με υψηλή αλατότητα, σε αβιοτικές και βιοτικές καταπονήσεις

“Study of the plant protective action of microorganisms originating
from soils with high salinity, under abiotic and biotic stresses”

Νικόλαος Ι. Πιπεράκης

Εξεταστική Επιτροπή:

Σωτήρης Τζάμος, Αναπληρωτής Καθηγητής ΓΠΑ (επιβλέπων)

Αλίκη Τζίμα, Επίκουρη Καθηγήτρια ΓΠΑ

Αναστασία Βενιεράκη, μέλος ΕΔΙΠ

Μελέτη της φυτοπροστατευτικής δράσης μικροοργανισμών προερχόμενων από εδάφη με υψηλή αλατότητα, σε αβιοτικές και βιοτικές καταπονήσεις

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

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η τομάτα αποτελεί μία από τις πιο διαδεδομένες καλλιέργειες παγκοσμίως. Η μείωση στην παραγωγή της στην Ανατολική Μεσόγειο μπορεί να οφείλεται σε αβιοτικούς και βιοτικούς παράγοντες, όπως την αλατότητα και το φυτοπαθογόνο μύκητα *Verticillium dahliae*. Η αλατότητα προκαλεί δυσμενείς επιπτώσεις στη φυσιολογία των φυτών συμπεριλαμβανομένου της βλαστικότητας του σπόρου, της ανάπτυξης της ρίζας, της ποιότητας των καρπών και της μορφολογίας των φύλλων. Ο φυτοπαθογόνος μύκητας *V. dahliae* προσβάλλει το αγγειακό σύστημα των φυτών και μπορεί δύσκολα να αντιμετωπιστεί λόγω του μεγάλου εύρους ξενιστών του και της ικανότητάς του να παραμένει στο έδαφος για πολλά χρόνια, υπό τη μορφή μικροσκληρωτίων. Οι τρόποι αντιμετώπισης των δύο αυτών παραγόντων είναι σχετικά περιορισμένοι και γι' αυτό τα τελευταία χρόνια γίνονται σημαντικές προσπάθειες εύρεσης νέων εναλλακτικών, όπως τη χρήση ριζοβακτηρίων (PGPR).

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε η μελέτη της φυτοπροστατευτικής δράσης 13 βακτηριακών στελεχών, που είχαν απομονωθεί από τη ριζόσφαιρα αλοφύτων της περιοχής της Ραφήνας, με σκοπό την εύρεση περιβαλλοντικά φιλικών μεθόδων αντιμετώπισης των δύο καταπονήσεων. Αρχικά, *in vitro* πειράματα έδειξαν τη δυνατότητα ορισμένων μικροοργανισμών να περιορίζουν την ανάπτυξη του μύκητα *V. dahliae* καθώς επίσης και την ικανότητά τους να προκαλούν διαλυτοποίηση φωσφόρου, παραγωγή ινδολοξικού οξέος και λύση χιτίνης. Ακολούθως, πειράματα παθογένειας σε φυτά τομάτας έδειξαν ότι το σύνολο των μικροοργανισμών είχε την ικανότητα να μειώνει το ποσοστό ασθενών φύλλων σε σχέση με τα φυτά της εφαρμογής του μάρτυρα. Επίσης, η εφαρμογή ορισμένων μικροοργανισμών, έδειξε να παρέχει προστασία στα φυτά τομάτας έναντι της αλατότητας. Η φυτοπροστατευτική δράση των μικροοργανισμών εναντίον του *V. dahliae* μελετήθηκε περαιτέρω και διαπιστώθηκε ότι το βακτηριακό στέλεχος Raf 14 μπορεί να προκαλέσει την ενεργοποίηση του μηχανισμού άμυνας που εξαρτάται από το σαλικυλικό οξύ και την καταστολή του μηχανισμού άμυνας που εξαρτάται από το ιασημονικό οξύ και το αιθυλένιο. Οι δύο αυτές βιοχημικές αλλαγές αποτελούν στρατηγικές των φυτών που ενισχύουν την άμυνά τους. Πραγματοποιώντας περεταίρω έρευνα, η χρήση των ωφέλιμων βακτηρίων αυτών θα μπορούσε να συμβάλει σε μία σύγχρονη και φιλική προς το περιβάλλον φυτοπροστασία.

Επιστημονική περιοχή: φυτοπαθολογία

Λέξεις κλειδιά: αλατότητα, *Verticillium dahliae*, plant growth-promoting bacteria (PGPB), βιολογική αντιμετώπιση, άμυνα των φυτών

Study of the plant protective action of microorganisms originating from soils with high salinity, in abiotic and biotic stresses

MSc: Integrated Plant Protection & Environmental Management Systems
Department of Plant Production Science
Phytopathology Laboratory

ABSTRACT

Tomato is one of the most widespread crops worldwide. The decline in its production in the Eastern Mediterranean can be caused due to abiotic and biotic factors, such as salinity and the phytopathogenic fungus *Verticillium dahliae*. Salinity causes adverse effects on plant physiology including seed germination, root growth, fruit quality and leaf morphology. The phytopathogenic fungus *V. dahliae* attacks the vascular system of plants and can be difficult to control due to its wide host range and its ability to persist in the soil for many years in the form of microsclerotia. The ways of dealing with these two factors are relatively limited and that is why in recent years significant efforts have been made to find new alternatives, such as the use of rhizobacteria (PGPR).

In the present work, the study of the plant protective action of 13 bacterial strains, isolated from the halophyte rhizosphere of the Rafina area, was carried out, with the aim of finding environmentally friendly methods of dealing with these stresses. Initially, in vitro experiments showed that certain microorganisms could limit the growth of *V. dahliae* and also had the ability to cause solubilization of phosphorus, production of indoleacetic acid and lysis of chitin. Subsequently, pathogenicity experiments on tomato plants showed that all microorganisms had the ability to reduce the percentage of diseased leaves compared to the control plants. Additionally, the application of certain microorganisms, appeared to provide protection to tomato plants against salinity. The plant protective activity of the microorganisms against *V. dahliae* was further studied and it was found that the bacterial strain Raf 14 can induce the activation of the salicylic acid-dependent defense mechanism and the suppression of the jasmonic acid and ethylene-dependent defense mechanism. These two biochemical changes are strategies of plants that enhance their defense. By carrying out further research, the use of these beneficial bacteria could contribute to a modern and environmentally friendly plant protection.

Scientific area: phytopathology

Key words: salinity, *Verticillium dahliae*, plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR), biological control

Ευχαριστίες

Η παρούσα μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Φυτοπαθολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών υπό την επίβλεψη του Αναπληρωτή Καθηγητή Φυτοπαθολογίας Δρ. Τζάμου Σωτήρη. Θα ήθελα να τον ευχαριστήσω θερμά για την ανάθεση του θέματος, την εμπιστοσύνη, το ενδιαφέρον που έδειξε και τις πολύτιμες συμβουλές που μου παρείχε κατά τη διάρκεια αυτής της μελέτης.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους υποψήφιους διδάκτορες Ειρήνη Πουλάκη και Βασίλη Δημητρακά που με καθοδήγησαν καθ' όλη τη διάρκεια της μεταπτυχιακής μου μελέτης. Τους ευχαριστώ για την εξαιρετική συνεργασία μας, τον πολύτιμο χρόνο που αφιέρωσαν, τη βοήθεια και τη στήριξη που μου παρείχαν σε όλα τα στάδια της εργασίας.

Θα ήθελα ακόμη να ευχαριστήσω την Επίκουρη Καθηγήτρια του εργαστηρίου Φυτοπαθολογίας κα Τζίμα Αλίκη καθώς και την κα Βενιεράκη Αναστασία, μέλος ΕΔΙΠ, που δέχτηκαν να εξετάσουν και να βαθμολογήσουν την μεταπτυχιακή μου διατριβή ως μέλη της τριμελούς επιτροπής.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου και τους συμφοιτητές μου για τη συμπαράσταση και την ενθάρρυνση που μου παρείχαν καθ' όλη τη διάρκεια των μεταπτυχιακών μου σπουδών.

Περιεχόμενα

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.1 Η ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΤΗΣ ΤΟΜΑΤΑΣ (<i>Solanum lycopersicum/ Lycopersicum esculentum</i>).....	1
1.1.1 Γενικά.....	1
1.1.2 Ταξινόμηση.....	1
1.1.3 Καταγωγή - Ιστορική εξέλιξη.....	1
1.1.4 Οικονομική σημασία.....	2
1.1.5 Βοτανικά χαρακτηριστικά.....	3
1.1.6 Κλίμα και έδαφος.....	5
1.1.7 Διαιτητική αξία.....	6
1.1.8 Ασθένειες της τομάτας.....	6
1.2 ΑΒΙΟΤΙΚΕΣ ΚΑΤΑΠΟΝΙΣΕΙΣ ΤΗΣ ΤΟΜΑΤΑΣ.....	7
1.2.1 Το πρόβλημα της αλατότητας.....	7
1.2.2 Επιδράσεις της αλατότητας στα φυτά τομάτας.....	9
1.2.3 Τρόποι μετριασμού του προβλήματος της αλατότητας.....	17
1.3 ΒΙΟΤΙΚΕΣ ΚΑΤΑΠΟΝΙΣΕΙΣ ΤΗΣ ΤΟΜΑΤΑΣ.....	23
1.3.1 Το γένος <i>Verticillium</i>	23
1.3.2 Ο μύκητας <i>Verticillium dahliae</i>	23
1.3.3 Μορφολογικά χαρακτηριστικά του μύκητα <i>V. dahliae</i>	24
1.3.4 Συμπτώματα της ασθένειας.....	25
1.3.5 Ο βιολογικός κύκλος του μύκητα <i>V. dahliae</i>	26
1.3.6 Παράγοντες που επηρεάζουν την εξάπλωση.....	29
1.3.7 Αντιμετώπιση της ασθένειας.....	30
1.3.8 Βιολογική αντιμετώπιση.....	32
1.4 ΤΟ ΑΜΥΝΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ.....	34
1.4.1 Γενικά.....	34
1.4.2 Παθητικοί προϋπάρχοντες μηχανισμοί άμυνας.....	35
1.4.3 Διεγειρόμενοι ενεργητικοί μηχανισμοί άμυνας.....	36
1.4.4 Η αντίδραση υπερευαισθησίας.....	37
1.4.5 Επαγόμενη και επίκτητη διασυστηματική αντοχή.....	38
1.4.6 Βιοχημικοί παράγοντες της ανοσοποίησης.....	38
1.4.7 Πρωτεΐνες που σχετίζονται με την παθογένεση.....	40
1.4.8 Ριζοσφαιρικά βακτήρια - ISR.....	41
1.5 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ.....	42

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	43
2.1 Καλλιέργεια και ανάπτυξη των βακτηρίων Raf.....	45
2.2 <i>In vitro</i> ανταγωνισμός 10 απομονωμένων μικροοργανισμών έναντι του μύκητα <i>Verticillium dahliae</i>	47
2.3 Πειράματα εκτίμησης ιδιοτήτων των απομονωμένων μικροοργανισμών.....	47
2.4 Ριζιπότισμα των βακτηρίων στα φυτά.....	48
2.5 Καταπόνηση φυτών με NaCl.....	49
2.6 Καλλιέργεια και ανάπτυξη του φυτοπαθογόνου μύκητα <i>V. dahliae</i>	50
2.7 Υπολογισμός του όγκου του μολύσματος.....	50
2.8 Μόλυνση των φυτών με <i>V. dahliae</i>	52
2.9 Καταμέτρηση συμπτωμάτων ασθένειας.....	52
2.10 Υπολογισμός του σχετικού εμβαδού της ασθένειας (relative AUDPC).....	53
2.11 Προσδιορισμός των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων <i>PR-1</i> και <i>Pin2</i>	53
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	60
3.1 <i>In vitro</i> πειράματα ανταγωνισμού.....	60
3.2 <i>In vitro</i> βιοδοκιμές ιδιοτήτων των απομονωμένων βιολογικών παραγόντων.....	61
3.3 Εκτίμηση ικανότητας διαλυτοποίησης φωσφόρου.....	62
3.4 Εκτίμηση ικανότητας παραγωγής ινδολοξικού οξέος (IAA).....	63
3.5 Εκτίμηση ικανότητας χιτινόλυσης.....	64
3.6 <i>In planta</i> πειράματα.....	65
3.6.1 1ο Πείραμα <i>in planta</i> : Μελέτη της επίδρασης των 10 απομονωμένων μικροοργανισμών έναντι του μύκητα <i>V. dahliae</i>	65
3.6.2 2ο Πείραμα <i>in planta</i> : Μελέτη της επίδρασης των 10 απομονωμένων μικροοργανισμών στο ύψος και το βάρος των φυτών.....	67
3.6.3 3ο Πείραμα <i>in planta</i> : Μελέτη της επίδρασης της αλατότητας στα 10 στελέχη απομονωμένων μικροοργανισμών	68
3.6.4 4ο Πείραμα: Μελέτη του ποσοστού της έκφρασης των γονιδίων <i>PR1</i> και <i>PIN2</i> , ως αντίδραση στο φυτοπαθογόνο μύκητα <i>V. dahliae</i>	69
4. Συμπέρασμα-Συζήτηση.....	71
5. Βιβλιογραφία.....	76

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Η ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΤΗΣ ΤΟΜΑΤΑΣ (*Solanum lycopersicum/ Lycopersicum esculentum*)

1.1.1 Γενικά

Η τομάτα, αποτελεί μία από τις σημαντικότερες και πιο διαδεδομένες λαχανοκομικές καλλιέργειες παγκοσμίως. Ανήκει στην οικογένεια Solanaceae μαζί με άλλες οικονομικά σημαντικές καλλιέργειες όπως την πιπεριά, τη μελιτζάνα, την πατάτα και τον καπνό. Σε διεθνή έκταση, η καλλιέργεια της τομάτας καταλαμβάνει την τρίτη σε έκταση θέση μετά την πατάτα και τη γλυκοπατάτα (Ολύμπιος, 2001). Καλλιεργείται για τον καρπό της, ο οποίος καταναλώνεται ώριμος, νωπός, αποξηραμένος, σε άλμη, ακέραιος ή σε πολτό. Η υψηλή περιεκτικότητά του σε βιταμίνες, ιδίως η βιταμίνη C, το ελκυστικό χρώμα του και το ιδιαίτερο άρωμά του, καθιστούν τον καρπό της τομάτας ως δημοφιλές συστατικό της καθημερινής διατροφής. Η καλλιέργεια της τομάτας εκτείνεται κατά κύριο λόγο στις τροπικές χώρες, στο ύπαιθρο κατά τη διάρκεια της θερινής περιόδου είτε σε θερμοκήπια σε περιόδους “εκτός εποχής” (Ολύμπιος, 2001).

1.1.2 Ταξινόμηση

Η τομάτα ανήκει στην οικογένεια Solanaceae, στο γένος *Lycopersicon*, στην υποοικογένεια Solanoideae και στη φυλή Solaneae. Η ταξινόμηση της τομάτας εξακολουθεί να συζητείται. Το 1753 ο Σουηδός βοτανολόγος Linnaeus την ονόμασε *Solanum Lycopersicon*, αλλά 15 χρόνια αργότερα ο Philip Miller την μετονόμασε σε *Lycopersicon esculentum*. Ο Karsten το 1900 πρότεινε το *Lycopersicon lycopersicum* ως λατινικό όνομα της καλλιεργούμενης τομάτας, το οποίο χρησιμοποιείται και στην πιο πρόσφατη βιβλιογραφία (Taylor, 1986).

1.1.3 Καταγωγή - Ιστορική εξέλιξη

Η καλλιέργεια της τομάτας εισήχθη στην Ευρώπη από τους Ισπανούς, το 16ο αιώνα, διατηρώντας το όνομα “tomatl”, όπως την ονόμαζαν οι Αζτέκοι (Anderlini, 1983). Ο πιο πιθανός πρόγονος της τομάτας είναι το άγριο *L. esculentum var. cerasiforme* (ντοματίνι), το οποίο είναι ιθαγενής σε όλη την τροπική και υποτροπική

Αμερική (Siemonsma & Piluek, 1993). Αν και αρχικά επικρατούσε η άποψη ότι η χώρα καταγωγής της τομάτας είναι το Περού, σήμερα είναι γνωστό ότι κατάγεται από το Μεξικό και μάλιστα από την περιοχή Vera Cruz-Puebla (Sims, 1980· Harvey et al., 2002). Το φυτό της τομάτας διαδόθηκε αρχικά ως καλλωπιστικό φυτό καθώς οι καρποί της θεωρούνταν επικίνδυνοι για την υγεία του ανθρώπου, λόγω του στενά συγγενούς θανατηφόρου νυχτολούλουδου (*Solanum dulcamara*). Η τομάτα καλλιεργείται και καταναλώνονται στη νότια Ευρώπη από τα μέσα του 16ου αιώνα, αν και έγινε ευρέως διαδεδομένη στη βορειοδυτική Ευρώπη μόλις στα τέλη του 18ου αιώνα (Harvey et al., 2002). Τον 17ο αιώνα, οι Ευρωπαίοι μετέφεραν την τομάτα στην Κίνα, τη Νότια και Νοτιοανατολική Ασία και τον 18ο αιώνα στην Ιαπωνία και τις ΗΠΑ (Siemonsma & Piluek, 1993). Μέχρι το 1900, η καλλιέργεια της τομάτας παρέμεινε κηπευτική, σε περιορισμένη έκταση στην Ευρώπη. Μόνο λίγο πριν το 1780 άρχισε δειλά-δειλά να χρησιμοποιείται στη διατροφή του ανθρώπου ως λαχανικό (Αγγίδης, 2006). Στη χώρα μας η τομάτα άρχισε να καλλιεργείται στο τέλος του 19ου αιώνα, μόνο όμως μετά τη λήξη του Β' Παγκοσμίου πολέμου και την ανάπτυξη της κονσερβοποίησης άρχισε η μεγάλη επέκταση της καλλιέργειας (Anderlini, 1983).

1.1.4 Οικονομική σημασία

Η τομάτα κατέχει την δωδέκατη θέση, ως προς την παραγωγή και την δεύτερη θέση, μετά την μπανάνα, ως προς τη διακίνηση, στο εμπόριο οπωροκηπευτικών σε παγκόσμιο επίπεδο (Diez & Nuez, 2008). Η παγκόσμια παραγωγή τομάτας (νωπής και επεξεργασμένης) έχει αυξηθεί κατά περίπου 300% τις τελευταίες τέσσερις δεκαετίες. Η ετήσια παγκόσμια παραγωγή τομάτας το 2007 έχει υπολογιστεί σε 129 εκατομμύρια τόνους (Heuvelink, 2005) και το 2019 σε 180 εκατομμύρια τόνους (FAOSTAT, 2020). Το παγκόσμιο εμπόριο τομάτας και προϊόντων τομάτας φτάνει τα 4,2 δισεκατομμύρια δολάρια στις ΗΠΑ, που αντιπροσωπεύει αύξηση 33% σε σχέση με τις αρχές της δεκαετίας του 1990 (FAS/USDA, 2003). Οι τρεις κορυφαίοι παραγωγοί είναι η Κίνα, οι ΗΠΑ και η Τουρκία. Οι χώρες που ακολουθούν είναι η Ινδία και η Ιταλία. Η Κίνα αντιπροσωπεύει περίπου 25% της συνολικής παγκόσμιας παραγωγής και καλλιεργούμενης έκτασης και αποτελεί τον μεγαλύτερο καταναλωτή (Wijnands, 2003). Οι ΗΠΑ, η Ιταλία, η Ισπανία και η Τουρκία κυριαρχούν στην παγκόσμια βιομηχανία επεξεργασίας του καρπού. Η Ολλανδία είναι ο παγκόσμιος ηγέτης στην

εντατικοποίηση της παραγωγής νωπής τομάτας στα θερμοκήπια, με ετήσιες αποδόσεις άνω των 55kg/m².

Στη χώρα μας, η τομάτα καταλαμβάνει τη δεύτερη σε έκταση θέση, μετά την πατάτα. Ένα μεγάλο μέρος της έκτασης 53,8% καλλιεργείται με τομάτες που προορίζονται για μεταποίηση, το 39,8% είναι υπαίθρια καλλιέργεια για νωπή κατανάλωση και το 6,4% της έκτασης είναι η καλλιέργεια στα θερμοκήπια και χαμηλά σκέπαστρα. Ός αναφορά το ποσοστό των θερμοκηπίων της χώρας μας που καλλιεργούνται με τομάτα, πρώτη έρχεται η Κρήτη με ποσοστό 35,4%, δεύτερη η Δ. και Κ. Μακεδονία με ποσοστό 22,3% και τρίτη η Πελοπόννησος και Δ. Στερεά με ποσοστό 18,4%. Σχεδόν ολόκληρη η ποσότητα τομάτας που παράγεται στα θερμοκήπια καταναλώνεται στον τόπο, και μόνο πολύ μικρή ποσότητα 1,2% εξάγεται (Ολύμπιος, 2001).

1.1.5 Βοτανικά χαρακτηριστικά

Το φυτό της τομάτας είναι ποώδες με βιολογικό κύκλο 5-7 μήνες στην Ευρώπη (μονοετής καλλιέργεια), ενώ σε τροπικές περιοχές η καλλιέργεια είναι πολυετής (Αγγίδης, 2006). Το ριζικό της σύστημα είναι πασσαλώδες και μπορεί να φθάσει το βάθος των 60 cm, επιμηκυνόμενο κατά 2-3 cm ημερησίως. Κατά τη μεταφύτευση της τομάτας, η κεντρική ρίζα καταστρέφεται και παράγονται δευτερεύουσες πλευρικές ρίζες, ακόμη και από το λαιμό του φυτού, γεγονός που θεωρείται πλεονέκτημα για την εγκατάσταση του μεταφυτευθέντος φυτού (Ολύμπιος, 2001).

Ο κεντρικός βλαστός φέρει τα φύλλα, στις μασχάλες των οποίων υπάρχουν οφθαλμοί που δίνουν πλευρικούς βλαστούς. Είναι κυλινδρικός και εσωτερικά πλήρης. Στο πρώτο στάδιο της ανάπτυξης του είναι μαλακός, τρυφερός, χυμώδης και εύθραυστος, αργότερα όμως γίνεται σταδιακά πιο σκληρός, αποκτά μηχανική αντοχή χωρίς να ξυλοποιείται. Η ανάπτυξη του βλαστού, όσον αφορά το μήκος, καθορίζεται από γενετικούς παράγοντες και έτσι διακρίνονται ποικιλίες με απεριόριστη ανάπτυξη βλαστών ή με καθορισμένο μήκος (Ολύμπιος, 2001).

Τα πραγματικά φύλλα της τομάτας είναι σύνθετα, δηλαδή αποτελούνται από 7, 9 ή και κάποτε από 11 απλά φυλλάρια. Ο αριθμός των ζευγών φυλλαρίων σε κάθε φύλλο, αλλά και το μέγεθός τους ποικίλει ανάλογα με την ποικιλία και τη θέση του φύλλου επί του βλαστού. Τα φύλλα εμφανίζονται σε ελικοειδή διάταξη πάνω στο

βλαστό. Η επάνω επιφάνειά τους έχει χρώμα λαμπερό βαθύ πράσινο και η κάτω ελαιώδης ανοιχτό πράσινο (Ολύμπιος, 2001). Όπως όλα τα πράσινα μέρη του φυτού, τα φύλλα είναι εφοδιασμένα με αδενώδεις τρίχες που στην επαφή εκκρίνουν μία ουσία με δριμεία οσμή (Anderlini, 1983).

Η ανθοφορία της τομάτας μπορεί να είναι ταξιανθία, απλή, διχαλωτή ή διακλαδισμένη, ανάλογα με την ποικιλία. Τα άνθη εμφανίζονται σε ταξιανθίες οι οποίες φέρουν από 2, 3 άνθη ανά ταξιανθία μέχρι 20 ή και περισσότερα. Ένας μέσος επιθυμητός αριθμός ανθών ανά ταξιανθία που θα εξελιχθεί σε καρπούς είναι 6-8 άνθη. Οι ταξιανθίες εκφύονται επί των βλαστών και διακλαδίζονται ασύμμετρα ή συμμετρικά, ανάλογα με την ποικιλία. Το άνθος φέρει πράσινο δερματώδη κάλυκα, που αποτελείται από 5 ή περισσότερα σέπαλα, κίτρινη στεφάνη με 5 ή περισσότερα ενωμένα πέταλα και 5 ή περισσότερους στήμονες, ενωμένους στη βάση τους με τη στεφάνη και ενωμένους κατά μήκος μεταξύ τους, ώστε να σχηματίζουν κώνο γύρω από το στύλο, που είναι συνήθως πιο κοντός, εγκλωβισμένος από τους ανθήρες. Ο ύπερος αποτελείται από πολύχρωμη ωοθήκη με πολλά ωάρια και από βραχύ ή μακρύ στύλο (Ολύμπιος, 2001). Τα άνθη της τομάτας είναι ερμαφρόδιτα (τέλεια) και αυτογονιμοποιούνται. Η άνθηση δεν είναι σύγχρονη, γίνεται σταδιακά, εκτός ορισμένων ποικιλιών μηχανικής συγκομιδής. Η βλάστηση της γύρης είναι βραδεία γι' αυτό η γονιμοποίηση γίνεται περίπου δύο ημέρες μετά την επικονίαση. Η γονιμοποίηση επηρεάζεται σημαντικά από τις καιρικές συνθήκες (θερμοκρασία, βροχή, άνεμος). Μετά τη γονιμοποίηση η ανάπτυξη και ωρίμαση του καρπού γίνεται σε 45-60 ημέρες, ανάλογα με τις κλιματολογικές και τις καλλιεργητικές συνθήκες (Αγγίδης, 1996).

Ο καρπός της τομάτας είναι ράγα χρώματος κόκκινου, ρόδινου ή κίτρινου και έχει 4-8 χώρους. Αποτελείται από τον φλοιό, τη σάρκα, τους ιστούς και τους σπόρους. Το βάρος του κυμαίνεται από 50 έως 200 γραμμάρια. Το πάχος του φλοιού αυξάνει στο πρώτο στάδιο της ανάπτυξής του καρπού και μετά λεπταίνει και απλώνει κατά το στάδιο της ωρίμανσης. Η σάρκα σχηματίζεται στους χώρους των κελιών και είναι πλούσια σε χυμό ανάλογα με την ποικιλία. Ο χυμός έχει 3-6% στερεά συστατικά. Οι σπόροι βρίσκονται μέσα στους χώρους, σε μια ζελατινώδη ουσία και είναι πολλοί ή λίγοι σε αριθμό, ανάλογα με την ποικιλία. Ο πλακούντας είναι η περιοχή της ωοθήκης από την οποία εκφύονται οι σπερματικές βλάστες οι οποίες μετά τη γονιμοποίηση

εξελίσσονται στα σπέρματα. Ο χρωματισμός των καρπών της τομάτας οφείλεται στις δύο χρωστικές, την καροτίνη (κίτρινο) και την λικοπίνη (κόκκινο) και επηρεάζεται από τη σχέση των χρωστικών αυτών και τη θερμοκρασία του περιβάλλοντος. Η καλύτερη θερμοκρασία για την ανάπτυξη του κόκκινου χρώματος είναι 18°C - 25°C (Αγγίδης, 1996).

Ο σπόρος της τομάτας είναι ωοειδής, πεπλατυσμένος, με διάμετρο 3-5 mm, το χρώμα του είναι καφέ - κίτρινο και η επιφάνειά του καλύπτεται με τριχοειδείς αποφύσεις. Υπό κανονικές συνθήκες αποθήκευσης διατηρεί τη βλαστικότητα του για τουλάχιστον 4 χρόνια μετά τη συγκομιδή, εάν όμως αποθηκευτεί σε χαμηλή θερμοκρασία και με χαμηλή περιεκτικότητα σε υγρασία, εύκολα διατηρεί τη βλαστικότητά του πάνω από 10 χρόνια (Ολύμπιος, 2001).

1.1.6 Κλίμα και έδαφος

Η διάρκεια του βιολογικού κύκλου της τομάτας, εξαρτάται από τις κλιματολογικές συνθήκες και κατά δεύτερο λόγο από την ποικιλία. Στις τροπικές χώρες είναι πολυετής και στην Ευρώπη μονοετής καλλιέργεια με διάρκεια 5-7 μήνες. Ως φυτό τροπικής καταγωγής, έχει ανάγκη από θερμοκρασίες αισθητά υψηλές, για να εξασφαλίσει τον ολικό κύκλο βλάστησης και να φτάσει σε πλήρη ωρίμανση τους καρπούς της. Ο καλοκαιρινός κύκλος πρέπει να είναι σχετικά μακρός, με θερμοκρασία ημέρας 23-24 °C και μέσης νυχτερινής 14°C. Σε θερμοκρασίες από 24°C έως 31°C, τα φυτά αναπτύσσονται γρήγορα, στους 33°C επιβραδύνουν το ρυθμό αύξησης και στους 35°C η ανάπτυξη σταματάει. Η καλλιέργεια είναι ευαίσθητη σε παγωνιές και στους 2°C μπορεί να καταστραφεί. Επίσης, οι θερμοί και οι ψυχροί άνεμοι μπορούν να προκαλέσουν ανθόρροια (Anderlini, 1983).

Τα εδάφη που προσφέρονται καλύτερα για την καλλιέργεια της ντομάτας είναι τα ουδέτερα ή ελαφρά όξινα (pH από 7 έως 5,8), μολονότι το φυτό αυτό προσαρμόζεται αρκετά καλά και στα πιο όξινα. Στα εδάφη μέσης σύστασης τα φυτά βρίσκουν ευνοϊκές συνθήκες και παρουσιάζουν πολύ σταθερές παραγωγικές ικανότητες στις διάφορες χρονικές στιγμές. Τα ελαφρά εδάφη αντίθετα, είναι πιο άγονα και λιγότερο φιλόξενα, ειδικά για της καλλιέργειες βιομηχανικού τύπου. Τέλος, στα συμπαγή εδάφη τα φυτά μπορεί να υποφέρουν από περίσσια υγρασία ή από έντονη ξηρασία.

Σε αυτά τα εδάφη η αποστράγγιση των περίσσιων νερών είναι ουσιαστικής σημασίας (Anderlini, 1983).

1.1.7 Διαιτητική αξία

Η τομάτα, όπως τα περισσότερα λαχανικά, αποτελείται σχεδόν αποκλειστικά από νερό, 94 - 95% κατά βάρος. Το υπόλοιπο 5% του βάρους της συνιστούν τα σάκχαρα, τα οξέα, οι διαιτητικές ίνες, οι πρωτεΐνες και τα διάφορα ιχνοστοιχεία και βιταμίνες. Ειδικότερα, αποτελεί σημαντική πηγή βιταμίνης C, καλίου, φυλλικού οξέος και καροτενοειδών, όπως το λυκοπένιο. Περιέχει επίσης άλλες αντιοξειδωτικές ενώσεις, όπως νεοξανθίνη, λουτεΐνη, α-κρυπτοξανθίνη, α-καροτίνη, β-καροτίνη, κυκλολυκοπένιο και β-καροτένιο. Αυτά τα συστατικά παρέχουν συνεργική δράση έναντι διαφόρων απειλών της ανθρώπινης υγείας. Σύμφωνα με έρευνες, η κατανάλωση ντομάτας και των προϊόντων της έχει συσχετιστεί με μειωμένο κίνδυνο για διάφορες ασθένειες όπως η παχυσαρκία, υπεργλυκαιμίες και υπερχοληστερολαιμίες, καρδιαγγειακές διαταραχές και οι καρκινογενέσεις (Perveen et al, 2015). Επίσης, η αντιοξειδωτική της δράση, αποτρέπει τον κίνδυνο και οφθαλμικών παθήσεων, μειώνει τους κίνδυνο παραγωγής πέτρας στα νεφρά και συμβάλει στην υγεία του ανθρώπινου δέρματος (Cogswell et al., 2012).

1.1.8 Ασθένειες της τομάτας

Οι εχθροί και οι ασθένειες της τομάτας είναι πολυάριθμες και προσβάλουν όλα τα μέρη του φυτού: ριζικό σύστημα, λαιμό, φύλλα και καρπούς. Οι παθογόνες αιτίες μπορεί να είναι μύκητες, βακτήρια, νηματώδεις, ακάρεα ή ιώσεις. Κάθε προσβολή εκδηλώνεται στο φύλλωμα του φυτού με διάφορα συμπτώματα λιγότερο ή περισσότερο έντονα, ανάλογα με το σημείο και το μέγεθος της προσβολής. Βέβαια, συχνά τα συμπτώματα αυτά μπορεί να οφείλονται και σε άλλους παράγοντες όπως εδαφοκλιματικές ανωμαλίες ή εσφαλμένους καλλιεργητικούς χειρισμούς. Τα παθολογικά συμπτώματα από μυκητολογικές ή άλλες προσβολές εμφανίζονται σε ολόκληρο το φυτό ή ένα μέρος του. Η εξέλιξή τους μπορεί να είναι ταχύτατοι και να προκληθεί καταστροφή του φυτού σε σύντομο χρονικό διάστημα ή να είναι αργή και το φυτό απλώς να υποφέρει για πολύ χρόνο μέχρι να καταστραφεί (Κωμνάκου, 2000). Οι βασικότεροι μύκητες και ωομύκητες που προσβάλουν το φυτό της τομάτας είναι:

Phytophthora nicotianae, *Phytophthora infestans*, *Fusarium Oxysporum*, *Rhizoctonia Solani*, *Sclerotinia Sclerotiorum*, *Didymella Lycoperici*, *Verticillium dahliae*, *Botrytis cinerea*, *Alternaria daucis*, *Oidiospis tautica*, *Stemphylium* και *Pythium*. Τα κυριότερα βακτήρια είναι: *Pseudomonas Syringae*, *Xanthomonas Caupestris*, *Clavibacter michiganensis*, *Pseudomonas Corrugata*, *Erwinia* και *Corynebacterium michiganense*. Ως αναφορά τους ιούς που προσβάλλουν την τομάτα, οι βασικότεροι είναι: το μωσαϊκό του καπνού (TMV), ο ιός Y της πατάτας (PYX), το μωσαϊκό του αγγουριού (CMV), ο ιός X της πατάτας (PVX), ο ιός των κίτρινων φύλλων με καρούλιασμα (TYLCN) και ο ιός του τριφυλλίου (AMY) (Αγγίδης, 2006).

Επίσης, η καλλιέργεια της τομάτας έρχεται αντιμέτωπη με αβιοτικές καταπονήσεις. Ως καταπόνηση (stress) μπορεί να οριστεί μία οποιαδήποτε περιβαλλοντική συνθήκη που δεν επιτρέπει στο φυτό να πετύχει την πλήρη γενετική του δυνατότητα. Οι περιβαλλοντικές συνθήκες αυτές μπορεί να είναι η έλλειψη νερού, η αυξημένη αλατότητα, το πλημμύρισμα του εδάφους, οι υψηλές θερμοκρασίες, το ψύχος, ο παγετός, η τοξικότητα ιχνοστοιχείων και η υψηλή ένταση φωτισμού. Οι περιβαλλοντικές καταπονήσεις μπορούν να παρεμποδίσουν το μεταβολισμό του φυτού μέσω μιας πληθώρας μηχανισμών, οι περισσότεροι των οποίων συντελούν στη συσσώρευση ενεργών μορφών οξυγόνου (ROS) (Taiz et al., 2022).

1.2 ΑΒΙΟΤΙΚΕΣ ΚΑΤΑΠΟΝΙΣΕΙΣ ΤΗΣ ΤΟΜΑΤΑΣ

1.2.1 Το πρόβλημα της αλατότητας

Εδαφική αλάτωση ονομάζεται η συσσώρευση υδατοδιαλυτών αλάτων στην επιφάνεια του εδάφους. Τέτοια άλατα είναι το κάλιο (K^+), νάτριο (Na^+) το μαγνήσιο (Mg^{2+}), το ασβέστιο (Ca^{2+}), το χλώριο (Cl^-), τα θειικά (SO_4^{2-}), το ανθρακικά (CO_3^{2-}), τα διττανθρακικά (HCO_3^-). Τα άλατα διαλύονται και μετακινούνται με το νερό, όμως όταν το νερό εξατμίζεται, τα άλατα μπορεί να παραμένουν στη ριζόσφαιρα επηρεάζοντας την απορρόφηση των θρεπτικών ουσιών και προκαλώντας προβλήματα στην ανάπτυξη και υγεία των φυτών. Η αλατότητα αποτελεί μία σημαντική απειλή για τη

γεωργία, τη στιγμή που η ανάγκη για παραγωγή τροφίμων μεγαλώνει λόγω του συνεχώς αυξανόμενου πληθυσμού (Cuartero & Fernandez-Munoz, 1999).

Οι φυσικές διεργασίες σχηματισμού του εδάφους σε θερμές και ξηρές περιοχές οδηγούν σε πρωταρχική αλάτωση και σε εδάφη με λιγοστές γεωργικές δυνατότητες. Στις περιοχές αυτές, οι περισσότερες καλλιέργειες συμπεριλαμβανομένης της τομάτας, πρέπει να καλλιεργούνται υπό άρδευση. Οι ανθρώπινες παρεμβάσεις, όπως ακατάλληλες πρακτικές άρδευσης με αρδευτικό νερό πλούσιο σε άλατα και η ανεπαρκής αποστράγγιση οδηγεί σε δευτερογενή αλάτωση των υδάτινων πόρων και των εδαφών επηρεάζοντας το 20% του αρδευόμενου εδάφους παγκοσμίως (Ghassemi et al., 1995). Έτσι, δημιουργείται καθαρή απώλεια αρδευόμενης γης για τη γεωργία που φτάνει ως και τα 107 εκτάρια ετησίως, προκαλώντας μείωση του ένα τρίτου της παγκόσμιας παραγωγής τροφίμων (Machado & Serralheiro, 2017). Συνεπώς, στις περιοχές με βέλτιστο κλίμα για την τομάτα, η αλατότητα είναι σοβαρός αβιοτικός περιοριστικός παράγοντας που μειώνει την αξία της καλλιέργειας και της γεωργικής βιωσιμότητας της πληγείσας γης. Σημαντικός στόχος λοιπόν για την καλλιέργεια είναι, η ανάπτυξη τεχνικών που μπορούν να εφαρμοστούν για την αντιμετώπιση των βλαβερών επιπτώσεων του NaCl και η διερεύνηση δυνατοτήτων παραγωγής ανθεκτικών ποικιλιών στην αλατότητα (Cuartero & Fernandez-Munoz, 1999).

Τα τελευταία χρόνια μελετώνται ιδιαίτερα οι επιδράσεις της αλατότητας στην ανάπτυξη των φυτών τομάτας και στην παραγωγή καρπών. Η αλατότητα του εδάφους μετριέται με την ηλεκτρική αγωγιμότητα (EC), σε μονάδες $\text{mmho}/\text{cm}^{-1}$, dS/m^{-1} ή mS/cm^{-1} (μονάδες ισοδύναμες και περίπου ίσες με $640 \text{ mg άλατος}/\text{L}$). Σύμφωνα με έρευνες, η τομάτα ανέχεται ηλεκτρική αγωγιμότητα $2,5 \text{ dS m}^{-1}$ χωρίς απώλεια στην παραγωγή αλλά σε εδάφη με αγωγιμότητα μεγαλύτερη από 8 dS m^{-1} η εγκατάσταση μιας ανταγωνιστικής καλλιέργειας με απευθείας σπορά καθίσταται αδύνατη (Maas, 1986). Πέρα από τη βλάστηση του σπόρου, η υψηλή αλατότητα επιδρά στην ανάπτυξη της ρίζας, των βλαστών καθώς και την ποιότητα του καρπού με τρόπο που θα αναλυθούν παρακάτω.

1.2.2 Επιδράσεις της αλατότητας στα φυτά τομάτας

Η αλατότητα επηρεάζει πολλές πτυχές του φυτικού μεταβολισμού με δύο βασικά αποτελέσματα: την ωσμωτική καταπόνηση και την τοξικότητα των ιόντων. Η ωσμωτική καταπόνηση προκαλείται όταν ιόντα (κυρίως Na^+ , Cl^-) συσσωρεύονται στο έδαφος και μειώνουν τη διαθεσιμότητα του νερού στις ρίζες. Όταν τα ιόντα απορροφηθούν από τη ρίζα και συσσωρευθούν σε επιβλαβή επίπεδα στα φύλλα, προκαλούν τοξικότητα. Η ανισορροπία ιόντων μπορεί να οδηγήσει σε ανεπάρκεια θρεπτικών στοιχείων για το φυτό (Munns, 1993).

1.2.2.1 Επίδραση στη βλάστηση

Η καλλιέργεια της τομάτας μπορεί να σπαρθεί απευθείας στην τελική της θέση ή να μεταφτευτεί από σπορόφυτα που αναπτύσσονται υπό προστατευμένες συνθήκες. Στη δεύτερη περίπτωση, το υπόστρωμα και το νερό που χρησιμοποιείται συνήθως δεν αντιμετωπίζουν προβλήματα αλατότητας, επομένως η μελέτη των επιδράσεων του NaCl στη βλάστηση σχετίζεται μόνο με την περίπτωση της απευθείας σποράς στο χωράφι (Cuartero & Fernandez-Munoz, 1999).

Η βλάστηση της τομάτας χαρακτηρίζεται από τρεις φάσεις. Η πρώτη, διαρκεί περίπου 12 ώρες, περιλαμβάνει ταχεία απορρόφηση νερού και είναι ανεξάρτητη από τη βιωσιμότητα των σπόρων. Κατά τη δεύτερη φάση, η περιεκτικότητα σε υγρασία, ο ρυθμός αναπνοής και η μορφολογία του σπόρου παραμένουν σε σταθερά επίπεδα, παρόλο που μπορεί να συμβεί ενυδάτωση των κοτυληδόνων και η ενεργοποίηση υπαρχόντων ενζύμων (Bewley & Black, 1982). Έπειτα, ακολουθεί η φάση ανάπτυξης, όπου το φυτό απορροφά νερό και πραγματοποιεί κυτταρική διαίρεση 56 ώρες μετά την απορρόφηση και μερισματική δραστηριότητα στη ρίζα 72 ώρες μετά την απορρόφηση (Berrie & Drennan, 1971). Η κύρια επίδραση της αλατότητας στη βλαστικότητα φαίνεται να είναι στην αποτροπή της απορρόφησης του νερού του έδαφος, από τους σπόρους στην πρώτη φάση βλάστησης (Cuartero & Fernandez-Munoz, 1999).

Φαίνεται ότι η βλάστηση των σπόρων τομάτας μειώνεται ακόμη και σε σχετικά χαμηλές συγκεντρώσεις NaCl. Οι ερευνητές Cuartero & Fernandez (1999), μελέτησαν τη βλαστικότητα των σπόρων διάφορων ποικιλιών τομάτας υπό την επίδραση αλατότητας (Πίνακας 1.1). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι στα 80 mM παρατηρείται μείωση του ποσοστού βλάστησης των σπόρων που δεν αποτελεί σημαντικό πρόβλημα σε μια καλλιέργεια άμεσης σποράς όταν υπάρχει περίσσεια σπόρων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν. Όμως, στα 190 mM το ποσοστό βλάστησης μειώνεται δραστικά. Σε αυτές τις συνθήκες η εγκατάσταση μίας ανταγωνιστικής καλλιέργειας είναι δύσκολη (με εξαίρεση την ποικιλία «Edkawy»). Σε υψηλότερες συγκεντρώσεις NaCl μόνο λίγοι γονότυποι μπορούν να βλαστήσουν, και μάλιστα σε πολύ μικρά ποσοστά. Το γεγονός ότι υπάρχουν διαφορές μεταξύ των διάφορων ποικιλιών εντός του γένους *L. esculentum*, στην ικανότητά τους να βλασταίνουν σε αλατούχο μέσο, συνεπάγει τη δυνατότητα επιλογής εντός του καλλιεργούμενου είδους.

Accession	NaCl (mM)			
	80	190	265	330
Edkawy (<i>L. esculentum</i>)	102 a	102 a	59 b	30 c
Volgogradiskij (<i>L. esculentum</i>)	105 a	89 a	40 b	2 c
Pera (<i>L. esculentum</i>)	88 a	76 b	31 c	2 d
PE-64 (<i>L. esculentum</i> var. <i>cerasiforme</i>)	100 a	87 a	17 b	2 c
Muchamiel (<i>L. esculentum</i>)	94 a	50 b	22 c	0 d
Mex-112 (<i>L. esculentum</i> var. <i>cerasiforme</i>)	61 a	0 b	0 b	0 b
PE-22 (<i>L. peruvianum</i>)	93 a	2 b	0 b	0 b
PE-47 (<i>L. pennellii</i>)	74 a	21 b	0 c	0 c

Percentages with the same letter within a row are not significantly different ($p>0.95$).

Πίνακας 1.1. Ποσοστά βλάστησης οκτώ διαφορετικών ποικιλιών *Lycopersicon* στα 80, 190, 265 και 330 mM NaCl.

Η επίδραση της αλατότητας στη βλαστικότητα των σπόρων στα διάφορα είδη δεν αφορά μόνο τη μείωση του ποσοστού βλάστησης, αλλά και την επιμήκυνση του χρόνου που απαιτείται για να ολοκληρωθεί η βλάστηση (Ayers, 1952). Οι σπόροι τομάτας χρειάζονται περίπου 50% επιπλέον ημέρες για να βλαστήσουν στα 80 mM NaCl συγκριτικά με τους μάρτυρες και σχεδόν 100% περισσότερες ημέρες στα 190 mM (Πίνακας 1.2).

Accession	NaCl (mM)		
	0	80	190
Edkawy (<i>L. esculentum</i>)	3.7 a	4.7 a	7.2 a
Volgogradiskij (<i>L. esculentum</i>)	3.3 a	4.7 a	9.7 a
Pera (<i>L. esculentum</i>)	6.5 a	9.0 a	16.0 b
PE-64 (<i>L. esculentum</i> var. <i>cerasiforme</i>)	3.7 a	4.7 a	10.0 a,b
Muchamiel (<i>L. esculentum</i>)	4.7 a	7.0 a	–
Mex-112 (<i>L. esculentum</i> var. <i>cerasiforme</i>)	7.3 a	–	–
PE-22 (<i>L. peruvianum</i>)	6.3 a	6.3 a	–
PE-47 (<i>L. pennellii</i>)	5.7 a	–	–

Means of days with the same letter within a column are not significantly different ($p>0.95$).

Πίνακας 1.2. Ημέρες που απαιτούνται για τη βλάστηση του 80% των σπόρων οκτώ ποικιλιών *Lycopersicon* στα 0, 80 και 190 mM NaCl στους 25°C.

Η παράταση της βλαστικής περιόδου μπορεί να είναι πολύ επικίνδυνη για μια καλλιέργεια σε απευθείας σποράς γιατί αυξάνεται η πιθανότητα σχηματισμού κρούστας στην επιφάνεια του εδάφους, η οποία θα δυσχεράνει ή ακόμα θα αποτρέψει την ανάδυση των κοτυλιδόνων του φυτού. Επίσης, σε μία περίοδο αργής βλάστησης, οι σπόροι και τα νεαρά σπορόφυτα είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα στην προσβολή από μύκητες και παράσιτα. Ορισμένοι σπόροι που αποτυγχάνουν να βλαστήσουν σε ένα αλατούχο περιβάλλον, δε χάνουν τη βιωσιμότητά τους. Εάν η συγκέντρωση NaCl μειωθεί, λόγω βροχοπτώσεων ή άρδευσης με μη αλμυρό νερό, περισσότερο από το 50% αυτών των σπόρων θα εξακολουθήσουν να είναι ικανοί για βλάστηση. Βέβαια, μόνο οι σπόροι που δεν έχουν μπει στη φάση κυτταρικής διαίρεσης διατηρούν τη βλαστική τους ικανότητα (Allagui et al., 1987).

1.2.2.2 Επίδραση στην ανάπτυξη ρίζας

Το πρώτο τμήμα του φυτού που εκτίθεται στο NaCl είναι η ρίζα. Η επέμβαση NaCl οδηγεί σε αλλαγές στην ανάπτυξη, τη μορφολογία και τη φυσιολογία των ριζών που με τη σειρά τους επηρεάζουν την πρόσληψη νερού και ιόντων, καθώς και την παραγωγή σημάτων (ορμονών) που μεταδίδουν πληροφορίες στο βλαστό. Συνεπώς, ολόκληρο το φυτό επηρεάζεται όταν οι ρίζες αναπτύσσονται σε περιβάλλον υψηλής αλατότητας (Cuartero & Fernandez-Munoz, 1999).

Το NaCl προκαλεί μείωση της βιομάζας των ριζών σε συνθήκες $EC > 6 \text{ dSm}^{-1}$ (Nanawati και Maliwal, 1974). Οι ερευνητές Abrisqueta et al. (1991) υπολόγισαν τη

βιομάζα των ριζών στα φυτά της τομάτας που μεγαλώνουν με ή χωρίς 135 mM NaCl. Τα αποτελέσματα του πειράματος έδειξαν ότι η έκθεση στο NaCl οδήγησε σε καθυστέρηση της εμφάνισης των ριζών έως και μία εβδομάδα. Επίσης, η πυκνότητα του μήκους της ρίζας, στα φυτά που εκτέθηκαν στο NaCl, ήταν ένα τέταρτο μικρότερη συγκριτικά των φυτών μαρτύρων. Η μείωση αυτή της ανάπτυξης των ριζών μπορεί να οφείλεται στον περιορισμό ανάπτυξης των κυττάρων, λόγω του χαμηλού υδατικού δυναμικού από το εξωτερικό περιβάλλον του φυτού, την παρεμβολή των αλατούχων ιόντων στα θρεπτικά συστατικά των φυτών ή την τοξικότητα των συσσωρευμένων ιόντων που οδηγεί σε κυτταρικό θάνατο (Taylor et al., 1982).

Επίσης, το NaCl μπορεί να προκαλέσει έλλειψη νερού στην περιοχή της ρίζας όμοια με αυτή που δημιουργείται από την ξηρασία. Έχει βρεθεί ότι η ανάπτυξη της ρίζας μπορεί να συνεχιστεί σε περιόδους υδατικής καταπόνησης, επειδή οι επιδράσεις της εξισορροπούνται ωσμωτικά με μη τοξικές, οργανικές διαλυτές ουσίες όπως η προλίνη (Taylor et al., 1982). Το NaCl δεν επιβραδύνει μόνο την ανάπτυξη των ριζών, αλλά αυξάνει και το μήκος των νεκρών ριζών στους ευαίσθητους στην αλατότητα γονότυπους (Snapp & Shennan, 1992).

Παρά την αρνητική επίδραση της αλατότητας στις ρίζες, η ανάπτυξή τους φαίνεται να επηρεάζεται λιγότερο από την ανάπτυξη των βλαστών και γι' αυτό ο λόγος του ξηρού βάρους της ρίζας προς το ξηρό βάρος του βλαστού είναι μεγαλύτερος στα φυτά που αναπτύσσονται υπό συνθήκες υψηλής αλατότητας, απ' ό,τι στα φυτά που αναπτύσσονται σε ελεγχόμενο περιβάλλον, σε όλα τα στάδια ανάπτυξης (Cruz & Cuartero, 1990).

1.2.2.3 Επίδραση στην ανάπτυξη του βλαστού

Επιπρόσθετη επίδραση της αλατότητας στο φυτό της τομάτας αποτελεί η επιβράδυνση της ανάπτυξης των βλαστών του. Ειδικότερα, έχει παρατηρηθεί ότι κατά το στάδιο ανάπτυξης του φυταρίου, όσο πιο νεαρό είναι το φυτάριο που υφίσταται την επέμβαση NaCl, τόσο μικρότερη είναι η ανάπτυξη των βλαστών του (Dumbroff & Cooper, 1974). Μάλιστα, στα στάδια της ανθοφορίας και της καρποφορίας, τα φυτά αντέχουν συγκεντρώσεις NaCl που είναι επαρκείς για να τα νεκρώσουν στο στάδιο της φύτευσης (El-Shourbagy & Ahmed, 1975). Επίσης, έχει παρατηρηθεί ότι η

ικανότητα προσαρμογής στην αλατότητα είναι υψηλότερη στα γηραιά από ό,τι στα νέα φυτά (Cruz & Cuartero, 1990).

Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι στα φυτά που έχει πραγματοποιηθεί επέμβαση NaCl, παρατηρείται αισθητή αύξηση του αμπισικού οξέως (ABA) (λειτουργώντας ως αναστολέας αυξίνης), και μικρή ή αμελητέα αύξηση της αυξητικής ορμόνης (IAA), ανάλογα με την ποικιλία. Η αύξηση του ABA μπορεί να οφείλεται είτε στην υψηλότερη παραγωγή ABA από τις ρίζες ή στη μείωση του μεταβολισμού του ABA από φύλλα των οποίων τα στομάτια είναι μερικώς κλειστά (Dunlap & Binzel, 1996).

Η επέμβαση NaCl προκαλεί μείωση του ξηρού βάρους του βλαστού και των φύλλων, σε συνθήκες $EC < 6 \text{ dS m}^{-1}$. Η μείωση του ξηρού βάρους των φύλλων δεν οφείλεται σε μείωση του αριθμού των φύλλων αλλά σε μείωση της φυλλικής επιφάνειας, η οποία μπορεί να παρουσιάσει μεγαλύτερη μείωση αναλογικά με το ξηρό βάρος του βλαστού (Bolarin et al., 1991). Η μείωση αυτή οφείλεται σε κυτταρολογικές ιδιότητες του κυτταρικού τοιχώματος, τη μείωση της σπαργής των κυττάρων και τη μείωση του βαθμού φωτοσύνθεσης. Επίσης, η επέμβαση NaCl επηρεάζει τα περιεχόμενα των ιόντων στα φύλλα αυξάνοντας τις συγκεντρώσεις Na^+ , Cl^- και μειώνοντας τις συγκεντρώσεις K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} και NO_3^- . Η αύξηση αυτή των Na^+ και Cl^- που συμβαίνει στο κυτταρόπλασμα και σε άλλα κυτταρικά οργανίδια του φυτού, επηρεάζει την πρόσληψη νερού από τη ρίζα και οδηγεί σε τοξικότητα (Tavakkoli et al., 2010). Επιπλέον, το NaCl προκαλεί ξαφνική πτώση στο υδατικό δυναμικό των φύλλων, η οποία δεν αντισταθμίζεται αμέσως, αλλά μετά από λίγες ώρες, από την βραδύτερη μείωση του ωσμωτικού δυναμικού. Σε σχετικά χαμηλές συγκεντρώσεις αλάτων, η πτώση αυτή του υδατικού δυναμικού μπορεί να φέρει ως αποτέλεσμα την απότομη μείωση του ρυθμού ανάπτυξης των φύλλων (Sacher & Staples, 1985).

Η επιλογή γονότυπων ικανών να απορροφούν νερό υπό συνθήκες χαμηλού υδατικού δυναμικού του εδάφους θα μπορούσε να αυξήσει την ανθεκτικότητα στην αλατότητα. Πρόσθετοι μηχανισμοί που ενισχύουν την αντοχή των φυτών στην απώλεια νερού, όπως π.χ. η αύξηση του πάχους της επιδερμίδας των φύλλων, η μείωση αριθμού των στομάτων και η αλλοίωση της κατανομής των στομάτων στα φύλλα μπορούν να αυξήσουν την ανοχή στην αλατότητα, αλλά ίσως να επιδρούν αρνητικά στην απόδοση της παραγωγής καρπών (Flowers et al., 1986).

1.2.2.4 Επίδραση στην παραγωγή

Η τομάτα *L. esculentum* έχει χαρακτηριστεί ως «μέτριας ευαισθησίας» στην αλατότητα που σημαίνει ότι αντέχει σε ηλεκτρική αγωγιμότητα του εκχυλίσματος κορεσμού του εδάφους έως $2,5 \text{ dS m}^{-1}$ χωρίς καθόλου μείωση της παραγωγής (Maas, 1986). Κατά την άρδευση της καλλιέργειας με νερό και τη λίπανση σε φυσιολογικά επίπεδα, η EC του εκχυλίσματος κορεσμού του εδάφους κυμαίνεται μεταξύ 1,6 και $3,1 \text{ dS m}^{-1}$ (Mitchell et al., 1991). Στην υδροπονική καλλιέργεια η EC του θρεπτικού διαλύματος κυμαίνεται μεταξύ 2,0 και $2,5 \text{ dS m}^{-1}$ (Van Leperen, 1996· Cuartera & Soria, 1997). Συνεπώς, ακόμα και σε φυσιολογικές συνθήκες ανάπτυξης, το διάλυμα της ρίζας έχει τέτοια ηλεκτρική αγωγιμότητα που η παραγωγή μπορεί να αρχίσει να μειώνεται. Οποιαδήποτε αύξηση του NaCl στο διάλυμα που χρησιμοποιείται κατά την άρδευση, ακόμα και μικρή, αναμένεται να προκαλέσει μείωση της παραγωγής (Pasternak et al., 1979).

Η αλατότητα κατά τη διάρκεια της ημέρας ή στις ανοιξιάτικες και καλοκαιρινές καλλιέργειες προκαλεί μεγαλύτερη μείωση στην παραγωγή απ' ό,τι κατά τη διάρκεια της νύχτας ή στις φθινοπωρινές καλλιέργειες (Van Leperen, 1996). Ο λόγος είναι ότι κατά την περίοδο του καλοκαιριού, οι υψηλότερες θερμοκρασίες, η μεγαλύτερη ηλιακή ακτινοβολία και τα χαμηλά ποσοστά υγρασίας, μειώνουν το υδατικό δυναμικό στο φυτό, προκαλώντας έτσι ταχύτερη διαπνοή. Ταυτόχρονα, μειώνεται η ροή του νερού στον καρπό και συνεπώς ο ρυθμός διαστολής του και το μέσο βάρος του, οδηγώντας σε μειωμένη παραγωγή (Johnson et al., 1992).

Σύμφωνα με μελέτη των ερευνητών Gonzalez-Fernandez και Cuartero (1993), η άρδευση με νερό ηλεκτρικής αγωγιμότητας $5-6 \text{ dS m}^{-1}$ προκάλεσε 10% μείωση του βάρους του καρπού, η άρδευση με νερό ηλεκτρικής αγωγιμότητας 8 dS m^{-1} προκάλεσε 30% μείωση του βάρους του. Επίσης, έχει βρεθεί ότι η μείωση στο μέγεθος του καρπού που προκαλεί η αλατότητα, δεν είναι ίδια σε όλες τις ποικιλίες. Όσο μικρότερο είναι το μέγεθος του καρπού, τόσο πιο ασήμαντη μείωση προκαλεί η αλατότητα στο μέγεθός του, και τόσο πιο μικρή μείωση προκαλείται στην παραγωγή (Caro et al., 1991).

Τέλος, έχει βρεθεί ότι το NaCl προκαλεί μείωση της άνθισης, που μπορεί να οφείλεται στο περιορισμένο απόθεμα νερού πριν και κατά τη διάρκεια της

ανθοφορίας (Saito & Ito, 1974), αλλά και στην περιορισμένη ποσότητα καλίου και φωσφόρου (Menary & Van Stalen, 1976).

1.2.2.5 Επίδραση στην ποιότητα καρπού

Έχει παρατηρηθεί ότι οι καρποί των φυτών τομάτας που αναπτύσσονται υπό αλατούχες συνθήκες έχουν καλύτερη ποιότητα. Το πιο σημαντικό ποιοτικό κριτήριο που καθορίζει και την αξία του τοματοπολτού είναι η περιεκτικότητα σε ολικά διαλυτά στερεά (TSS). Έχει διαπιστωθεί ότι τα TSS αυξάνονται σε καρπούς φυτών που αρδεύονται με νερό μέτριας αλατότητας ($3-6 \text{ dS m}^{-1}$). Παρόλο που δεν έχει βρεθεί συσχέτιση μεταξύ των TSS, των σακχάρων και της γεύσης του καρπού, διαπιστώθηκε ότι οι καρποί που είχαν υποστεί επίδραση NaCl είχαν καλύτερη γεύση από τις τομάτες που αρδεύονταν με γλυκό νερό (Mizrahi et al., 1988).

Επίσης, το NaCl αυξάνει τα οργανικά οξέα και σε μικρότερο βαθμό τα σάκχαρα του καρπού της τομάτας, σε συνθήκες EC $2-9 \text{ dS m}^{-1}$. Η συσσώρευση αυτή των οργανικών οξέων, φαίνεται να αντισταθμίζει την υπερβολική ποσότητα κατιόντων (K^+ και Na^+) συγκριτικά των ανιόντων (Cl^- και SO_4^{2-}), διατηρώντας το pH του καρπού σταθερό (Davies, 1964). Βέβαια, σε συνθήκες υψηλής αλατότητας ($>100 \text{ mM NaCl}$), η διάρκεια ζωής και η σκληρότητα του καρπού μειώνονται σημαντικά. Εξαίρεση αποτελούν οι εμπορικές ποικιλίες με μεγάλη διάρκεια ζωής (Sharaf & Hobson, 1986).

Σύμφωνα με έρευνα των ερευνητών Mizhari (1982) και Sharaf & Hobson (1986), η διάρκεια ζωής και η συνεκτικότητα του καρπού μειώνεται σε συγκεντρώσεις άνω των 100 mM NaCl , ενώ σε μικρότερες συγκεντρώσεις NaCl, παραμένουν αναλλοίωτες. Οι καρποί που προέρχονται από φυτά που καλλιεργούνται σε συνθήκες υψηλής αλατότητας πρέπει αντιμετωπίζονται με ιδιαίτερη προσοχή καθώς οι τραυματισμοί της σάρκας των καρπών που προκαλούνται κατά διαδικασία της συλλογής, συσκευασίας και της μεταφοράς τους οδηγούν σε υψηλότερη παραγωγή CO_2 και αιθυλενίου συγκριτικά με τους καρπούς που έχουν αναπτυχθεί σε μη αλατούχες συνθήκες (Hobson, 1988).

Επίσης, η αλατότητα προκαλεί σήψη των ακραίων ανθών που κάνει τους καρπούς μη αποδεκτούς τόσο για την αγορά νωπών προϊόντων όσο και για τη βιομηχανία μεταποίησης. Τέλος οι ποιότητα των καρπών τομάτας που αναπτύσσονται σε αλατούχες συνθήκες επηρεάζεται αντίστροφα από την εμφάνιση ξηρής σήψης της

κορυφής του καρπού (Blossom-end rot). Η ξηρή σήψη προκαλείται από παράγοντες που εμποδίζουν την απορρόφηση του Ca και την κατανομή του στους καρπούς (Adams & Ho, 1995).

Οι ερευνητές Mizrahi και Pasternak (1985) έδειξαν ότι παρόλο που το NaCl μειώνει την απόδοση και το μέγεθος των καρπών, βελτιώνει τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά τους. Ειδικότερα, τα φυτά στα οποία εφαρμόστηκε νερό υψηλής αλατότητας, παρήγαγαν καρπούς με αυξημένα ολικά διαλυτά στερεά, αυξημένη περιεκτικότητα σε βιταμίνη C, υψηλότερη οξύτητα (% κιτρικό οξύ) και υψηλότερο Ph. Επίσης, παρατηρήθηκε ότι η αλατότητα αυξάνει τα σάκχαρα και τα οργανικά οξέα των καρπών, κάνοντάς τους πιο γευστικούς (Mitchell et al., 1991).

1.2.2.6 Επίδραση στη μορφολογία των φύλλων

Έχει παρατηρηθεί ότι τα φύλλα των φυτών που αναπτύσσονται υπό συνθήκες αλατότητας είναι συνήθως παχύτερα και πιο υδαρή. Το γεγονός αυτό αποδίδεται στην ωσμωρύθμιση των φυτών, καθώς αυξάνει την εσωτερική επιφάνεια στην οποία γίνεται διάχυση του CO₂ σε σχέση με την επιφάνεια των φύλλων, και μειώνει την εσωτερική αντίσταση των φύλλων στην απορρόφηση του CO₂ (Cuartero, J. & Fernández-Munoz, 1999)

Επίσης, το NaCl αυξάνει τον αριθμό τριχών των φύλλων, μειώνοντας έτσι την απώλεια νερού λόγω διαπνοής. Τέλος, το NaCl μπορεί να προκαλέσει απέκκριση ενώσεων, κατάρρευση των κυττάρων του μεσόφυλλου, διάσπαση της εφυμενίδας και των στομάτων, κατάρρευση των κυτταρικών τοιχωμάτων και καταστροφή των χλωροπλαστών (Flowers et al., 1991).

1.2.2.7 Επίδραση στην αγωγιμότητα των στομάτων και τη φωτοσύνθεση

Τα φυτά τομάτας που αναπτύσσονται υπό συνθήκες αλατότητας παρουσιάζουν μείωση της στοματικής αγωγιμότητας των φύλλων τους που οφείλεται τόσο στην ωσμωτική επίδραση όσο και στην τοξική επίδραση του Na⁺ (Plaut, 1995). Ειδικότερα, τα στόματα είναι ευαίσθητα στην υδατική κατάσταση των φύλλων και έχουν την τάση να κλείνουν με τη μείωση του υδατικού δυναμικού τους (Jarvis, 1980). Η αντίσταση των στομάτων στο κλείσιμο εξαρτάται από τον αριθμό των στομάτων ανά μονάδα

φυλλικής επιφάνειας και από τη μορφολογία των στοματικών πόρων. Γενικά παραμένει αποδεκτό ότι η αγωγιμότητα των στομάτων παραμένει ανεπηρέαστη από τη μείωση του υδατικού δυναμικού των φύλλων μέχρι μίας οριακής τιμής, πέρα της οποίας μειώνεται γρήγορα. Η τιμή αυτή είναι χαμηλότερη σε φυτά που έχουν υποβληθεί προηγουμένως σε υδατική καταπόνηση (Jones & Rawson, 1979).

Έχει βρεθεί ότι η επέμβαση NaCl στα φυτά προκαλεί μείωση της φωτοσύνθεσης που οφείλεται τόσο στη συμπεριφορά των στομάτων, όσο και στην παρεμβολή βιοχημικών διεργασιών των φυτών (Flowers et al., 1991). Φαίνεται ότι η επίδραση του NaCl οφείλεται περισσότερο στην τοξικότητα ιόντων παρά την έλλειψη νερού, εφόσον παρατηρήθηκε μεγαλύτερη μείωση της συγκέντρωσης CO₂ στους μεσοκυττάριους χώρους σε συνθήκες αλατότητας από ότι υδατικής καταπόνησης, παρόλο που το υδατικό δυναμικό των φύλλων ήταν ακριβώς το ίδιο (Plaut, 1995).

1.2.3 Τρόποι μετριασμού του προβλήματος της αλατότητας

Όπως προαναφέρθηκε, η αλατότητα επηρεάζει τη βλαστικότητα του σπόρου, την ανάπτυξη της ρίζας και του βλαστού, την ανθοφορία, την ποιότητα των καρπών και την παραγωγή, τη μορφολογία των φύλλων και τη φωτοσύνθεση. Για την καλλιέργεια τομάτας σε αλατούχα εδάφη απαιτείται η εφαρμογή μιας σειράς στρατηγικών που η καθεμία συμβάλλει σε μικρό βαθμό στο να μπορέσει το φυτό της τομάτας να ανταπεξέλθει καλύτερα στις βλαβερές επιδράσεις του NaCl. Με αυτόν τον τρόπο, η καλλιέργεια της τομάτας θα επιτευχθεί σε πιο αλατούχα εδάφη με τη χρήση νερού που μέχρι τώρα δεν επιτρεπόταν για την καλλιέργειά της (Cuartero, J. & Fernández-Munoz, 1999).

Οι μέθοδοι αντιμετώπισης της αλατότητας στην καλλιέργεια της τομάτας περιλαμβάνουν τη χρήση προετοιμασμένου σπόρου, την εφαρμογή κατάλληλων θρεπτικών στοιχείων μέσω της λίπανσης, την επίδραση μυκορριζών και τη χρήση ποικιλιών με αντοχή στην αλατότητα.

1.2.3.1 Προετοιμασία σπόρου

Οι περισσότερες μελέτες σχετικά με την ανθεκτικότητα των φυτών στην επίδραση της αλατότητας βασίζονται στο γεγονός ότι τα φυτά μπορούν να επιβιώσουν σε συνθήκες υψηλής αλατότητας εκφράζοντας προϋπάρχουσες γενετικές πληροφορίες τους για αντοχή. Ωστόσο, υπάρχουν ενδείξεις ότι τα φυτά εμφανίζουν προσαρμοστικές αντιδράσεις σε συνθήκες υψηλής αλατότητας. Ήδη από το 1964, ο Strogonov (1964) επεσήμανε ότι η αντοχή των φυτών στην αλατότητα μπορεί να αυξηθεί με την εμβάπτιση των σπόρων σε διάλυμα NaCl πριν από τη σπορά.

Σύμφωνα με έρευνες, η προετοιμασία του σπόρου διευκολύνει την πρόσληψη νερού και επιταχύνει τη βλάστησή του (Alvarado et al., 1987). Παρόλα αυτά, τα οφέλη στα μεταγενέστερα στάδια ανάπτυξης του φυτού και στην απόδοση παραμένουν ασαφή. Ειδικότερα, οι ερευνητές Cano et al. (1991) διαπίστωσαν αυξημένη απόδοση καρπών σε ορισμένες ποικιλίες που αρδεύτηκαν με νερό υψηλής αλατότητας όταν οι σπόροι εμβάπτιστηκαν σε 1 M NaCl για 36 ώρες, αλλά οι ερευνητές Alvarado et al. (1987) δεν διαπίστωσαν καμία επίδραση της προετοιμασίας του σπόρου στην τελική απόδοση καρπών. Η θετική επίδραση της προετοιμασίας του σπόρου στην απόδοση φαίνεται εντονότερα στην καλλιέργεια όταν εφαρμόζονται μέτριες (35-70 mM NaCl) παρά υψηλές συνθήκες αλατότητας (140 mM) (Cano et al., 1991).

Επιπλέον, η προετοιμασία των σποροφύτων πριν από τη μεταφύτευση, με εφαρμογή νερού ποιότητας ενδιάμεσης μεταξύ αυτής που χρησιμοποιείται στο σπορείο και αυτής που είναι διαθέσιμη στο χωράφι, αποτελεί έναν απλό τρόπο ώστε το σπορόφυτο να αντέξει καλύτερα τις βλαβερές συνέπειες του στρεσαρίσματος από την αλατότητα (Anzallag et al., 1990).

1.2.3.2 Κατάλληλη λίπανση

Η αλατότητα προκαλεί μια ανισορροπία θρεπτικών συστατικών στα φυτά τομάτας. Ειδικότερα παρατηρούνται χαμηλότερες συγκεντρώσεις των μακροστοιχείων N, P, Ca και K όταν τα φυτά καλλιεργούνται σε αλατούχο περιβάλλον. Ο πιο άμεσος τρόπος ανάκτησης των κανονικών συγκεντρώσεων των μακροστοιχείων αυτών γίνεται μέσω της λίπανσης στη ζώνη των ριζών. Επίσης η παρουσία NaCl στο ριζικό σύστημα των

φυτών προκαλεί αύξηση των μικροστοιχείων Fe, Mn, Zn και Cu στα φύλλα (Gonzalez-Fernandez, 1996).

Η πρόσληψη ασβεστίου από τα φυτά τομάτας μειώνεται από την αλατότητα (Adams & Ho, 1989). Πολλές μελέτες έχουν τονίσει τα οφέλη της συμπληρωματικής εφαρμογής Ca^{2+} στην ανάπτυξη καλλιεργειών τομάτας σε αλατούχο περιβάλλον. Ο ερευνητής Gonzalez-Fernandez (1996) διαπίστωσε υψηλότερο ξηρό βάρος βλαστών σε φυτά που είχαν αναπτυχθεί σε αλατούχο περιβάλλον και είχε προστεθεί Ca^{2+} στο θρεπτικό στους διάλυμα. Επίσης βρέθηκε ότι η προσθήκη Ca^{2+} μέσω λίπανσης με CaCl_2 προκαλεί στα φυτά που καλλιεργούνται σε αλατούχο περιβάλλον αύξηση των αντιοξειδωτικών διεργασιών και προστασία από τις δυσμενείς συνθήκες του NaCl (Jaleel et al., 2008).

Η επίδραση της αλατότητας στα επίπεδα του φωσφόρου στα φυτά τομάτας εξαρτάται από τη συγκέντρωση P στο θρεπτικό διάλυμα που εφαρμόζεται στα φυτά. Ειδικότερα, σε αλατούχες συνθήκες, όταν το θρεπτικό διάλυμα περιέχει υψηλή συγκέντρωση P (εύρους mM), παρατηρείται τοξικότητα στα φυτά (Cerde & Bingham, 1978). Αντίθετα, όταν η συγκέντρωση P στο θρεπτικό διάλυμα είναι χαμηλή (εύρους μM), παρατηρείται αύξηση της απόδοσης των καρπών αύξηση του ξηρού βάρους των φυτών (Awad et al., 1990). Η συμπληρωματική προσθήκη P σε συγκέντρωση από 1 έως 10 μM στο θρεπτικό διάλυμα, μπορεί να βελτιώσει την επιβλαβή επίδραση του NaCl στο νερό άρδευσης αλλά και να είναι ευεργετική ακόμα και για τα φυτά που δεν δέχονται επίδραση αλατότητας. Η προσθήκη P στο θρεπτικό διάλυμα σε συγκεντρώσεις από 10 έως 100 μM , θα μπορούσε ενδεχομένως να βελτιώσει την παραγωγικότητα των φυτών τομάτας που καλλιεργούνται υπό αλατούχες συνθήκες, αλλά απαιτείται περαιτέρω έρευνα για να επιβεβαιωθεί αυτό (Awad et al., 1990).

Η αύξηση της συγκέντρωσης N στο θρεπτικό διάλυμα έως 120 ppm, έχει βρεθεί ότι αυξάνει τη βλαστική ικανότητα και τη συνολική απόδοση των φυτών τομάτας που καλλιεργούνται σε αλατούχες συνθήκες, αλλά όχι πάντοτε (Hall, 1983). Ειδικότερα, οι ερευνητές Paradopoulos και Rendig (1983) διαπίστωσαν ότι η αύξηση του N στα 120 ppm συμβάλει στην αντιμετώπιση των δυσμενών επιπτώσεων που προκαλεί η συγκέντρωση 5-9 dS m^{-1} NaCl στην ανάπτυξη φυτών τομάτας. Οι ερευνητές Heuer και Feigin (1993) διαπίστωσαν θετική επίδραση της υψηλότερης δόσης N (280 ppm) στο ξηρό βάρος των βλαστών, αλλά η προσθήκη ήταν αναποτελεσματική στην

αντιμετώπιση των δυσμενών επιπτώσεων που προκαλεί ποσότητα 5-6 dS m⁻¹ NaCl στην ανάπτυξη των φυτών τομάτας. Λιπάνσεις με υψηλότερες συγκεντρώσεις N μπορούν να προκαλέσουν μόλυνση των υπογείων υδάτων λόγω του NO⁻³ (Cramer & Lips, 1995).

1.2.3.3 Η επίδραση μυκορριζών

Ο όρος μυκόρριζα αναφέρεται σε μια ποικιλία συμβιωτικών σχέσεων ανάμεσα σε φυτά και μύκητες οι οποίοι αποικίζουν τον φλοιό των ριζών κατά την περίοδο ενεργής ανάπτυξης των φυτών. Η σχέση χαρακτηρίζεται από την μεταφορά α) παραγόμενου από το φυτό άνθρακα προς το μύκητα, και β) προσληφθέντων από τον μύκητα θρεπτικών στοιχείων προς το φυτό.

Η επίδραση ορισμένων μυκορριζών (Vesicular-arbuscular mycorrhizal - VAM) φαίνεται να αυξάνουν την αντοχή στο NaCl σε ορισμένες καλλιέργειες, όπως τα κρεμμύδια και οι πιπεριές (Hirrel & Gardemann, 1980). Ως αναφορά την τομάτα, ερευνητές διαπίστωσαν βελτιωμένη ανάπτυξη φυτών που είχαν εμβολιαστεί με VAM που συλλέχθηκαν από αλατούχα εδάφη αλλά ορισμένες περιπτώσεις οι μυκορριζες δεν προκάλεσαν καμία επίδραση ή ακόμη παρήγαγαν βραδύτερη ανάπτυξη στα φυτά συγκριτικά με τους μάρτυρες (Prud et al., 1984). Ίσως θα μπορούσε να γίνει επιλογή μεταξύ των μυκορριζών που προάγουν την ανάπτυξη των φυτών τομάτας σε συνθήκες υψηλής αλατότητας, αλλά μέχρι και σήμερα η χρήση τους εξακολουθεί να είναι αμφιλεγόμενη (Cuartero, J. & Fernández-Munoz, 1999).

1.2.3.4 Αναπαραγωγή ανθεκτικών φυτών

Η επιτυχία σε κάθε διαδικασία αναπαραγωγής φυτών βασίζεται α) στην αναγνώριση, όσο το δυνατόν με μεγαλύτερη ακρίβεια, των χαρακτηριστικών που πρόκειται να βελτιωθούν, β) στην ύπαρξη παραλλακτικότητας για τα χαρακτηριστικά εντός του ίδιου είδους ή συγγενικών ειδών, σε συνδυασμό με την υψηλή έκφραση του χαρακτηριστικού σε ορισμένα φυτά γ) στην υψηλή κληρονομικότητα για το χαρακτηριστικό αυτό.

Η τομάτα καλλιεργείται για τον καρπό. Οπότε, η αντοχή μια ποικιλίας τομάτας στο NaCl, χαρακτηρίζεται από την επίδραση στην τελική απόδοση για τον παραγωγό, η οποία πρέπει να είναι κερδοφόρα για τον ίδιο. Η απόδοση παραγωγής πρέπει

συνεπώς να είναι ο βασικός στόχος σε κάθε πρόγραμμα αναπαραγωγής, και βάση αυτού το κάθε πρόγραμμα να αξιολογείται. Ωστόσο, η αλατότητα προκαλεί τόσες πολλές διαταραχές στην μορφολογία και τη φυσιολογία των φυτών, ώστε ο μόνος τρόπος για την επίτευξη κερδοφόρων αποδόσεων σε αλατούχες συνθήκες είναι ο συνδυασμός διαφορετικών μορφολογικών και φυσιολογικών χαρακτηριστικών, σε μία ποικιλία, όπου το κάθε χαρακτηριστικό θα βελτιώνει μόνο μια συγκεκριμένη επιβλαβή επίδραση του NaCl και ο συνδυασμός τους θα φέρει το βέλτιστο γενετικό αποτέλεσμα (Cuartero, J. & Fernández-Munoz, 1999).

Υπάρχουν πολλά χαρακτηριστικά στα φυτά τομάτας που ερευνώνται στα προγράμματα αναπαραγωγής για την επίτευξη της βέλτιστης αντοχής στην αλατότητα. Τα χαρακτηριστικά αυτά μπορούν να συμβάλουν στη μείωση των οσμωτικών και τοξικών επιδράσεων του NaCl και μεταξύ αυτών αφορούν:

- Τη βλάστηση του σπόρου: το ποσοστό βλάστησης, την ταχύτητα βλάστησης, την περιεκτικότητα του σπόρου σε ABA και GA.
- Τη ρίζα: το ξηρό βάρος της ρίζας, τον αριθμό τροφοδοτικών ριζών, την αναλογία ξηρού βάρους ρίζας προς βλαστό, το επιφανειακό φορτίο ρίζας, την περιεκτικότητα σε Na⁺.
- Το βλαστό: τη ζωηρότητα του βλαστού, το ξηρό βάρος, την ανάπτυξη στελέχους, την επιφάνεια των φύλλων, το ρυθμό ανάπτυξης των φύλλων, το ξηρό βάρος των φύλλων, το πάχος των φύλλων, την αποδοτικότητα χρήσης νερού, την κατανομή Na⁺ μεταξύ των νεαρών και παλαιών φύλλων, την αναλογία Na⁺/K⁺ στα φύλλα, τη συσσώρευση Na⁺, Cl⁻, Ca²⁺ και NO₃⁻ στα φύλλα, την περιεκτικότητα σε προλίνη και μυο-ινοσιτόλη.
- Την καρπόδεση: το μέγεθος των καρπών, τον αριθμό των καρπών, την ποσότητα γύρης, τη σήψη της κορυφής του καρπού.

Έχει αποδειχθεί ότι υπάρχει παραλλακτικότητα για τα περισσότερα από τα παραπάνω επιλεγμένα χαρακτηριστικά, και οι γονότυποι με υψηλή έκφραση αυτών των χαρακτηριστικών βρίσκονται εντός του *L. esculentum* ή σε στενά συγγενικά διασταυρούμενα άγρια είδη. Μεγαλύτερος όγκος ριζών επιτρέπει στα φυτά να αποικίσουν μεγαλύτερο όγκο εδάφους και τελικά να βρουν μέρη του εδάφους με μικρότερη συγκέντρωση αλάτων. Ποικιλίες με αυξημένη ανάπτυξη του ριζικού

συστήματος έχουν καλύτερη ικανότητα αντικατάστασης των ριζών που καταστρέφονται από τις επιβλαβείς συνθήκες αλατότητας. Επίσης, η αυξημένη ικανότητα ανάπτυξης ριζικών τριχών και η συσσώρευση ωσμωτικά ενεργών διαλυτών ουσιών στις ρίζες πιθανόν να μπορεί να συμβάλει στην αποτελεσματικότερη απορρόφηση νερού σε εδάφη με χαμηλό υδατικό δυναμικό. Επιπλέον, η μεταβολή του αριθμού και της κατανομής των στομάτων στα φύλλα των φυτών πιθανόν να συμβάλει στον αποτελεσματικότερο σχηματισμό ξηρής ουσίας ανά μονάδα απορροφούμενου νερού, πράγμα που οδηγεί σε μικρότερη απορρόφηση τοξικών αλάτων και αποφυγή της απώλειας του ήδη απορροφημένου νερού. Η αύξηση του πάχους και της ρευστότητας των φύλλων και η συσσώρευση ωσμωτικά ενεργών διαλυτών ουσιών θα μπορούσαν να συμβάλουν στην αύξηση της ικανότητας συσσώρευσης τοξικών ιόντων στα κενά των κυττάρων του μεσοφύλλου, επιμηκύνοντας τη διάρκεια ζωής των κυττάρων αυτών σε αλατούχες συνθήκες. Τέλος, η αύξηση της επιλεκτικότητας στην απορρόφηση θρεπτικών ουσιών από το έδαφος, θα σήμαινε μεγαλύτερη αναλογία θρεπτικών συστατικών έναντι τοξικών αλάτων στο ξύλωμα και η αύξηση της ικανότητας των φυτών να διανέμουν τα τοξικά ιόντα, συσσωρεύοντας τα στα παλαιότερα φύλλα και προστατεύοντας τα νεαρά, συμβάλλοντας στη μείωση των δυσμενών επιδράσεων που προκαλεί το NaCl (Cuartero, J. & Fernández-Munoz, 1999).

Μια επιπρόσθετη πηγή παραλλακτικότητας μπορεί να επιτευχθεί με την εισαγωγή γονιδίων μέσω μεθόδων γενετικής μηχανικής, καθώς η τομάτα μπορεί να μετασχηματιστεί μέσω του βακτηρίου *Agrobacterium tumefaciens*. Αρκετά γονίδια έχουν εισαχθεί στην τομάτα όπως το *TPX1*, που επηρεάζει τη δραστηριότητα της υπεροξειδάσης (Botella et al., 1994), το γονίδιο *P5CR*, που σχετίζεται με τη συσσώρευση προλίνης (Kishor et al., 1995), τα γονίδια *HAL1* και *HAL3* που επηρεάζουν την αναλογία K^+/Na^+ και το γονίδιο *HAL2*, που εμπλέκεται στην τοξικότητα που προκαλεί το NaCl (Serrano, 1996).

1.3 ΒΙΟΤΙΚΕΣ ΚΑΤΑΠΟΝΗΣΕΙΣ ΤΗΣ ΤΟΜΑΤΑΣ

1.3.1 Το γένος *Verticillium*

Οι μύκητες του γένους *Verticillium*, ανήκουν στην κλάση Sordariomycetes και στην τάξη Phyllachorales (Fradin & Thomma, 2006). Σε αυτό το γένος περιλαμβάνονται σημαντικοί φυτοπαθογόνοι μύκητες με καταστροφικές επιπτώσεις σε πολλές καλλιέργειες παγκοσμίως. Τα είδη που αναφέρονται είναι τα *V. dahliae*, *V. albo-atrum*, *V. nigrescens*, *V. nubilum*, *V. tricorpus* και *V. theobromae*. Μέχρι σήμερα δεν έχει αναφερθεί η παρουσία τέλειας μορφής σε κανένα από τα παραπάνω. Τα είδη *V. dahliae* και *V. albo-atrum*, προκαλούν σοβαρές απώλειες στα καλλιεργούμενα φυτά και δραστηριοποιούνται κυρίως στις εύκρατες και υποτροπικές περιοχές του πλανήτη, αλλά λιγότερο στις τροπικές (Bhat & Subbarao, 1999).

1.3.2 Ο μύκητας *Verticillium dahliae*

Ο μύκητας *Verticillium dahliae* είναι ημιβιοτροφικός, μεταδίδεται από το έδαφος και μπορεί να προσβάλει το αγγειακό σύστημα των φυτών εμποδίζοντας την κυκλοφορία των θρεπτικών συστατικών. Προκαλεί σημαντική οικονομική απώλεια παγκοσμίως, ωστόσο η σοβαρότητα των συμπτωμάτων και οι μειώσεις της απόδοσης των καλλιεργειών ποικίλλουν σε εύρος ανάλογα με την τοποθεσία και τη χρονική περίοδο της προσβολής (Schnathorst, 1981). Οι ξενιστές του περιλαμβάνουν πάνω από 200 δικοτυλήδονα φυτικά είδη, με τους σημαντικότερους από οικονομική άποψη το βαμβάκι, την πατάτα και την ελιά. Το παθογόνο εμφανίζεται σε όλο τον κόσμο σε εύκρατες και υποτροπικές ζώνες σε όλες τις ηπείρους, αλλά μόνο σποραδικά σε τροπικές ζώνες (Soesanto, 2000).

1.3.3 Μορφολογικά χαρακτηριστικά του μύκητα *V. dahliae*

Ο μύκητας *V. dahliae* πρώτο-περιεγράφηκε μορφολογικά σε ασθενή φυτά ντάλιας (*Dahlia rosae*) από τον Heinrich Klebahn το 1913 (Klosterman et al., 2009). Το μυκήλιο του μύκητα είναι αρχικά λευκό βαμβακώδες, πολυκύτταρο (με εγκάρσια χωρίσματα), και αργότερα γίνεται καστανό με λεπτό τοίχωμα διαμέτρου 2- 4 μm . Οι κονιδιοφόροι του μύκητα είναι μικροί (80-160 μm μήκος), ελεύθεροι, ανορθωμένοι και υαλώδεις, με χαρακτηριστική διακλάδωση κατά σπονδύλους. Ειδικότερα, κάθε κονιδιοφόρος φέρει από 1-3 σπόνδylους, από τους οποίους εκφύονται συνήθως 3-4 φιαλίδια τα οποία σχηματίζουν στις κορυφές τους κονίδια (φιαλιδιοσπόρια) (Εικόνα 1.1). Τα κονίδια είναι μονοκύτταρα, υαλώδη, ωοειδή ή ελλειψοειδή διαστάσεων 2,5-8 x 1,4-3,2 μm . Στην κορυφή κάθε φιαλιδίου παράγονται διαδοχικά πολλά κονίδια, τα οποία συγκρατούνται μεταξύ τους με μια κολλώδη ουσία και έτσι σχηματίζονται συχνά μικρές κεφαλές (ομάδες) κονιδίων (Παναγόπουλος, 2007). Το διαχειμάζον μυκήλιο είναι συνήθως σκούρου καφέ χρώματος και με αποβλάστηση (budding) σχηματίζει μαύρα μικροσκληρώτια διαμέτρου 30-60 μm (Fradin & Thomma, 2006). Τα μικροσκληρώτια είναι στρογγυλά έως ελλειψοειδή συσσωματώματα κυτταρικών υφών με παχιά τοιχώματα (Εικόνα 1.2). Το μελανό τους χρώμα οφείλεται στη μελανίνη και μπορούν να επιβιώσουν σε εκτεταμένες περιόδους στο έδαφος, χωρίς ξενιστή (Klosterman et al., 2009).



Εικόνα 1.1. Κονίδια του μύκητα *V. dahliae* που εκφύονται από τα φιαλίδια (Scott Enebak, University of Auburn).



Εικόνα 1.2. Μικροσκληρώτια του μύκητα *V. dahliae* σε καλλιέργεια (Thomas Gulya).

1.3.4 Συμπτώματα της ασθένειας

Τα συμπτώματα που προκαλούν τα στελέχη του γένους *Verticillium* μπορούν εύκολα να μπερδευτούν με αυτά του γένους *Fusarium* και άλλων μυκητολογικών ασθενειών και η ταυτοποίηση του μύκητα μπορεί να απαιτεί εργαστηριακή εξέταση (Strand, 1998). Παρόμοια συμπτώματα επίσης, μπορεί να σχετίζονται με αβιοτικά προβλήματα, όπως π.χ. μη βέλτιστη άρδευση. Τα ορατά συμπτώματα της νόσου γίνονται εμφανή μόνο στα τελευταία στάδια της μόλυνσης (Jeffrey et al., 2014). Η πρώτη ένδειξη της ασθένειας είναι ο μαρασμός. Τα φυτά παρουσιάζουν ήπιο έως μέτριο μαρασμό κατά τη διάρκεια του θερμότερου μέρους της ημέρας, αλλά ανακάμπτουν τη νύχτα. Καθώς η νόσος εξελίσσεται, αναπτύσσεται χλώρωση στα κατώτερα φυλλάρια του φυτού, ενώ ορισμένα φυλλάρια μπορεί να εμφανίζουν χαρακτηριστικές κιτρινωπές κηλίδες V (Jeffrey et al., 2014) (Εικόνα 4). Σε πολύ ευπαθή φυτά, μπορεί να εμφανιστεί φυλλόπτωση, διακοπή της ανάπτυξης και πρόωρη νέκρωση (Heuvelink, 2005).



Εικόνα 1.3. Συμπτώματα μόλυνσης του φυτοπαθογόνου μύκητα *V. dahliae* σε φυτά ηλίανθου στον αγρό (Howard F. Schwartz, Colorado State University).



Εικόνα 1.4. Μαρασμός, χλώρωση και κίτρινες κηλίδες σε φύλλα τομάτας από προσβολή του μύκητα *V. dahliae* (Gene McAnoy).



Εικόνα 1.5. Χαρακτηριστικός μεταχρωματισμός των αγγείων του στελέχους σε διαμήκη τομή (Brian Hudelson).

1.3.5 Ο βιολογικός κύκλος του μύκητα *V. dahliae*

Η ασθένεια που προκαλεί ο μύκητας *V. dahliae* είναι μονοκυκλική. Ο βιολογικός κύκλος της ασθένειας μπορεί να χωριστεί σε παρασιτικό στάδιο, σαπροτροφικό στάδιο και το στάδιο της διάπαυσης (Fradin & Thomma, 2006). Ο μύκητας *V. dahliae* επιβιώνει στο έδαφος υπό την μορφή των μικροσκληρωτίων, τα οποία διασκορπίστηκαν από το μολυσμένο φυτικό υλικό, το έδαφος, το νερό ή από γεωργικό εξοπλισμό (Klosterman et al., 2009).

Κατά τη διάρκεια της διάπαυσης, ο μύκητας επιβιώνει στις διαχειμάζουσες δομές του, τα μικροσκληρώτια, τα οποία μπορούν να παραμείνουν βιώσιμα στο έδαφος,

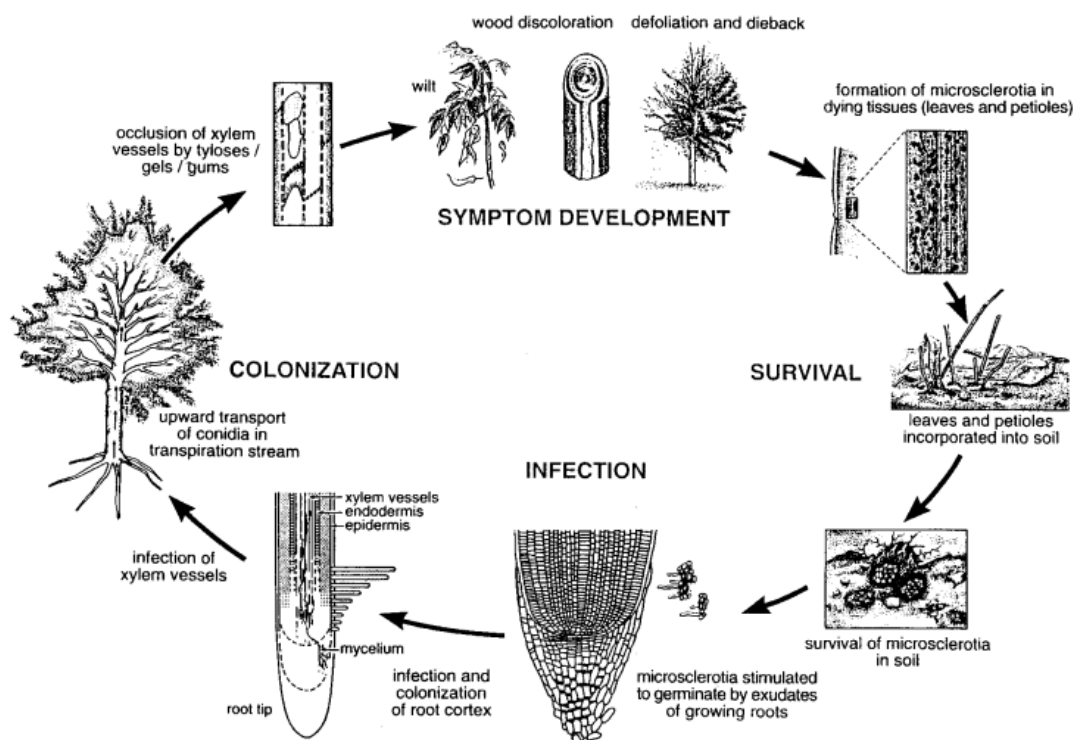
χωρίς ξενιστή για εκτεταμένες περιόδους, από 10 έως και 15 έτη (Wilhelm, 1955· Powelson & Rowe, 1993). Στο στάδιο αυτό τα μικροσκληρώτια παραμένουν αδρανοποιημένα και δε βλαστάνουν. Η αναστολή της βλάστησής τους εξαρτάται από τις διαθέσιμες συγκεντρώσεις του άνθρακα και του αζώτου στη ριζόσφαιρα (Olsson & Nordbring-Hertz, 1985). Τα μικροσκληρώτια έχουν την ικανότητα να βλαστάνουν περισσότερες από μία φορές, αυξάνοντας την πιθανότητα μιας επιτυχημένης μόλυνσης (Fradin & Thomma, 2006).

Κατά την έναρξη του παρασιτικού σταδίου, ο μύκητας προσβάλλει τις ρίζες του φυτού ξενιστή μέσω του εδάφους. Ειδικότερα, η μόλυνση γίνεται από το άκρο της ρίζας ή από τις θέσεις σχηματισμού των πλευρικών ριζών. Επίσης, ο μύκητας μπορεί να εισέλθει απευθείας και από τα επιδερμικά κύτταρα της ζώνης επιμήκυνσης της ρίζας. Στο στάδιο αυτό, οι βλαστανούσες υφές του μύκητα κατευθύνονται προς την περιοχή της ριζόσφαιρας του φυτού ξενιστή, οδηγούμενες από τις συγκεντρώσεις των θρεπτικών στοιχείων που απελευθερώνονται από το ριζικό του σύστημα (Prieto et al., 2010). Μόλις ο μύκητας εισέλθει στη ρίζα, αναπτύσσεται τόσο στα μεσοκυττάρια όσο και στα ενδοκυττάρια φλοιώδη κύτταρα της ρίζας και εισέρχεται στο αγγειακό σύστημα του φυτού όπου σχηματίζει κονίδια (Bowers et al., 1996). Η ενδοδερμίδα ενεργεί ως φυσικός φραγμός της ρίζας που δεν μπορεί να διαπεραστεί από το μύκητα και μόνο λίγες προσβολές του φλοιού της ρίζας (5% ή μικρότερο) φτάνουν στον αγγειακό ιστό (Huisman, 1982). Επίσης, έχει βρεθεί ότι οι αγγειακές προσβολές είναι επιτυχείς εκεί όπου η ενδοδερμίδα δεν έχει αναπτυχθεί ακόμα (επάκρια της ρίζας) ή εκεί όπου έχει υποστεί καταπόνηση (π.χ. από νηματώδεις). Τα κονίδια που δημιουργεί ο μύκητας στα αγγεία του ξύλου βλαστάνουν απευθείας από τις μυκηλιακές υφές ή εκκλύονται απευθείας από τα κονίδια των φιαλιδίων (Buckley et al., 1969). Αφού τα κονίδια βλαστήσουν εισέρχονται στα γειτονικά αγγεία του ξύλου, προκειμένου να συνεχίσει ο αποικισμός και να ξεκινήσει ένας νέος κύκλος μόλυνσης εντός του φυτού ξενιστή (Cooper & Bishop, 1983). Η χρονική διάρκεια που χρειάζεται ο μύκητας για να εισέλθει στα αγγεία του ξύλου της ρίζας είναι 2-4 ημέρες και για να εξαπλωθεί και να απελευθερώσει τα κονίδιά του στα γειτονικά αγγεία του ξύλου είναι άλλη μία ημέρα (Chen et al., 2004). Ο κύριος μηχανισμός προσβολής του μύκητα, είναι η απόφραξη του ξυλώματος και η παραγωγή τοξινών. Με αυτόν τον τρόπο επηρεάζεται η μεταφορά του νερού και των θρεπτικών συστατικών στο φυτό

(Klosterman et al., 2009). Ωστόσο, η διαπνοή και η αναπνοή του εναέριου μέρους είναι ισχυρή, προκαλώντας ανισορροπία νερού στο φυτό και εμφάνιση των χαρακτηριστικών συμπτωμάτων της ασθένειας (Temple et al., 1973). Βέβαια, η απόφραξη του ξυλώματος δεν είναι η κύρια αιτία του μαρασμού του φυτού. Έρευνες έχουν δείξει ότι η νέκρωση των φύλλων προκαλείται κυρίως από τη δράση τοξινών (Fradin & Thomma, 2006).

Κατά τη διάρκεια νέκρωσης των ιστών και της γήρανσης του φυτού, ο *μύκητας V. dahliae* εισέρχεται στο σαπροφυτικό του στάδιο. Στο στάδιο αυτό, ο μύκητας εξαπλώνεται σε όλο το φυτό, αποικίζοντας βλαστούς και ρίζες. Στις περιοχές επιτυχούς μόλυνσης, σχηματίζει κονιδιοφόρους και κονίδια τα οποία συνεχίζουν να αναπτύσσονται και μετά την πλήρη νέκρωση του φυτού (Vallad et al., 2006). Τα κονίδια δεν μπορούν να επιβιώσουν για αρκετούς μήνες στο έδαφος, αλλά μπορούν να προκαλέσουν δευτερογενείς μολύνσεις σε άλλες καλλιέργειες (Klosterman et al., 2009). Στα μολυσμένα φυτά, οι βλαστοί και οι ρίζες φέρουν μεγάλο αριθμό μικροσκληρωτίων, τα οποία θα απελευθερωθούν στο έδαφος κατά την αποδόμησή τους (Fradin & Thomma, 2006). Η βλάστηση μικροσκληρωτίων, υπόκειται σε μυκόσταση, λαμβάνει χώρα μόνο υπό την επίδραση των εκκρίσεων της ρίζας στη ριζόσφαιρα των φυτών ξενιστών. Επίσης, ορισμένοι μη ξενιστές του μύκητα έχουν αναφερθεί ότι προκαλούν τη βλάστηση των μικροσκληρωτίων (Olsson & Nordbring, 1985). Πιστεύεται ότι ένα μολυσμένο στέλεχος φυτού μπορεί να απελευθερώσει και στο έδαφος πάνω από 90.000 μικροσκληρώτια τα οποία θα εξαπλωθούν σε ολόκληρο τον αγρό (Johson & Dung, 2010).

Η μόλυνση από το μύκητα μπορεί να προέρχεται από μολυσμένο έδαφος, εργαλεία ή φυτικά υπολείμματα των λαχανικών. Ένας μεγάλος αριθμός καλλιεργειών και ζιζανίων μπορούν να χρησιμεύσουν ως ξενιστές (Strand, 1998). Τα κονίδια σκορπίζονται εύκολα από τα ρεύματα του αέρα. Ο μύκητας αναπτύσσεται ευνοϊκά σε θερμοκρασία 20-23 °C. Η ασθένεια παρατηρείται εντονότερη σε ουδέτερα έως αλκαλικά εδάφη (Αγγίδης, 2006).



Εικόνα 1.6. Ο βιολογικός κύκλος του μύκητα *V. dahliae* (Hiemstra & Termorshuizen).

1.3.6 Παράγοντες που επηρεάζουν την εξάπλωση

Όπως όλες οι ασθένειες έτσι και η βερτισιλλίωση επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες όπως: η θερμοκρασία, το pH και ο αερισμός του εδάφους, η υγρασία, το φως, η παρουσία νηματωδών και άλλων εντόμων στο έδαφος.

Όσο αφορά την θερμοκρασία, ο μύκητας προκαλεί συμπτώματα προσβολής στα φυτά σε θερμοκρασίες 12-30 °C, γι' αυτό θεωρείται και επικίνδυνος καθώς είναι οι πιο σύνηθες θερμοκρασίες που επικρατούν στις παραμεσόγειες χώρες (Θανασουλόπουλος 1992).

Αποτελεί γεγονός ότι η ασθένεια παρατηρείται εντονότερα σε ουδέτερα έως αλκαλικά εδάφη (Αγγίδης, 2006). Ωστόσο, σύμφωνα με μελέτες *in vitro*, η μεγαλύτερη ανάπτυξη του μύκητα παρατηρείται σε pH εύρους (5,5-7,2) (Dutta & Isaac, 1979). Όσο αναφορά τον αερισμό του εδάφους, έρευνες έχουν δείξει ότι σε μεγάλο βάθος εδάφους ή πλημμυρισμένο έδαφος όπου επικρατούν χαμηλές συγκεντρώσεις οξυγόνου και διοξειδίου του άνθρακα τα μικροσκληρώτια το αποικίζουν με μικρότερο ρυθμό (Green, 1980· Menzies, 1962).

Σχετικά με την υγρασία του εδάφους, ποσοστό υγρασίας από 60% έως και 70% φαίνεται να ευνοεί την ασθένεια. Σε υψηλότερο ποσοστό παρατηρείται νέκρωση των μικροσκληρωτίων, λόγω των αναερόβιων συνθηκών που επικρατούν. Ωστόσο η υγρασία δεν είναι σοβαρός περιοριστικός παράγοντας στην επιβίωση των μικροσκληρωτίων εκτός αν βρίσκεται στο επίπεδο κορεσμού και συνδυάζεται με θερμοκρασία στους 28 °C (Green, 1980).

Επιπρόσθετος παράγοντας που παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη του μύκητα είναι το φως. Έχει παρατηρηθεί ότι η υψηλή ένταση φωτός έχει την ικανότητα να καταστέλλει τον σχηματισμό μελανίνης και μικροσκληρωτίων (Brandt, 1964).

Τέλος, έχει παρατηρηθεί ότι βιοτικοί παράγοντες όπως έντομα και νηματώδεις που προκαλούν πληγές στις ρίζες των φυτών μπορούν να συμβάλουν στην ευκολότερη είσοδο του μύκητα στους ιστούς του φυτού ξενιστή και να οδηγήσουν σε υψηλότερη συχνότητα προσβολής (Αγγίδης, 2006).

1.3.7 Αντιμετώπιση της ασθένειας

Η ασθένεια της βερτισιλλίωσης είναι πολύ δύσκολο να ελεγχθεί, τόσο λόγω του μεγάλου φάσματος ξενιστών της, όσο και της ικανότητας του παθογόνου να επιβιώνει στο έδαφος για αρκετά χρόνια, υπό τη μορφή των μικροσκληρωτίων (Pegg, 1984). Η πιο επιθυμητή προσέγγιση για την αντιμετώπιση της ασθένειας είναι η αποφυγή, όσο το δυνατόν, του φυτοπαθογόνου μύκητα με περιορισμούς καραντίνας, αποτροπή της μετακίνησης μολυσμένων φυτών ή σπόρων και αφαίρεση των ασθενών φυτών από τον αγρό από τα πρώτα συμπτώματα εμφάνισης της ασθένειας (Frandon & Thomma, 2006).

Στο παρελθόν, η χημική απολύμανση του εδάφους με βρωμιούχο μεθύλιο, θεωρούνταν η πιο αποτελεσματική μέθοδος για την αντιμετώπιση της βερτισιλλίωσης. Όμως, η χρήση του ισχυρού αυτού απολυμαντικού απαγορεύτηκε το 2015 λόγω των υψηλών επιπέδων υπολειμμάτων που αφήνει στα τρόφιμα και τους κινδύνους που προκαλεί τόσο στην ανθρώπινη υγεία όσο και το περιβάλλον (Ζιώγας και Μαρκόγλου, 2007).

Η χρήση ανθεκτικών ποικιλιών αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους τρόπους αποφυγής προσβολής του μύκητα *V. dahliae*. Σε ορισμένους ξενιστές, όπως η τομάτα, έχουν δημιουργηθεί υβρίδια που διαθέτουν γονίδια αντοχής σε ορισμένες φυλές του

μύκητα (Παναγόπουλος 2007). Σε άλλους ξενιστές, όπως καρποφόρα δέντρα, έχουν βρεθεί ανθεκτικές ποικιλίες που χρησιμοποιούνται ως υποκείμενα. Όμως στους περισσότερους ξενιστές, δεν έχει βρεθεί οικονομικά αποδεκτή αντοχή στο μύκητα *V. dahliae* (Fravel, 1989). Γι' αυτό το λόγο, η αντιμετώπιση βασίζεται κυρίως σε διάφορες προληπτικές επεμβάσεις.

Η εφαρμογή της ηλιοαπολύμανσης, ως προληπτικό μέτρο, θεωρείται σήμερα η πιο αποτελεσματική μέθοδος για τον περιορισμό της ασθένειας. Κατά τη μέθοδο αυτή, γίνεται κάλυψη του βρεγμένου εδάφους με φύλλο λεπτού και διαφανούς πολυαιθυλενίου κατά τη διάρκεια των μηνών με τη μεγαλύτερη ηλιοφάνεια και θερμοκρασίας. Έτσι, η θερμότητα της ηλιακής ακτινοβολίας απορροφάται από το υγρό έδαφος αυξάνοντας την θερμοκρασία του και προκαλώντας αλλαγές στις φυσικοχημικές ιδιότητές του και τη μικροβιακή του κοινότητα. Στην Ελλάδα, σε καλλιέργειες τομάτας και αγκινάρας, η εφαρμογή της ηλιοαπολύμανσης έχει δώσει πολύ ενθαρρυντικά αποτελέσματα στη μείωση του αρχικού μολύσματος της ασθένειας (Tjamos & Paplomatas, 1987). Μάλιστα, βρέθηκε ότι με την εφαρμογή της ευνοείται η ανάπτυξη ορισμένων ανταγωνιστικών για την ασθένεια μικροοργανισμών (π.χ. *Talaromyces flavus*) (Tjamos, 1989).

Η αμειψισπορά αποτελεί μία μέθοδο αντιμετώπισης πολλών φυτοπαθολογικών ασθενειών, όμως για την περίπτωση της βερτισιλλίωσης δε φαίνεται ιδιαίτερα αποτελεσματική λόγω του μεγάλου εύρους ξενιστών που μολύνουν τα είδη του γένους *Verticillium*. Καλλιεργητικές τεχνικές όπως καταστροφή των υπολειμμάτων της προηγούμενης καλλιέργειας, η εκρίζωση και καταστροφή των μολυσμένων φυτών, η αποφυγή συγκαλλιέργειας ευπαθών ειδών, η αποφυγή δημιουργίας πληγών με καλλιεργητικά εργαλεία στην περιοχή του λαιμού και των ριζών, η αποφυγή άρδευσης με τη μέθοδο της κατάκλισης, η αποφυγή αζωτούχου λίπανσης και η χρήση υγιούς πολλαπλασιαστικού υλικού, μπορούν να περιορίσουν σε σημαντικό βαθμό την εξάπλωση της ασθένειας (Παναγόπουλος, 2007).

1.3.8 Βιολογική αντιμετώπιση

Τα τελευταία χρόνια αυξάνεται όλο και περισσότερο η απαίτηση των καταναλωτών για γεωργικά προϊόντα με όσο το δυνατόν λιγότερα χημικά κατάλοιπα, φιλικά προς την ανθρώπινη υγεία και το περιβάλλον (Ζιώγας και Μαρκόγλου, 2007). Η βιολογική αντιμετώπιση αποτελεί μία μέθοδο πολλά υποσχόμενη, που κατακτά όλο και περισσότερο έδαφος τον τομέα της γεωργίας. Η μέθοδος αυτή περιλαμβάνει τη χρήση μικροοργανισμών (βιολογικών παραγόντων) που παρεμποδίζουν τη δραστηριότητα του φυτοπαθογόνου αιτίου και επομένως την εκδήλωση της ασθένειας. Αφορά την αξιοποίηση σαπροφυτικών κυρίως μικροοργανισμών που δρουν ως καταστολείς των ασθενειών με απώτερο στόχο την εξασφάλιση της υγείας του φυτού. Η κατασταλτική δυνατότητα των μικροοργανισμών εξαρτάται από την ικανότητά τους τόσο να αποικίζουν τις ρίζες όσο και να παράγουν ουσίες που αναστέλλουν τα παθογόνα (Thomashow et al., 1990). Η μέθοδος βασίζεται στην εκδήλωση αλληλεπιδράσεων του φυτού, του βιολογικού παράγοντα, του παθογόνου, της μικροβιακής χλωρίδας και του φυσικού περιβάλλοντος. Η θετική δράση των βιολογικών παραγόντων διερευνάται ιδιαίτερα τα τελευταία χρόνια και μπορεί να οφείλεται στους εξής μηχανισμούς (Τζάμος, 2007).

- Ανταγωνισμός του βιολογικού παράγοντα με το παθογόνο για θρεπτικά συστατικά ή για θέση στο φυτό ξενιστή
- Παραγωγή διάφορων αντιμικροβιακών ενώσεων (αντιβίωση)
- Παρασιτισμός
- Επαγωγή της διασυστηματικής άμυνας των φυτών
- Συνδυασμός όλων των παραπάνω παραγόντων

Έχει βρεθεί ότι ορισμένοι εδαφογενείς μύκητες είναι ικανοί να μειώσουν τη συχνότητα εμφάνισης της ασθένειας που προκαλείται από το μύκητα *V. dahliae*. Μεταξύ αυτών τα στελέχη *Gliocladium roseum*, *Penicillium griseo-fulvum*, *Penicillium vermiculatum*, *Aspergillus alutaceus*, *Talaromyces flavus*, *Trichoderma harzianum* και *Trichoderma viride* (Dutta, 1981· Ghaffer, 1988· Keinath et al., 1981· Henni, 1988). Οι ερευνητές Marios et al. (1982), απέδειξαν ότι ο μύκητας *Talaromyces flavus* μείωσε τη μόλυνση από το μύκητα *V. dahliae* και αύξησε την απόδοση της καλλιέργειας σε

μεγάλο βαθμό. Σε άλλες έρευνες, παρατηρήθηκε ότι η παρουσία του μη παθογόνου μύκητα *V. nigrescens* στις ρίζες ευπαθών ξενιστών, καθυστέρησε την εμφάνιση του μύκητα *V. dahliae* έως και 4 εβδομάδες (Schnathorst, 1981).

Εκτός από τους μύκητες, ορισμένα στελέχη βακτηρίων βρέθηκαν να καταστέλλουν την ανάπτυξη του μύκητα *V. dahliae*. Έρευνες έδειξαν ότι στελέχη των γενών *Pseudomonas* και *Streptomyces* έχουν την ικανότητα να αποικίζουν τις ρίζες της πατάτας, να δρουν ανταγωνιστικά του μύκητα *V. dahliae* και να αυξάνουν την ανάπτυξη των φυτών στο θερμοκήπιο (Wadi & Easton, 1985). Επίσης, σύμφωνα με έρευνες οι αντιβιοτικές ουσίες που παράγονται από στελέχη *Bacillus Subtilis* που απομονώθηκαν από το ξύλωμα της αμερικάνικης φτελιάς (*Ulmus americana* L.), έχουν την ικανότητα να αναστέλλουν την ανάπτυξη του μύκητα *V. dahliae* σε βιοδοκιμές *in vitro* (Schreiber et al., 1988). Οι ερευνητές Berg και Ballin (1994) διαπίστωσαν ότι τα βακτηριακά στελέχη *Erwinia herbicola*, *Pseudomonas chlororaphis*, *Pseudomonas paucimobilis* και *Stenotrophomonas maltophilia* δρουν ως ανταγωνιστές του μύκητα *V. dahliae* σε πειράματα *in vitro*. Τέλος, έχει βρεθεί ότι το ριζοβακτήριο *Paenobacillus alvei* (K165), έχει την ικανότητα να προωθεί την ανάπτυξη των φυτών και να λειτουργεί ως βιολογικός παράγοντας για την αντιμετώπιση του μύκητα *V. dahliae*, τόσο στο θερμοκήπιο όσο και στον αγρό (Tjamos et al., 2005). Κατά τη διάρκεια των τελευταίων ετών έχουν γίνει πολυάριθμα πειράματα με ανταγωνιστικά ριζοβακτήρια που έχουν αναφερθεί. Παρ' όλα αυτά, η ασυνέπεια των αποτελεσμάτων στον αγρό, καταδεικνύει ότι υπάρχει ανάγκη για εκτεταμένες μελέτες σχετικά με τις ικανότητες των ριζοβακτηρίων (Berg et al., 1994).

1.4 ΤΟ ΑΜΥΝΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ

1.4.1 Γενικά

Τα φυτά εκτίθενται συνεχώς σε ένα μεγάλο αριθμό παθογόνων. Προκειμένου να μπορέσουν να προστατευτούν από ενδεχόμενη μόλυνση των παθογόνων αυτών, κατά τη διάρκεια της εξελικτικής τους πορείας, ανέπτυξαν συστήματα άμυνας μέσω διαφόρων βιοχημικών και μοριακών μηχανισμών. Αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης αυτής είναι μια σταθερή και παράλληλη εξέλιξη στο χρόνο, του αμυντικού συστήματος των φυτών και των μηχανισμών μολυσματικότητας των παθογόνων (Agrios, 2005).

Προκειμένου να αποβούν μολυσματικά τα περισσότερα παθογόνα πρέπει να εισέλθουν στο εσωτερικό του φυτού. Αυτό επιτυγχάνεται είτε διαπερνώντας απευθείας τη φυλλική ή ριζική επιφάνεια, είτε εισέρχοντας από πληγές ή φυσικά ανοίγματα στα φύλλα όπως είναι τα στομάτια. Τα φυτά, για να αποφύγουν την προσβολή βασίζονται στον αμυντικό μηχανισμό κάθε μεμονωμένου κυττάρου καθώς και στην παραγωγή διασυστηματικών σημάτων που προέρχονται από το σημείο της αρχικής προσβολής. Τα ανοικτά στομάτια των φύλλων αποτελούν ένα από τα πιο ευπαθή σημεία του φυτού για την είσοδο των παθογόνων μικροοργανισμών. Γι' αυτό το λόγο, τα φυτά ανέπτυξαν μηχανισμούς που κλείνουν τα στομάτιά τους όταν αντιλαμβάνονται την παρουσία των φυτοπαθογόνων (Sawinski et al., 2013). Τα δομικά χαρακτηριστικά, όπως το κυτταρικό τοίχωμα, αποτελούν ένα αμυντικό σύστημα το οποίο προϋπάρχει στα φυτά και λειτουργεί ως φυσικός φραγμός στην είσοδο των παθογόνων και στην εξάπλωσή τους μέσα στα φυτά. Επίσης, τα φυτά αντιλαμβάνονται άμεσα ή έμμεσα την παρουσία ενός παθογόνου με επακόλουθο την επαγωγή αμυντικών αντιδράσεων. Αυτές οι αντιδράσεις περιλαμβάνουν τη σύνθεση σημάτων όπως το σαλικυλικό οξύ, το ιασμονικό οξύ και το αιθυλένιο τα οποία ελέγχουν την έκφραση γονιδίων και την παραγωγή μορίων που σχετίζονται με την άμυνα των φυτών. Όλες αυτές οι επαγόμενες φυσιολογικές αντιδράσεις έχουν σκοπό τον περιορισμό της εισόδου και της ανάπτυξης του παθογόνου στους ιστούς του φυτού. Το τελικό αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης φυτού - παθογόνου είναι η πρόκληση ασθένειας στο φυτό (συμβατότητα) ή η αντοχή του φυτού (ασύμβατη σχέση) και εξαρτάται από ένα συνδυασμό πολλών παραμέτρων. Αυτές οι παράμετροι

περιλαμβάνουν τα γενετικά χαρακτηριστικά και τη φυσιολογική κατάσταση του φυτού και του παθογόνου καθώς και περιβαλλοντικές συνθήκες όπως η υγρασία, η θερμοκρασία και το φως (Agrios, 2005).

1.4.2 Παθητικοί προϋπάρχοντες μηχανισμοί άμυνας

Οι παθητικοί μηχανισμοί άμυνας των φυτών χωρίζονται σε φυσικούς και χημικούς μηχανισμούς.

1.4.2.1 Φυσικοί μηχανισμοί

Στους φυσικούς μηχανισμούς περιλαμβάνονται: οι κηρώδεις ουσίες που καλύπτουν επιφανειακά τα φύλλα και τους καρπούς, το πάχος της εφυμενίδας, η σκληρότητα και το πάχος των κυτταρικών τοιχωμάτων των επιδερμικών κυττάρων, τα κλειστά στομάτια, τα σκληρεγχυματικά κύτταρα και οι ηθμαγγειώδεις δεσμίδες των νεύρων των φύλλων, το πάχος της ενδοδερμίδας και τα επιφανειακά τριχίδια (Τζάμος, 2007).

1.4.2.2 Χημικοί μηχανισμοί

Η συμβολή των χημικών παραγόντων στην έκφραση της ανθεκτικότητας των παθογόνων είναι αναμφιβόλως σημαντικότερη εκείνης που εξασφαλίζεται με τις προϋπάρχουσες κατασκευές. Έχει διαπιστωθεί ότι πολλά φυτά περιέχουν αντιμικροβιακές ουσίες που συμβάλλουν στην παρεμπόδιση της διεισδύσεως ή της προελάσεως και στον πολλαπλασιασμό των παθογόνων. Χημικές ενώσεις, όπως φαινολικές ενώσεις, ταννίνες ή και διένια που βρίσκονται σε μεγάλες ποσότητες σε αναπτυσσόμενα φυτικά όργανα (φύλλα, καρποί, αλλά και σπέρματα) θεωρούνται ως χημικοί παρεμποδιστές παθογόνων σε νεαρούς ιστούς. Πολλές από αυτές τις ουσίες θεωρείται επίσης ότι παρεμποδίζουν την ενζυματική δράση πηκτινολυτικών ή άλλων ενζύμων των παθογόνων. Σημαντικοί τοξικοί μεταβολίτες θεωρούνται και οι σαπωνίνες και τα γλυκοαλκαλοειδή που έχουν όχι μόνο αντιμικροβιακή μεμβρανολυτική δράση, αλλά αποτρέπουν την εγκατάσταση των παθογόνων που δε διαθέτουν ένζυμα, όπως οι σαπωνινάσες, ικανά να διασπάσουν τις σαπωνίνες και να υπερνικήσουν την αντίσταση του ξενιστή (Τζάμος, 2007).

1.4.3 Διεγερόμενοι ενεργητικοί μηχανισμοί άμυνας

Οι ενεργητικοί μηχανισμοί άμυνας των φυτών χωρίζονται σε ιστολογικούς και βιοχημικούς μηχανισμούς.

1.4.3.1 Ιστολογικοί μηχανισμοί

Στους ιστολογικούς μηχανισμούς περιλαμβάνεται η εναπόθεση λιγνίνης, η εναπόθεση καλλόζης, η δημιουργία τυλώσεων ή θηλίδων, και ο σχηματισμός φελλωδών στρωμάτων. Η εναπόθεση της λιγνίνης ως μηχανισμού αντοχής αυξάνει τη μηχανική αντοχή των κυτταρικών τοιχωμάτων των φυτών και παραλλήλως μειώνει την ευαισθησία τους στην αποδιοργανωτική δράση υδρολυτικών ενζύμων. Επίσης, παρεμποδίζει την ανάπτυξη του παθογόνου με τη δράση των προδρόμων της λιγνίνης, ουσιών που είναι φυτοαλεξίνες. Η εναπόθεση καλλόζης (1,β-3 πολυμερές της γλυκόζης), στις θέσεις διεισδύσεως μυκηλιακών υφών στα φυτικά κύτταρα, θεωρείται ως σημαντικός μηχανισμός αντοχής. Οι τυλώσεις είναι διατάξεις και διογκώσεις της κυτταρικής μεμβράνης των παρεγχυματικών κυττάρων των αγγειωδών δεσμίδων στα σημεία των πλάγιων βοθρίων προς το εσωτερικό των αγγείων. Ο έγκαιρος σχηματισμός τυλώσεων παρεμποδίζει τη διέλευση του παθογόνου. Η εναπόθεση λιγνίνης ή καλλόζης που λαμβάνει χώρα στις δευτερογενείς ρίζες των φυτών, αποτελεί σημαντικό ιστολογικό μηχανισμό άμυνας των φυτών προς μύκητες που προκαλούν αδρομυκώσεις. Ο σχηματισμός φελλωδών στρωμάτων είναι μια επουλωτική διαδικασία του φυτού σε θέσεις πληγών με τη δημιουργία αφοριστικών ιστών. Πρόκειται για σχηματισμό αδιαπέραστου στρώματος που προέρχεται από το φελλογόνο κάμβιο στην επιφάνεια της πληγής. Με αυτόν τον τρόπο προκαλείται αποξένωση των νεκρών κυττάρων του ξενιστή όπου βρίσκεται και το παθογόνο (Τζάμος, 2007).

1.4.3.2 Βιοχημικοί μηχανισμοί

Οι βιοχημικοί μηχανισμοί αντοχής περιλαμβάνουν τις φυτοαλεξίνες και τις δραστικές ομάδες οξυγόνου.

Οι φυτοαλεξίνες είναι αντιμικροβιακές ουσίες μικρού μοριακού βάρους που παράγονται και συσσωρεύονται στα φυτικά κύτταρα είτε ως αποτέλεσμα μόλυνσης

από φυτοπαθογόνους μικροοργανισμούς είτε ως απόρροια επιδράσεως χημικών ή άλλης φύσεως μη παρασιτικών αιτιών (π.χ, καταπονήσεως). Πρόκειται για λιπόφιλες ουσίες που εντοπίζονται κυρίως στο κέντρο και μέχρι την περιφέρεια των κηλίδων και γενικά των εστιών μόλυνσεως. Η αντιμικροβιακή δράση των φυτοαλεξινών απαντά κυρίως σε περιπτώσεις μυκητολογικών και λιγότερο σε περιπτώσεις βακτηριολογικών προσβολών. Δεν έχει ακόμη διαπιστωθεί παρουσία φυτοαλεξινών που δρουν εναντίον φυτικών ιών. Μέχρι σήμερα έχουν χαρακτηριστεί χημικά 350 φυτοαλεξίνες οι οποίες προέρχονται από 30 περίπου οικογένειες, κυρίως δικοτυλήδων φυτών. Στην επιτυχή αντιμικροβιακή δράση των φυτοαλεξινών, συμβάλει σημαντικά η εναπόθεση κόμμεων στα σημεία διεισδύσεως του παθογόνου. Τα κόμμεα είναι πολυσακχαρίτες ζελατινώδους υφής τα οποία στις περιπτώσεις των αδρομυκώσεων συμβάλλουν στη στεγανοποίηση των αγγείων και στον εγκλωβισμό του παθογόνου στα αγγεία του ξύλου (Τζάμος, 2007).

Τα φυτικά κύτταρα κατά τη διάρκεια αντιδράσεων με δυνητικά φυτοπαθογόνα παράγουν ενεργό οξυγόνο. Οι δραστικές ομάδες οξυγόνου (ανιόν υπεροξειδίου O_2^- , υπεροξείδιο του υδρογόνου και υδροϋπεροξυλικές-ρίζες) είναι πολύ καταστρεπτικές και μπορούν να επηρεάσουν αρνητικά πολλές κυτταρικές λειτουργίες που λαμβάνουν χώρα κατά την αλληλεπίδραση ξενιστή-παθογόνου. Η παραγωγή ενεργού οξυγόνου παρατηρείται σε δευτερόλεπτα ή σε μερικά λεπτά μετά από την επαφή με το παθογόνο και συμβάλει σημαντικά στην εκδήλωση της αντιδράσεως υπερευαισθησίας (Τζάμος, 2007).

1.4.4 Η αντίδραση υπερευαισθησίας

Αντίδραση υπερευαισθησίας καλείται η ακραία έκφραση σε μυκητολογικές, βακτηριολογικές και ιολογικές προσβολές, με κύριο χαρακτηριστικό τον ταχύτατο θάνατο του κυττάρου του ξενιστή ως τελικό επακόλουθο της επιχειρούμενης μόλυνσεως. Πρόκειται για ιδιόμορφη «αυτοκτονία» ενός ή περισσότερων φυτικών κυττάρων μέσω της οποίας απομονώνεται το παθογόνο στις θέσεις διεισδύσεως, παρεμποδίζεται η προέλαση ή ο πολλαπλασιασμός και η μετακίνησή του και τελικά αποφεύγεται η ανάπτυξη της ασθένειας. Η αντίδραση υπερευαισθησίας διεγείρεται από το παθογόνο ή από προϊόντα του μεταβολισμού τους και προϋποθέτει μοριακή επικοινωνία αλληλοαναγνώρισεως ξενιστή και παθογόνου. Αφορά ετερόλογες

(ασύμβατες) σχέσεις παθογόνου-ξενιστή και περιλαμβάνει κυτταρολογικές και βιοχημικές αλλοιώσεις και ταχύτατη νέκρωση των προσβαλλόμενων κυττάρων με επακόλουθο τον εγκλωβισμό του παθογόνου στην αρχική θέση διεισδύσεώς του (Τζάμος, 2007). Για την ενεργοποίηση της αντίδρασης υπερευαισθησίας, είναι απαραίτητο η ταυτόχρονη αύξηση των δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) και μονοξειδίων του αζώτου (NO) (Taiz & Zeiger, 2013).

1.4.5 Επαγόμενη και επίκτητη διασυστηματική αντοχή

Τα φυτά έχουν τη δυνατότητα να αμύνονται κατά των παθογόνων με μια πλειάδα μηχανισμών αντοχής. Οι μηχανισμοί αυτοί λειτουργούν στα ανθεκτικά, κατά περίπτωση, φυτά ή παραμένουν σε λανθάνουσα κατάσταση και διεγείρονται από βιοτικούς ή αβιοτικούς παράγοντες. Η επαγόμενη διασυστηματική αντοχή περιλαμβάνει τη διεγερση λανθανόντων μηχανισμών αντοχής. Η μορφή αυτή της προστασίας διαχωρίζεται σε επίκτητη διασυστηματική αντοχή (Systemic Acquired Resistance/SAR), όταν ενεργοποιείται κατόπιν μόλυνσεως του ξενιστή με ένα παθογόνο και σε επαγόμενη διασυστηματική αντοχή (Induced Systemic Resistance)/ISR), όταν επιτυγχάνεται με βιολογικούς παράγοντες π.χ. ριζοβακτήρια. Επιπλέον, η ανοσοποίηση εμφανίζεται με δύο μορφές: μια τοπικού και μια διασυστηματικού χαρακτήρα. Η τοπικά επαγόμενη αντοχή εκφράζεται μόνο στο σημείο εισβολής του παθογόνου στο φυτό με νέκρωση και ξήρανση των ιστών και σχετίζεται με την αντίδραση υπερευαισθησίας. Κατά τη διασυστηματικά επαγόμενη αντοχή, οι αμυντικοί μηχανισμοί του φυτού εκφράζονται και μακράν του σημείου διεγέρσεως (Τζάμος, 2007).

1.4.6 Βιοχημικοί παράγοντες της ανοσοποίησης

Το σήμα αποτελεί τον καθοριστικό βιοχημικό παράγοντα της «ανοσοποίησης». Πολυάριθμες βιβλιογραφικές αναφορές επισημαίνουν τη σημασία του, αλλά υπάρχουν διστάμενες απόψεις ως προς τη φύση και τον ακριβή του ρόλο.

1.4.6.1 Σαλικυλικό οξύ

Το σαλικυλικό οξύ παράγεται στους χλωροπλάστες των φυτών. Είναι προϊόν του μεταβολισμού των φαινυλοπροπανοειδών. Έχει φυσικές ιδιότητες οι οποίες το

καθιστούν ιδανική τη μεταφορά του μέσα στον ηθμό. Θεωρείται ότι το σαλικυλικό οξύ είναι διεγέρτης της συσσώρευσης των πρωτεϊνών σχετικών με τη παθογένεση. Επίσης, πιστεύεται ότι το σαλικυλικό οξύ παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στη διάχυση και στη μεταφορά του σήματος ύστερα από τη προσβολή και τη μόλυνση από το φυτοπαθογόνο. Πιστεύεται, επίσης, ότι είναι διεγέρτης της συσσωρεύσεως των πρωτεϊνών σχετικών με την παθογένεση (PR πρωτεϊνών) (Τζάμος, 2007).

1.4.6.2 Ιασμονικό οξύ

Το ιασμονικό οξύ όπως και ο μεθυλιωμένος εστέρας, παράγονται από το λινολενικό οξύ. Αποτελούν ενώσεις που ανήκουν στις κυκλοπεντανόνες. Και τα δύο υπάρχουν σε όλα τα φυτά ενώ μετακινούνται εύκολα και στην υγρή και στην αέρια τους φάση. Όπως το αιθυλένιο, και το ιασμονικό οξύ σχετίζεται συνήθως με την άμυνα του φυτού ενάντια σε νεκροτροφικά παθογόνα και φυτοφάγα έντομα. Εξωγενής εφαρμογή ιασμονικού ή μεθυλιωμένου ιασμονικού οξέος προωθούν τη γήρανση και ρυθμίζουν την ανάπτυξη του φυτού. Επιπλέον προκαλεί διέγερση διάφορων πρωτεϊνών που συμβάλουν στην άμυνα του φυτού (Τζάμος, 2007).

1.4.6.3 Συστεμίνη

Η συστεμίνη είναι ένα πεπτίδιο 18 αμινοξέων που έχει απομονωθεί από την τομάτα. Απαντά σε μικρές ποσότητες και όταν χορηγείται σε νεαρά φυτά τομάτας συμβάλλει στη σύνθεση των παρεμποδιστών πρωτεϊνών. Η συστεμίνη μαζί με το σαλικυλικό οξύ πιστεύεται ότι αποτελούν τα σήματα της ανοσοποιήσεως SAR και έχουν την ικανότητα να μετακινούνται μέσα στο φυτό (Τζάμος, 2007).

1.4.6.4 Αιθυλένιο

Το αιθυλένιο επηρεάζει το ρυθμό αναπτύξεως των φυτών και τη γήρανση. Στις περιπτώσεις ασθενών φυτών το αιθυλένιο παράγεται, όταν το παθογόνο διεισδύει στο φυτικό ιστό. Η παρουσία του αιθυλενίου προκαλεί δομικές αλλαγές που αυξάνουν την αντοχή του κυτταρικού τοιχώματος, όπως εναπόθεση λιγνίνης και συσσώρευση υδροξυπρολινοπρωτεϊνών. Το αιθυλένιο αποτελεί σήμα για την επαγωγή της ανοσοποιήσεως- SAR, ωστόσο δεν αποτελεί την ουσία διεγέρσεως των λανθανόντων μηχανισμών άμυνας στα φυτά (Τζάμος, 2007).

1.4.7 Πρωτεΐνες που σχετίζονται με την παθογένεση

Η παρουσία των πρωτεϊνών παθογενέσεως (PR-πρωτεΐνες) κατά τη διέγερση της ανοσοποιήσεως/SAR αποδεικνύει ότι συμβάλλουν σημαντικά στην άμυνα των ενεργοποιημένων φυτικών ιστών. Οι πρωτεΐνες παθογενέσεως κωδικοποιούνται από το φυτό ξενιστή, αλλά η σύνθεσή τους ενεργοποιείται σε περιπτώσεις ασθeneιών ή καταπονήσεως. Συσσωρεύονται στη θέση, αλλά μερικές εξ αυτών ανιχνεύονται σε μικρότερα επίπεδα και σε υγιείς ιστούς αποδεικνύοντας τον διασυστηματικό τους χαρακτήρα (Τζάμος, 2007).

Τα γονίδια που σχετίζονται με τις PR έχουν ένα ευρύ φάσμα λειτουργιών και περιλαμβάνουν υδρολυτικά ένζυμα, αναστολείς πρωτεϊνών, υπεροξειδάσεις, ριβονουκλεάσες, ντιφενσίνες, πρωτεΐνες μεταφοράς λιπιδίων και πολλές άλλες συναφείς με την άμυνα του φυτού λειτουργίες. Οι πρωτεΐνες PR-1 έχουν αντιμυκητιακή δράση *in vitro*. Βρέθηκε ότι η έκφραση του γονιδίου *PR-1a* σε διαγονιδιακό καπνό, αύξησε την ανθεκτικότητα του καπνού ενάντια στους ωομύκητες *Peronospora tabacina* και *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*. Επίσης βρέθηκε ότι η υπερέκφραση του είναι δείκτης της ενεργοποίησης του μηχανισμού άμυνας που εξαρτάται από το σαλικυλικό οξύ (Feys et al., 2000· Schenk et al., 2000). Το γονίδιο *PIN 2*, συνδέεται με το μονοπάτι ιασημονικού οξέως και αθυλενίου. Σύμφωνα με άλλες έρευνες, η υπερέκφραση του γονιδίου *PR-5* που κωδικοποιεί την ωσμοτίνη του καπνού σε φυτά πατάτας, μείωσε σημαντικά την ανάπτυξη συμπτωμάτων της ασθένειας που σχετίζονται με τον ωομύκητα *Phytophthora infestans* (Χατζόπουλος, 2001). Οι πρωτεΐνες PR-12, PR-13 και PR-14 συμβάλλουν στη διάσπαση βακτηριακών και μυκητιακών μεμβρανών. Η πρωτεΐνη PR-9 συμβάλει στην ενδυνάμωση των φυτικών κυττάρων, ενώ η πρωτεΐνη PR-7 προκαλεί αποδιοργάνωση των πρωτεϊνών των κυτταρικών τοιχωμάτων, καθώς και υδρόλυση της χιτίνης και γλουκάνης των μυκήτων (Τζάμος, 2007). Οι πρωτεΐνες PR-2, PR-3, PR-4, PR-8 και PR-11 λειτουργούν κυρίως ως χιτινάσες και ως β-1,3-γλυκανάσες, με σκοπό την αποικοδόμηση του κυτταρικού τοιχώματος των φυτοπαθογόνων μυκήτων (Van Loon & Van Strien, 1999).

1.4.8 Ριζοσφαιρικά βακτήρια - ISR

Τα ριζοβακτήρια (Plant Growth Promoting Rizobacteria, PGPR) είναι βακτήρια που αποικίζουν την ριζόσφαιρα των φυτών. Ορισμένα PGPR έχουν την ικανότητα είτε να επιδρούν στην ανάπτυξη των φυτών, είτε να τα προστατεύουν από φυτοπαθογόνα (Sraepen et al., 2009). Τα PGPR ανήκουν σε πολλά και διαφορετικά γένη βακτηρίων όπως *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Azotobacter*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, εκ των οποίων τα γένη *Bacillus* και *Pseudomonas* αποτελούν τα σημαντικότερα.

Οι μηχανισμοί δράσης των ριζοβακτηρίων μπορεί να είναι άμεσοι και έμμεσοι και περιλαμβάνουν την έκκριση φυτοορμονών (όπως ινδολοξικό οξύ, κυτοκινίνες, γιββερελλίνες), τη δέσμευση και παροχή ελεύθερου N₂, τη διαλυτοποίηση αδιάλυτων μορφών P στο έδαφος, τον ανταγωνισμό για χώρο και θρεπτικά συστατικά, την παραγωγή αντιβιοτικών, την αυξημένη απορρόφηση Fe λόγω παραγωγής σιδηροφόρων, την παραγωγή λυτικών ενζύμων (πχ. χιτινάση) και την επαγωγή της διασυστηματικής αντοχής (ISR) (Sraepen et al., 2009).

Η επαγόμενη διασυστηματική αντοχή (ISR) προκαλείται από τα ριζοβακτήρια τα οποία αποικίζουν τις ρίζες του φυτού. Η «ανοσοποίηση» (ISR) με τα αυξητικά ριζοσφαιρικά βακτήρια εκδηλώνεται ως καθυστέρηση στην έκφραση των συμπτωμάτων και μείωση στη ένταση και εξέλιξη της ασθένειας με παράλληλη ενεργοποίηση μηχανισμών που συμβάλλουν στη διασυστηματική προστασία των φυτών εναντίον φυτοπαθογόνων μυκήτων, βακτηρίων και ιών (Τζάμος, 2007). Κατά την ISR έχει βρεθεί ότι ενεργοποιούνται στο φυτό διάφοροι μηχανισμοί όπως η σύνθεση PR πρωτεϊνών, η παραγωγή φυτοαλεξινών η ενίσχυση κυτταρικών τοιχωμάτων (Hammond-Kosack & Jones, 1996).

1.5 Σκοπός της μελέτης

Η αλατότητα αποτελεί έναν αβιοτικό παράγοντα που επηρεάζει πολλές πτυχές του φυτικού μεταβολισμού και αποτελεί σημαντική απειλή για τη γεωργία και τη γονιμότητα του εδάφους. Οι δυσμενείς επιπτώσεις που προκαλεί στη φυσιολογία των φυτών μειώνουν την αξία της καλλιέργειας και της γεωργική βιωσιμότητα της πληγείσας γης. Ο μύκητας *V. dahliae*, αποτελεί ένα βιοτικό παράγοντα που προσβάλλει πάνω από 200 είδη ξενιστών όπως δενδρώδεις καλλιέργειες, κηπευτικά και αυτοφυή φυτά. Είναι ένας φυτοπαθογόνος μύκητας που προσβάλλει το αγγειακό σύστημα των φυτών και μπορεί δύσκολα να αντιμετωπιστεί λόγω του μεγάλο εύρους ξενιστών του και την ικανότητά του να επιβιώνει στο έδαφος για αρκετά χρόνια. Τη στιγμή που η ανάγκη για παραγωγή τροφίμων αυξάνεται συνεχώς, οι σχετικά περιορισμένοι τρόποι αντιμετώπισης των δύο αυτών παραγόντων καθιστά αναγκαία την έρευνα για εύρεση εναλλακτικών μεθόδων καταπολέμησής τους.

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε η μελέτη της φυτοπροστατευτικής δράσης 13 βακτηριακών στελεχών, τα οποία είχαν απομονωθεί από τη ριζόσφαιρα αλοφύτων της περιοχής της Ραφήνας, έναντι των δυσμενών επιδράσεων που προκαλεί το NaCl και ο φυτοπαθογόνος μύκητας *V. dahliae*. Αρχικά, πραγματοποιήθηκαν *in vitro* πειράματα εκτίμησης των ιδιοτήτων των απομονωμένων μικροοργανισμών. Συγκεκριμένα εξετάστηκε η ικανότητα των μικροοργανισμών να ανταγωνίζονται το μύκητα *V. dahliae*, η ικανότητά τους να διαλυτοποιούν το φώσφορο, να παράγουν ινδολοξικό οξύ (IAA) και χιτινάση. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκαν 4 πειράματα *in planta* για τη διερεύνηση πιθανής φυτοπροστατευτικής δράσης στους δύο παράγοντες καταπόνησης και τη διερεύνηση πιθανής βιοδιεγερτικής δράσης των βακτηρίων.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Βιολογικό υλικό

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν σαν βιολογικό υλικό οι μικροοργανισμοί:

- Τα βακτηριακά στελέχη Raf 1, Raf 2, Raf 3, Raf 4, Raf 5, Raf 6, Raf 7, Raf 8, Raf 11, Raf 14, Raf 15, Raf 16, Raf 19 τα οποία είχαν απομονωθεί από τη ριζόσφαιρα αλοφύτων της περιοχής της Ραφήνας, Ανατολική Αττική
- Ο φυτοπαθογόνος μύκητας: *Verticillium dahliae*

Φυτικό υλικό

Το φυτικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε ήταν σπόροι τομάτας της ποικιλίας Moneymaker. Η σπορά τους έγινε σε γλαστράκια διαμέτρου 7x7x6 τα οποία περιείχαν φυτόχωμα.

Εργαστηριακά υλικά

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν τα εξής εργαστηριακά υλικά:

Στερεό θρεπτικό υλικό με εκχύλισμα πατάτας (Potato Dextrose Agar)

Για 1lt PDA χρησιμοποιούνται:

1 lt απεσταγμένο νερό

200 gr καθαρισμένη πατάτα

20 gr γλυκόζη

20 gr άγαρ

Υγρό θρεπτικό υλικό με εκχύλισμα πατάτας (Potato Dextrose Broth)

Για 1lt PDB χρησιμοποιούνται:

1 lt απεσταγμένο νερό

20 gr γλυκόζη

6,5 gr εκχυλίσματος πατάτας

Θρεπτικό υγρό SSN

Για 1lt SSN χρησιμοποιούνται:

15 gr Σακχαρόζη

2 gr NaNO_3

1 gr KH_2PO_4

0,5 gr $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

0,5 gr KCl

1 ml Ιχνοστοιχεία

Θρεπτικό υγρό NG

Για 1lt NG χρησιμοποιούνται:

1lt απεσταγμένο νερό

8gr Nutrient broth (θρεπτικός ζωμός)

20 gr γλυκερόλη

Στερεό θρεπτικό μέσο Pikovskaya (PVK agar)

Για 1lt PVK χρησιμοποιούνται:

10 gr γλυκόζη D+

5 gr $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$

0,5 gr $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

0,1 gr $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

0,2 gr KCl

0,5 gr εκχυλίσματος ζυμομύκητα

0,002 g $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

0,002 gr $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

15 gr άγαρ

Θρεπτικό υλικό χιτίνης

0,45-0,5% (w/v) χιτίνης

0,03% (w/v) $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

0,3% (w/v) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

0,2% (w/v) KH_2PO_4

0,1% (w/v) μονοένυδρο κιτρικό οξύ

0,02% (v/v) Tween-80

0,05% (w/v) εκχυλίσματος ζυμομύκητα

0,015% (w/v) βρωμοκρεσόλη μωβ

15% άγαρ

Το pH του διαλύματος ρυθμίζεται σταθερό στο 4,7

Όλα τα θρεπτικά υλικά μετά την κατασκευή τους αποστειρώνονται στους 120 °C σε υγρό κλίβανο, με πίεση 1 atm για 20 min.

2.1 Καλλιέργεια και ανάπτυξη των βακτηρίων Raf

Αρχικά έγινε μεταφορά και ενεργοποίηση των βακτηρίων από τους -80 °C σε τρυβλία Petri με υλικό PDA, με την μέθοδο της γραμμικής διασποράς χρησιμοποιώντας βακτηριολογικό κρίκο, υπό ασηπτικές συνθήκες. Η καλλιέργεια των βακτηρίων πραγματοποιήθηκε σε σκοτεινό επωαστικό θάλαμο με σταθερή θερμοκρασία 28 °C για 2 ημέρες.



Εικόνα 2.1. Η ανάπτυξη του βακτηριακού στελέχους Raf 4, σε τρυβλίο Petri

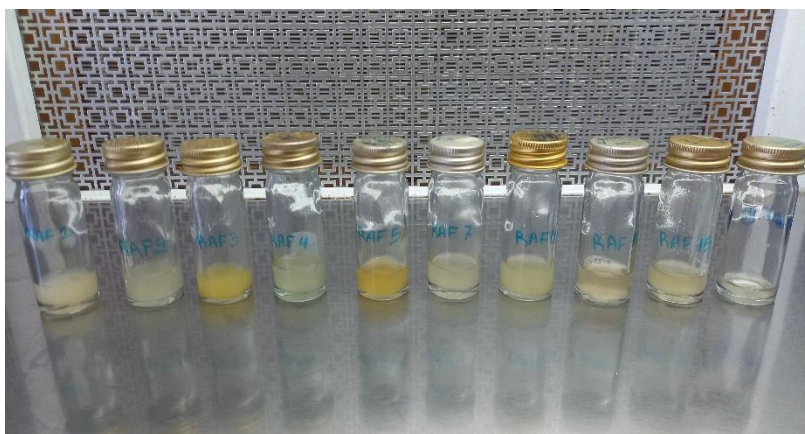
Στη συνέχεια, τα βακτήρια μεταφέρθηκαν και καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο PDB. Η μεταφορά τους πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας νυστέρι και βελόνα τα οποία αποστειρωνόταν συνεχώς κατά τη διάρκεια της εργασίας με εμβάπτιση σε οινόπνευμα και στη συνέχεια κάψιμο σε φλόγα. Ειδικότερα, με τη χρήση νυστεριού έγινε κοπή τεμαχίων θρεπτικού υλικού (PDA) από κάθε βακτηριακή καλλιέργεια και με τη χρήση βελόνας έγινε τοποθέτησή τους σε κωνικές φιάλες με 10 ml PDB η κάθε μία, ώστε να χρησιμοποιηθούν στο πείραμα παθογένειας *in planta*. Επίσης τα βακτήρια με τη χρήση του βακτηριακού κρίκου μεταφέρθηκαν από τα PDA σε σωληνάρια τύπου falkon με 10 ml υγρό θρεπτικό μέσο NG, ώστε να χρησιμοποιηθούν στα *in vitro* πειράματα εκτίμησης ιδιοτήτων τους. Οι φιάλες και τα falkon με τα βακτήρια τοποθετήθηκαν σε περιστροφικό επωαστικό θάλαμο στους 25°C και στις 140 r.p.m. για 2 ημέρες ώστε να αναπτυχθούν οι μικροοργανισμοί.



Εικόνα 2.2 Μεταφορά του βακτηριακού στελέχους Raf 15, από τρυβλίο Petri, σε θρεπτικό μέσο PDB.



Εικόνα 2.3. Οι κωνικές φιάλες με θρεπτικό μέσο PDB στις οποίες τοποθετήθηκαν τα 10 βακτηριακά στελέχη.



Εικόνα 2.4. Η ανάπτυξη των 10 βακτηριακών στελεχών σε falkon με θρεπτικό μέσο NG, 2 ημέρες μετά τη μεταφορά τους.

2.2 *In vitro* ανταγωνισμός απομονωμένων μικροοργανισμών έναντι του μύκητα *Verticillium dahliae*

Με την βοήθεια βακτηριακού κρίκου, ο οποίος αποστειρωνόταν συνεχώς κατά τη διάρκεια της εργασίας, λήφθηκαν 10 μικροοργανισμοί Raf από τα falcon με NG και απλώθηκαν σε τρυβλία PDA κάνοντας μια οριζόντια γραμμή πάνω στο θρεπτικό υλικό. Απέναντι από κάθε μικροοργανισμό τοποθετήθηκε ένα μυκηλιακό τεμάχιο από ένα τρυβλίο που περιείχε ανεπτυγμένο μύκητα *V. dahliae*. Μετά την επώαση των τρυβλίων και την εξάπλωση των μυκήτων στο θρεπτικό μέσο, παρατηρήθηκαν τυχόν ζώνες παρεμπόδισης και με τη χρήση του προγράμματος Image J, μετρήθηκε η ανάπτυξη του μύκητα σε κάθε εφαρμογή.

2.3 Πειράματα Εκτίμησης Ιδιοτήτων των Απομονωμένων Μικροοργανισμών

2.3.1 Εκτίμηση Ικανότητας Διαλυτοποίησης Φωσφόρου

Η ικανότητα των βακτηρίων να διαλυτοποιούν P εξετάστηκε με τη δημιουργία διάφανης άλου κατά την ανάπτυξή τους στο στερεό θρεπτικό μέσο Pikovskaya (PVK agar) (Pikovskaya, 1948). Η δημιουργία διαφανής άλου γύρω από την αποικία του εκάστοτε του βακτηρίου υποδηλώνει τη διαλυτοποίηση του ιζηματοποιημένου φωσφόρου μορφής $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ που περιέχει το θρεπτικό μέσο.

Αρχικά παρασκευάστηκε το θρεπτικό μέσο PVK και έπειτα πραγματοποιήθηκε η στρώση του σε τρυβλία Petri. Τα τρυβλία εμβολιάστηκαν από υγρή καλλιέργεια PDB κάθε απομόνωσης. Οι καλλιέργειες των δειγμάτων επώαστηκαν σε θάλαμο στους 28°C. Τέσσερις ημέρες μετά από τον εμβολιασμό καταμετρήθηκαν το χαρακτηριστικό διάφανο στεφάνι διαλυτοποίησης και η διάμετρος της αποικίας. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως αποδοτικότητα διαλυτοποίησης σύμφωνα με τους Nguyen et al., (1992) όπου:

$$A\Delta = \frac{\text{διάμετρος στεφάνης διαλυτοποίησης} \times 100}{\text{διάμετρος ανάπτυξης}}$$

2.3.2 Εκτίμηση Ικανότητας Παραγωγής Ινδολοξικού Οξέος (IAA)

Τα βακτήρια ελέγχθηκαν για την ικανότητά τους να παράγουν την αυξίνη ινδολοξικό οξύ (IAA). Ποσότητα 10 μl υγρής βακτηριακής καλλιέργειας 18-20 ωρών τοποθετήθηκε σε UM θρεπτικό στο οποίο προστέθηκε L-tryptophane (0,1% w/v). Η τρυπτοφάνη εμβολιάστηκε στο θρεπτικό μέσο Universal medium. Οι υγρές βακτηριακές καλλιέργειες επωάστηκαν στους 28 °C για 72 ώρες. Έπειτα, 1 ml από κάθε βακτηριακή καλλιέργεια φυγοκεντρήθηκε για 5 λεπτά στις 10000 στροφές. Στη συνέχεια 500μl υπερκειμένου τοποθετήθηκε σε πλαστικό σωλήνα και προστέθηκαν 200μl αντιδραστηρίου Salkowski (0,5 M FeCl₃ 6H₂O σε 35% HClO₄) σε αναλογία 1:1. Οι σωλήνες μεταφέρθηκαν σε χώρο με συνθήκες σκότους και θερμοκρασία δωματίου, για 20 λεπτά προκειμένου να σταθεροποιηθεί το χρώμα, το οποίο κυμαίνεται από σκούρο κόκκινο, βιολετί ως ροζ.

2.3.3 Εκτίμηση παραγωγής χιτινάσης

Για την εκτίμηση παραγωγής χιτινάσης ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία. Βασικό θρεπτικό μέσο ανίχνευσης χιτινολυτικής δράσης, εμπλουτίστηκε με χιτίνη (4.5g/L) και bromocresol purple (0.15g/L). Αυτό οδήγησε το θρεπτικό μέσο να αποκτήσει κίτρινο χρώμα. Δεσμοί υδρογόνου αναπτύσσονται μεταξύ της χιτίνης και της χρωστικής, οι οποίοι επάγονται από το διαχωρισμό των μορίων του πολυσακχαρίτη του υδροχλωρικού οξέος. Αλλαγή στο χρώμα του υποστρώματος (από κίτρινο σε μωβ) μαρτυρά την ύπαρξη χιτινολυτικής δραστηριότητας των μικροοργανισμών (Tahtamouni et al., 2006). Με τη μορφή σταγόνας 25 μl από το απομονωμένο εναιώρημα τοποθετήθηκαν στο κέντρο των τρυβλίων. Παρέμειναν και επωάστηκαν στους 28 °C για 10 ημέρες.

2.4 Ριζοπότισμα των βακτηρίων στα φυτά

Η μεταφορά των βακτηρίων στα φυτά πραγματοποιήθηκε όταν αυτά έφεραν 2-4 πραγματικά φύλλα. Ειδικότερα, με τη χρήση σύριγγας, χορηγήθηκε εξωγενώς με ριζοπότισμα, 10 ml βακτηριακού αιωρήματος σε κάθε φυτό. Τα βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν είχαν αναπτυχθεί σε περιστροφικό επωαστικό θάλαμο στους 25 °C και στις 140 r.p.m. για 2 ημέρες, πριν την μεταφορά τους.



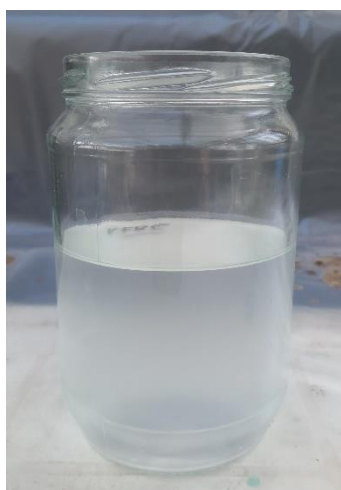
Εικόνα 2.5. Τα 10 βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν για το ριζοπότισμα των φυτών.



Εικόνα 2.6. Η χορήγηση των βακτηριακών στελεχών, με ριζοπότισμα, με τη χρήση σύριγγας.

2.5 Καταπόνηση φυτών με NaCl

Δεδομένου ότι το κάθε γλαστράκι περιέχει 130g φυτοχώματος, ποσότητα 260g NaCl διαλύθηκε σε 1L νερό. Το μείγμα αναδεύτηκε καλά και χορηγήθηκε στα φυτά 7 ημέρες μετά το ριζοπότισμα των βακτηρίων. Ειδικότερα, με τη χρήση σύριγγας, χορηγήθηκε εξωγενώς με ριζοπότισμα, 10 ml από το αλατούχο μείγμα, σε κάθε φυτό.



Εικόνα 2.7. Το αλατούχο μείγμα που χρησιμοποιήθηκε για το στρεσάρισμα των φυτών.



Εικόνα 2.8. Η χορήγηση του αλατούχου μείγματος, με ριζοπότισμα, με τη χρήση σύριγγας.

2.6 Καλλιέργεια και ανάπτυξη του φυτοπαθογόνου μύκητα *V. dahliae*

Αρχικά έγινε μεταφορά, υπό ασηπτικές συνθήκες, ενός ή δύο κεραμικών χαντρών που περιείχαν το μύκητα *V. dahliae* και φυλάσσονταν στους -80 °C, σε τρυβλία με θρεπτικό υπόστρωμα PDA. Στη συνέχεια ακολούθησε καλλιέργεια του φυτοπαθογόνου μύκητα σε σκοτεινό επωαστικό θάλαμο με σταθερή θερμοκρασία 28°C για 7 ημέρες. Όταν η επιφάνεια του τρυβλίου καλύφθηκε σε μεγάλο βαθμό από βερτισίλλιο, με τη χρήση νυστεριού και βελόνας, υπό ασηπτικές συνθήκες, μικρά κομμάτια του μυκηλίου μεταφέρθηκαν σε κωνική φιάλη που περιείχε θρεπτικό υγρό SSN. Ύστερα, η φιάλη τοποθετήθηκε σε περιστροφικό επωαστικό θάλαμο (orbital shaker) στους 25 °C και στις 140 r.p.m. για 5 ημέρες. Μετά από αυτή τη χρονική διάρκεια, οι κωνικές φιάλες με το φυτοπαθογόνο μύκητα σχημάτισαν αιώρημα κονιδίων μαζί με μυκήλιο.



Εικόνα 2.9. Το ανεπτυγμένο μυκήλιο *V.dahliae*, 5 ημέρες μετά τη μεταφορά του σε θρεπτικό υγρό SSN.

2.7 Υπολογισμός του όγκου του μολύσματος

- Για την μέτρηση της συγκέντρωσης του μολύσματος και τον υπολογισμό του κατάλληλου όγκου, το μόλυσμα φιλτραρίστηκε σε ποτήρι ζέσεως και αναδεύτηκε ώστε να επιτευχθεί ομοιόμορφη κατανομή κονιδίων στο αιώρημα.
- Με τη χρήση πιπέτας, έγινε παραλαβή 1 ml από το αιώρημα και μεταφέρθηκε σε σωλήνα Falcon που περιείχε 9 ml νερό, για να γίνει η πρώτη δεκαδική αραιώση.
- Ακολούθησε ανάδευση και επανάληψη της διαδικασίας σε νέο σωλήνα Falcon, ώστε να επιτευχθεί η δεύτερη δεκαδική αραιώση.

- Από το τελευταίο Falcon τοποθετήθηκε μία σταγόνα 25 μl σε ειδική αντικειμενοφόρο πλάκα μέτρησης των κονιδίων (κυτταρόμετρο) και πραγματοποιήθηκε μέτρηση των κονιδίων στα τετραγωνάκια του κυτταρόμετρου με τη χρήση μικροσκοπίου Carl Zeiss. Ο υπολογισμός των κονιδίων / ml του μολύσματος έγινε με τη χρήση του τύπου :

$$C_1 = \frac{\text{ΜΟ αριθμό κονιδίων σε (x) τετράγωνα}}{4 \times 10^{-6}}$$

- Η τιμή που βρέθηκε από τον παραπάνω τύπο πολλαπλασιάστηκε με 10^2 για να υπολογιστεί ο αριθμός των κονιδίων/ml στο αιώρημα πριν τις δύο δεκαδικές αραιώσεις.
- Μέσω του τύπου της αραιώσης $C_1V_1 = C_2V_2$ υπολογίστηκαν τα ml του αρχικού διαλύματος (V_1) που πρέπει να προστεθούν έτσι ώστε στον τελικό όγκο (V_2) η συγκέντρωση των κονιδίων/ml να είναι 10^7 (πρότυπη συγκέντρωση του μολύσματος για μόλυνση). Με V_2 συμβολίζεται ο τελικός όγκος μολύσματος που θα χρησιμοποιηθεί για τη μόλυνση των φυτών.
- Τέλος, μέσω της αφαίρεσης ($V_2 - V_1$) υπολογίστηκε ο όγκος του νερού που πρέπει να προστεθεί έτσι ώστε να προκύψει ο τελικός όγκος V_2 .



Εικόνα 2.10.
Μέτρηση των
κονιδίων σε ειδική
αντικειμενοφόρο
πλάκα με τη χρήση
μικροσκοπίου Carl
Zeiss.

2.8 Μόλυνση των φυτών με το μύκητα *V. dahliae*

Η μόλυνση των φυτών με το φυτοπαθογόνο μύκητα έγινε 7 ημέρες μετά το ριζοπότισμα των βακτηρίων. Ειδικότερα, με τη χρήση σύριγγας, χορηγήθηκε εξωγενώς με ριζοπότισμα, 10^7 κονίδια / ml από το υγρό μόλυσμα, σε κάθε φυτό.

2.9 Καταμέτρηση συμπτωμάτων ασθένειας

Η καταγραφή των συμπτωμάτων της ασθένειας για το πρώτο πείραμα, διήρκησε από την ένατη έως και την εικοστή έβδομη ημέρα από τη μόλυνση με το φυτοπαθογόνο μύκητα. Στο δεύτερο πείραμα της αλατότητας, οι μετρήσεις διενεργήθηκαν 3 ημέρες μετά την καταπόνηση των φυτών μέχρι τον τελικό μαρασμό τους. Κατά την καταγραφή των συμπτωμάτων της ασθένειας, σημειωνόταν για κάθε φυτό ξεχωριστά, ο αριθμός των ασθενών φύλλων προς το σύνολο των πραγματικών φύλλων.



Εικόνα 2.11. Χλώρωση των φύλλων που προκαλεί ο μύκητας *V. dahliae*.



Εικόνα 2.12. Νέκρωση των φύλλων που προκαλεί το NaCl.

2.10 Υπολογισμός του σχετικού εμβαδού της ασθένειας (relative AUDPC)

Και στα δύο πειράματα, το εμβαδόν ασθένειας (relative Area Under Disease Progress Curve, rAUDPC), υπολογίστηκε με βάση το άθροισμα των εμβαδών των τραπεζίων που σχηματίζονται κάτω από την καμπύλη εξέλιξης των συμπτωμάτων της ασθένειας. Προκειμένου να εκφραστεί το εμβαδόν ασθένειας σε ποσοστό επί της εκατό της μέγιστης τιμής AUDPC, διαιρέθηκε με το εμβαδόν ασθένειας το σύνολο των ημερών που διήρκεσε η καταγραφή των συμπτωμάτων της ασθένειας. Ακολούθως, οι τιμές αυτές πολλαπλασιάστηκαν επί της εκατό, υπολογίζοντας έτσι το σχετικό ποσοστό ασθένειας (relative AUDPC). Στις τιμές του σχετικού εμβαδού ασθένειας εφαρμόστηκε ανάλυση διασποράς (ANOVA). Στην παρούσα μελέτη εφαρμόστηκε ο έλεγχος ελάχιστης σημαντικής διαφοράς του Fisher ($p \leq 0,05$).

2.11 Προσδιορισμός των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων *PR-1* και *Pin2*

2.11.1 Συλλογή φυτικών δειγμάτων

Για τον προσδιορισμό της έκφρασης των γονιδίων *PR-1* και *Pin2* πραγματοποιήθηκε συλλογή δειγμάτων την 3^η και την 7^η ημέρα μετά από τη μόλυνση με το μύκητα *V. dahliae*. Ειδικότερα, από 5-6 φυτά κάθε εφαρμογής αφαιρέθηκαν με τη χρήση ψαλιδιού τμήμα του ελάσματος των φύλλων. Αμέσως μετά τη συλλογή τους, τα δείγματα τυλίχθηκαν με αλουμινόχαρτο και τοποθετήθηκαν σε υγρό άζωτο, προκειμένου να παραμείνει αναλλοίωτο το περιεχόμενο των φυτικών κυττάρων κατά τη μεταφορά τους από το θερμοκήπιο στο εργαστήριο. Τα δείγματα αποθηκεύονταν στους -80 °C και όταν ολοκληρώθηκε η συλλογή τους πραγματοποιήθηκε το πρωτόκολλο απομόνωσης RNA.



Εικόνα 2.13. Τοποθέτηση των δειγμάτων σε αλουμινόχαρτο, σε υγρό άζωτο, προκειμένου να χρησιμοποιηθούν στο πρωτόκολλο απομόνωσης RNA.

2.11.2 Απομόνωση RNA

Η απομόνωση του RNA των φυτών πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο PMI (Zipfel Lab), το οποίο ύστερα από κατάλληλες τροποποιήσεις ήταν το εξής:

- Κονιορτοποίηση των δειγμάτων σε πορσελάνινο γουδί με υγρό άζωτο μέχρι να μετατραπεί σε πούδρα και μεταφορά 100mg σε σωληνάρια τύπου erpedorf
- Προσθήκη 400μl διαλύματος λύσης κυττάρων (Cell lysis solution) σε κάθε erpedorf
- Χρήση vortex για 20 sec για έντονη ανάμειξη και ύστερα ανάμειξη με αναστροφή του erpedorf για 5 min
- Προσθήκη 133 μl προψυγμένου στον πάγο διαλύματος protein-DNA precipitation solution και ανάμειξη με ελαφρά ανακίνηση του erpedorf
- Επώαση σε πάγο (4 °C) για 10 min
- Φυγοκέντρηση για 20 min σε ταχύτητα 14.000 rpm και σε θερμοκρασία 4 °C
- Μεταφορά υπερκείμενου (300μl) σε erpedorf. Εάν υπάρχουν υπολείμματα μετά την μεταφορά, πραγματοποιείται εκ νέου φυγοκέντρηση για 5 min στις 14.000 rpm και μεταφορά σε καινούριο erpedorf
- Προσθήκη 300 μl (ίσης με το υπερκείμενο) ισοπροπανόλης και ομογενοποίηση με ελαφρά ανακίνηση του erpedorf
- Επώαση στον πάγο για 10 min
- Φυγοκέντρηση για 10 min σε ταχύτητα 14.000 rpm και σε θερμοκρασία 4 °C
- Απομάκρυνση του υπερκείμενου και πλύσιμο ιζήματος με 300 μl αιθανόλης 70%
- Φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm για 1 min στους 4 °C
- Απομάκρυνση υπερκείμενου
- Επαναιωρηματοποίηση του ιζήματος σε 25μl αποστειρωμένου H₂O και ομογενοποίηση με ελαφρά ανακίνηση του erpedorf



Εικόνα 2.14. Κονιορτοποίηση των δειγμάτων σε πορσελάνινο γουδί με τη χρήση υγρού αζώτου.



Εικόνα 2.15. Προσθήκη του διαλύματος *protein-DNA precipitation solution* στα *errpedorf* με τα δείγματα, με τη χρήση πιπέτας.

2.11.3 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης του RNA

Για να υπολογιστεί η συγκέντρωση του RNA και να εκτιμηθεί η ποιότητα και η καθαρότητα του απομονωμένου υλικού, χρησιμοποιήθηκε το φασματοφωτόμετρο NanoDrop. Η απορρόφηση στα 260 nm μετράει τη συγκέντρωση του RNA και η απορρόφηση στα 280 nm μετράει τις δευτερεύουσες ουσίες που απομονώθηκαν μαζί με το RNA (πχ. πρωτεΐνες). Ο λόγος 260/280 αποτελεί μέτρηση της καθαρότητας του δείγματος RNA και όσο περισσότερο προσεγγίζει το 2 τόσο υψηλότερη είναι η καθαρότητά του.



Εικόνα 2.16. Προσδιορισμός της συγκέντρωσης του RNA με τη χρήση φασματοφωτομέτρου NanoDrop.

2.11.4 Καταστροφή υπολειμμάτων DNA

Έγινε καθαρισμός των δειγμάτων από DNA με την χρήση DNase I σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Πιο συγκεκριμένα:

- Σε κάθε δείγμα προστέθηκε 1μl DNase I (1unit/μl) και 3 μl buffer
- Τα δείγματα τοποθετήθηκαν για επώαση σε θερμοκρασία 37 °C για 10min ώστε να δράσει η DNase I
- Σε κάθε δείγμα προστέθηκε 0,5μl EDTA (το EDTA δεσμεύει όλα τα ιόντα που λειτουργούν ως συμπράγοντες του ενζύμου DNase I)
- Τα δείγματα επώαστηκαν σε υδατόλουτρο στους 75 °C για 10 min ώστε να απενεργοποιηθεί η DNase I

2.11.5 Σύνθεση cDNA

- Η σύνθεση του cDNA σύμφωνα με τις οδηγίες του παρασκευαστή έγινε ως εξής:
- Το RNA του κάθε δείγματος αραιώθηκε με δισαποσταγμένο και αποστειρωμένο νερό μέχρι τελικό όγκο 19,5μl
- Ακολούθησε η παρασκευή του Takara mix
- Τοποθετήθηκαν 10,5μl από το Takara mix στο κάθε δείγμα για τελικό όγκο 30μl
- Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε υδατόλουτρο σε θερμοκρασία 37 °C για 15min
- Τέλος, τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε Heat Block σε θερμοκρασία 85 °C για 5min και αποθηκεύτηκαν στους -80 °C.



Εικόνα 2.17. Τοποθέτηση των δειγμάτων σε υδατόλουτρο στους 37 °C.



Εικόνα 2.18. Τοποθέτηση των δειγμάτων σε Heat Block στους 85 °C

Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε στις εξής συνθήκες:

	Χρόνος	Θερμοκρασία (°C)	Αποτέλεσμα
Στάδιο 1	15 min	37	Υβριδισμός νουκλεοτιδίων θυμίνης με την ουρά πολύ-αδενίνης του mRNA και επιμήκυνση της cDNA αλυσίδας.
Στάδιο 2	5 min	85	Τερματισμός της αντίδρασης. Απενεργοποίηση της αντίστροφης μεταγραφάσης.

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν:

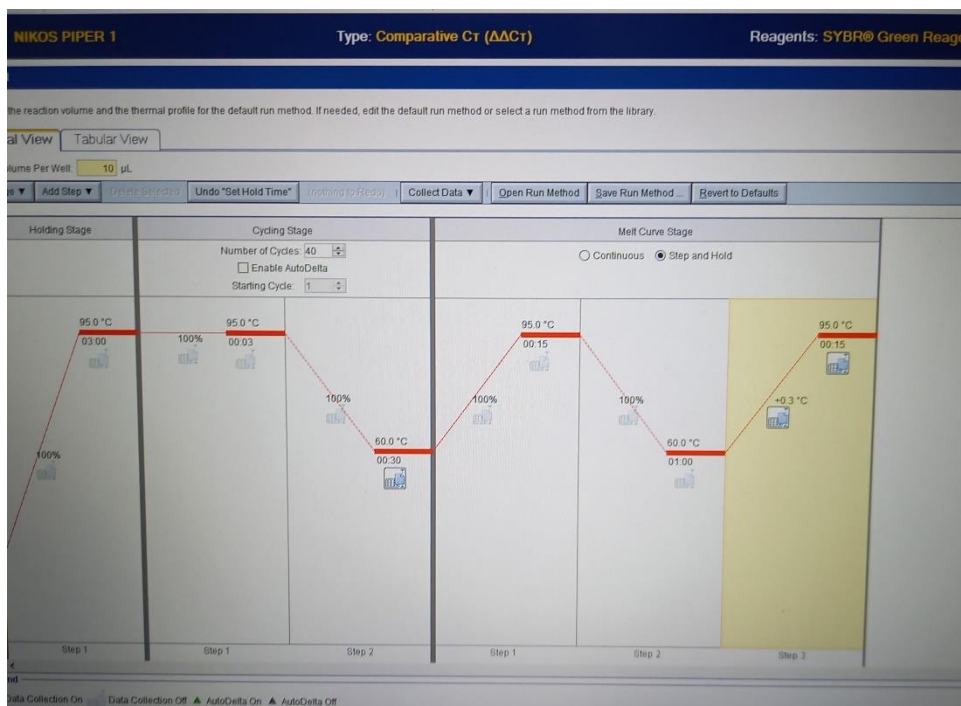
Αντιδραστήρια (Takara mix)	Όγκος
5x Prime Script Buffer	6 μl
Random 6mers	1,5 μl
Oligo(dT)20 primer	1,5 μl
Prime Script RT enzyme	1,5 μl

2.11.6 Εφαρμογή RT-qPCR

Η Real time-quantitative PCR (qPCR), εφαρμόστηκε για τον καθορισμό του επιπέδου μεταγραφής των υπό μελέτη γονιδίων *PR1* και *PIN2* στην τομάτα. Η RT-PCR έγινε σε θερμοκυκλοποιητή της Stratagene Mx 3005PTM και για τις αντιδράσεις ενίσχυσης χρησιμοποιήθηκαν τα αντιδραστήρια (master mix KAPA SYBR Fast Universal qPCR kit) της εταιρίας KAPABiocystem.



Εικόνα 2.19. Εφαρμογή Real time-quantitative PCR (qPCR).



Εικόνα 2.20. Απεικόνιση των σταδίων της RT-qPCR στην οθόνη του συνδεδεμένου ηλεκτρονικού υπολογιστή.

Οι συνθήκες της αντίδρασης της RT-PCR περιγράφονται στον παρακάτω πίνακα:

	Χρόνος	Θερμοκρασία (°C)	Αποτέλεσμα
Στάδιο 1	3 min	95	Ενεργοποίηση της Taq DNA πολυμεράσης
Στάδιο 2 (επανάληψη για 40 κύκλους)	3 sec	95	Αποδιάταξη DNA
	30 sec	60	Υβριδισμός εκκινητών/Επιμήκυνση αλυσίδας
Στάδιο 3	1 min	95	Δημιουργία της καμπύλης διαχωρισμού των προϊόντων της RT-PCR (Dissociation curve)
	30 sec	60	
	30 sec	95	

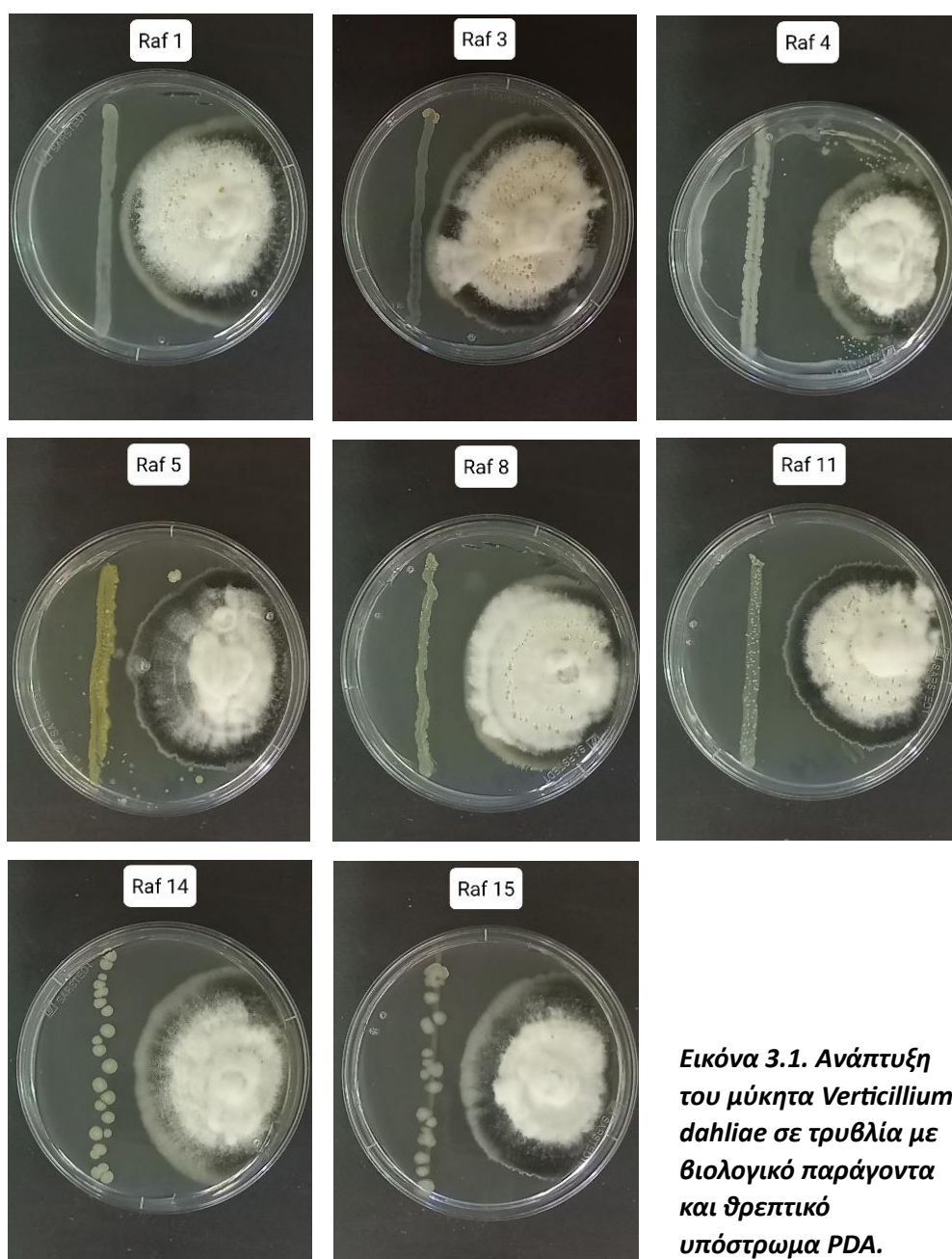
Τα ζεύγη εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη έκφρασης των γονιδίων στην τομάτα δίνονται στο παρακάτω πίνακα:

Γονίδιο στόχος	Ζεύγος εκκινητών	Αναφορά
<i>PR1</i>	5'-GAGGGCAGCCGTGCAA-3' 5'-CACATTTTCCACCAACACATTG-3'	Block et al., 2005
<i>PIN2</i>	5'-TGATGCCAAGGCTTGACTAGAGA-3' 5'-AGCGGACTTCCTTCTGAACGT-3'	Herman et al., 2008
<i>ACTIN</i>	5'-TTGCCGCATGCCATTCT-3' 5'-TCGGTGAGGATATTCATCAGGT-3'	Herman et al., 2008

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

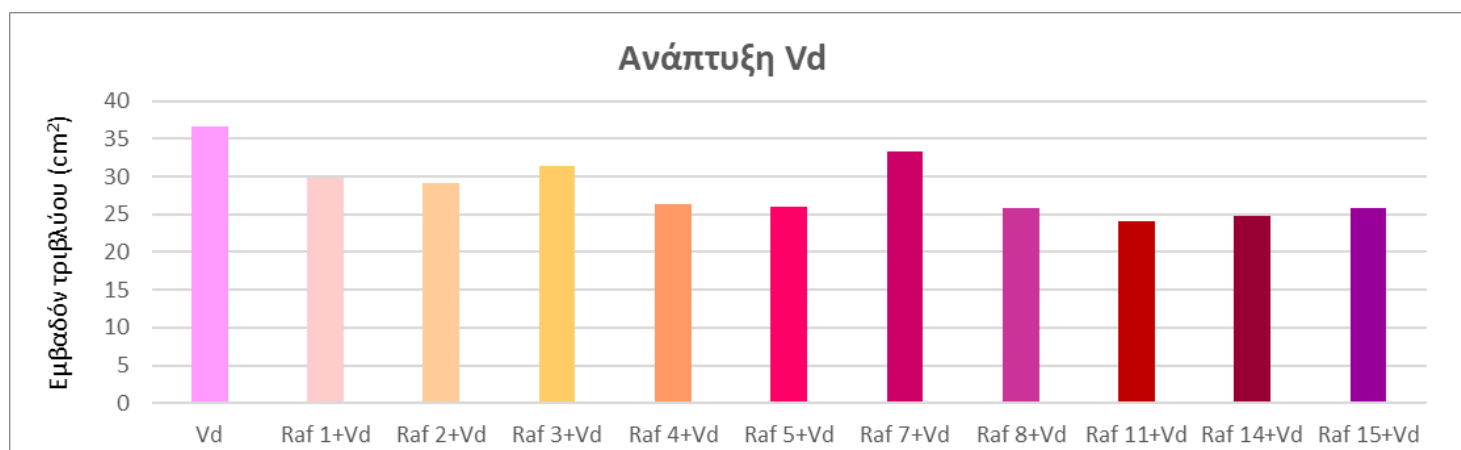
3.1 *In vitro* πειράματα ανταγωνισμού

Στην Εικόνα 3.1 φαίνεται η ανάπτυξη του μύκητα *Verticillium dahliae* σε τρυβλία μαζί με τους μικροοργανισμούς Raf 1, Raf 3, Raf 4, Raf 5, Raf 8, Raf 11, Raf 14, και Raf 15. Για κάθε εφαρμογή πραγματοποιήθηκαν 3 επαναλήψεις. Εξετάστηκε εάν η ανάπτυξη του φυτοπαθογόνου μύκητα επηρεάστηκε από κάποια δραστηριότητα βιολογικού παράγοντα στο θρεπτικό μέσο.



Εικόνα 3.1. Ανάπτυξη του μύκητα *Verticillium dahliae* σε τρυβλία με βιολογικό παράγοντα και θρεπτικό υπόστρωμα PDA.

Δεν παρατηρήθηκε κάποια εμφανή ζώνη παρεμπόδισης, αλλά η ανάπτυξη υφών στις εφαρμογές Raf 4, Raf 5, Raf 8, Raf 11, Raf 14 και Raf 15 περιορίστηκε σε σχέση με τις υπόλοιπες εφαρμογές και σε σχέση με τον μάρτυρα. Η μείωση αυτή της ανάπτυξης του μύκητα μπορεί να οφείλεται στην ύπαρξη αντιβιοτικών ενώσεων που ελευθερώθηκαν στο θρεπτικό υπόστρωμα (PDA), κατά την μικροβιακή δραστηριότητα του αντίστοιχου βιολογικού παράγοντα. Στον παρακάτω πίνακα απεικονίζονται τα αποτελέσματα των μετρήσεων της ανάπτυξης του μύκητα στα τρυβλία της κάθε εφαρμογής. Η μικρότερη ανάπτυξη του μύκητα παρατηρήθηκε στην εφαρμογή Raf 11+Vd. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση του προγράμματος Image J.



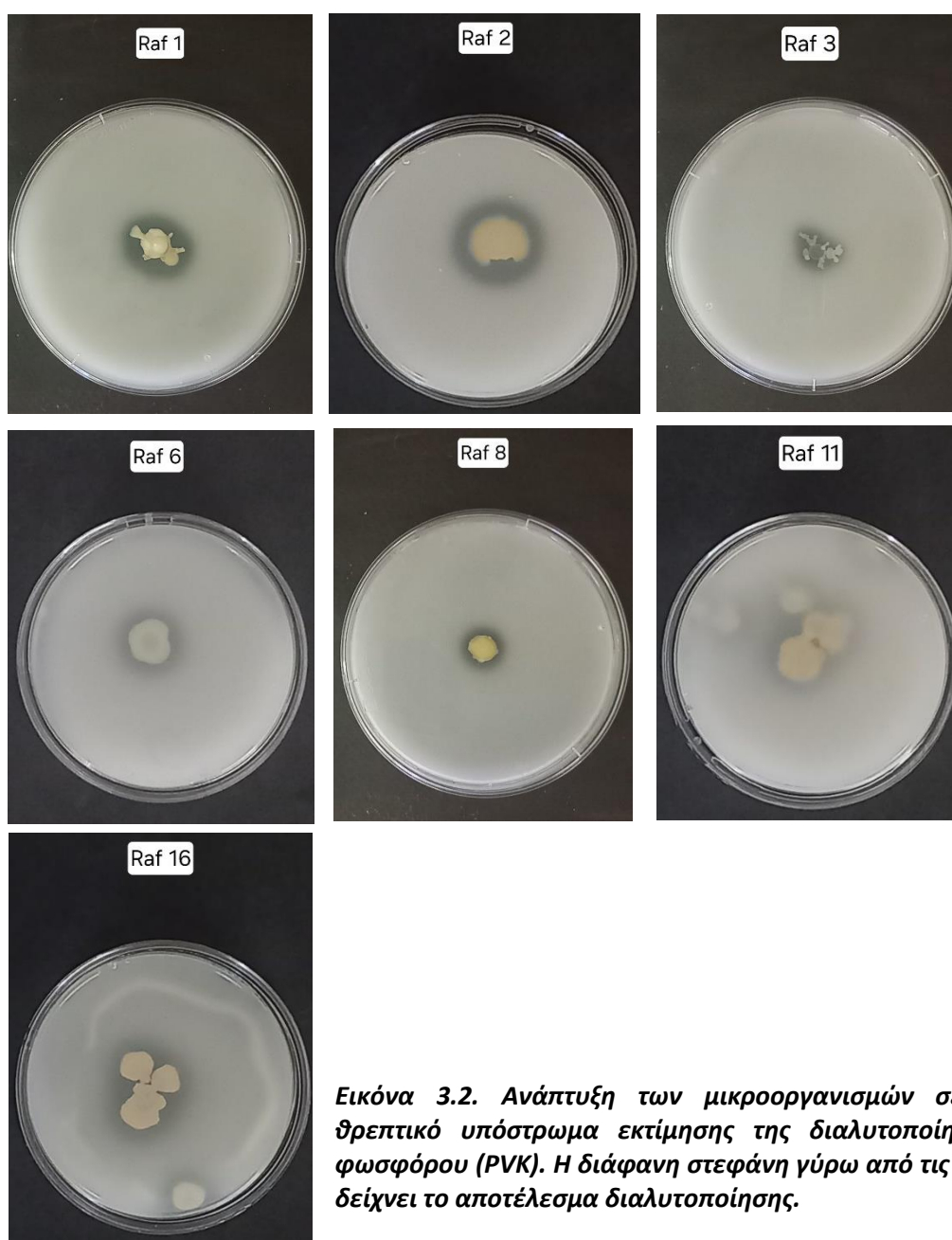
Διάγραμμα 3.1. Μέτρηση και σύγκριση της ανάπτυξης του μύκητα *Verticillium dahliae* σε τρυβλίο μαζί με κάθε βιολογικό παράγοντα

3.2 In vitro βιοδοκιμές ιδιοτήτων των απομονωμένων βιολογικών παραγόντων

Οι μικροοργανισμοί Raf 1, Raf 2, Raf 3, Raf 4, Raf 5, Raf 6, Raf 7, Raf 8, Raf 11, Raf 14, Raf 15, Raf 16 και Raf 19 εξετάστηκαν για ορισμένες πιθανές ιδιότητές τους που μπορεί να προάγουν την ανάπτυξη των φυτών και να προστατεύουν τα φυτά από βιοτικές και αβιοτικές καταπονήσεις. Συγκεκριμένα εξετάστηκε η ικανότητα των μικροοργανισμών για διαλυτοποίηση φωσφόρου, παραγωγή ινδολοξικού οξέος (IAA) και χιτινόλυση.

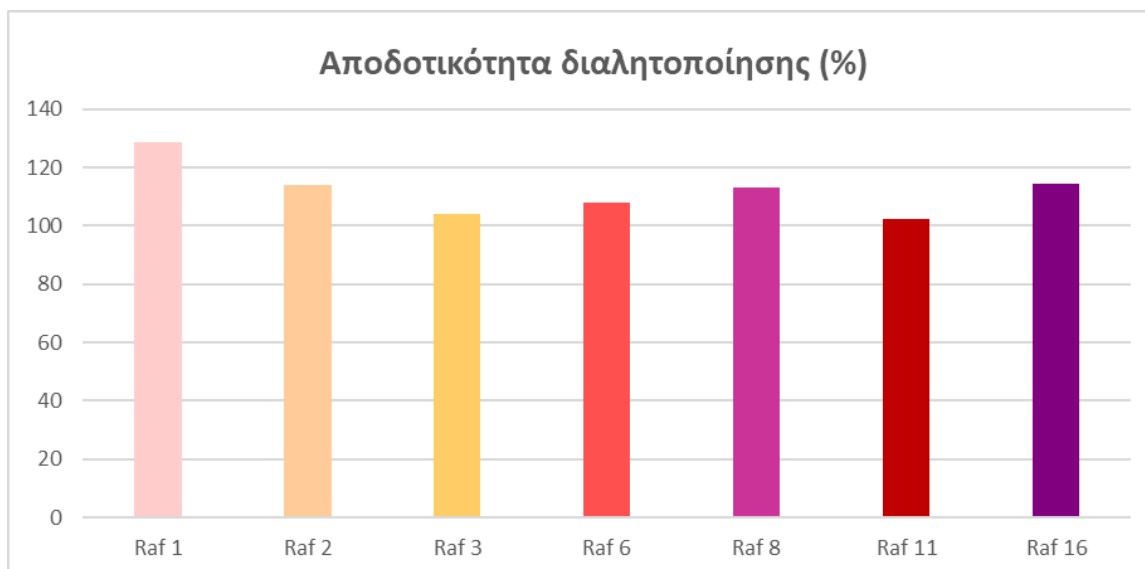
3.3 Εκτίμηση ικανότητας διαλυτοποίησης φωσφόρου

Από τους 13 μικροοργανισμούς που αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό μέσο PVK, 7 στελέχη (Raf 1, Raf 2, Raf 3, Raf 6, Raf 8, Raf 11 και Raf 16) παρατηρήθηκε ότι προκαλούν διαλυτοποίηση φωσφόρου. Στις παρακάτω εικόνες φαίνεται η ανάπτυξη των μικροοργανισμών αυτών. Η διάφανη στεφάνη γύρω από την κάθε αποικία υποδηλώνει την διαλυτοποίηση του φωσφόρου. Όσο μεγαλύτερη είναι η αναλογία της διαμέτρου της στεφάνης διαλυτοποίησης προς τη διάμετρο της αποικίας, τόσο πιο αποτελεσματική είναι η διαλυτοποίηση φωσφόρου που πραγματοποιεί ο μικροοργανισμός.



Εικόνα 3.2. Ανάπτυξη των μικροοργανισμών σε ειδικό θρεπτικό υπόστρωμα εκτίμησης της διαλυτοποίησης του φωσφόρου (PVK). Η διάφανη στεφάνη γύρω από τις αποικίες δείχνει το αποτέλεσμα διαλυτοποίησης.

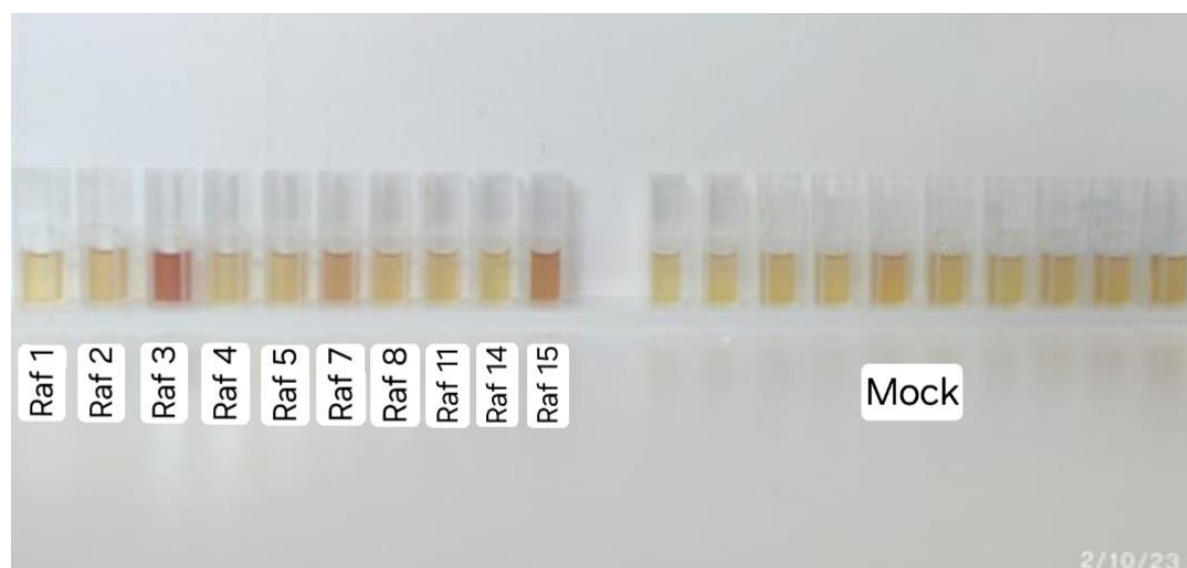
Στο παρακάτω διάγραμμα απεικονίζεται η ικανότητα διαλυτοποίησης του κάθε μικροοργανισμού. Υπολογίστηκε ότι τα μεγαλύτερα ποσοστά διαλυτοποίησης πραγματοποιούν οι μικροοργανισμοί Raf 1, Raf 2, Raf 8 και Raf 16.



Διάγραμμα 3.2. Μέτρηση και σύγκριση της αποδοτικότητας διαλυτοποίησης φωσφόρου στις *in vitro* βιοδοκιμές των μικροοργανισμών.

3.4 Εκτίμηση ικανότητας παραγωγής ινδολοξικού οξέος (IAA)

Τα αποτελέσματα της εξέτασης παραγωγής IAA φαίνονται στην παρακάτω εικόνα. Μετά από επώαση 10 δειγμάτων στους δοκιμαστικούς σωλήνες με αντιδραστήριο Salkowski και την παρουσία τρυπτοφάνης, παρατηρήθηκαν για τυχόν χρωματική διαφοροποίηση, από κιτρινοπό σε κόκκινο ή ροζ που να παραπέμπει σε παραγωγή IAA.

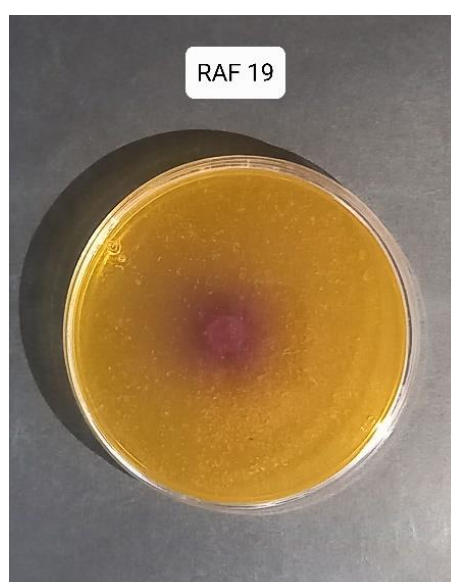
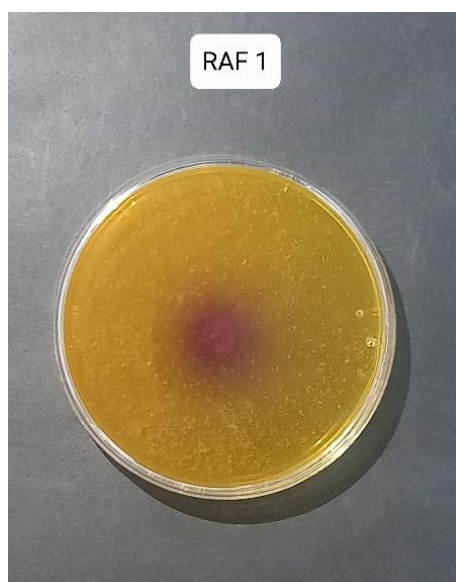


Εικόνα 3.3. Δείγματα μετά από εξέταση 10 μικροοργανισμών σε δοκιμαστικούς σωλήνες με αντιδραστήριο Salkowski, ως προς την ικανότητα παραγωγής IAA σε σύγκριση με τους αντίστοιχους μάρτυρες.

Από τα 10 δείγματα, 3 δείγματα (Raf 3, Raf 7 και Raf 15) έδειξαν θετικό αποτέλεσμα στην εξέταση ικανότητας παραγωγής ινδολοξικού οξέος (IAA). Μετά από οπτικό έλεγχο του χρώματος των υπόλοιπων δειγμάτων σε σχέση με αυτό του μάρτυρα, δεν φαίνεται να παράγουν IAA.

3.5 Εκτίμηση ικανότητας χιτινόλυσης

Οι εξεταζόμενοι μικροοργανισμοί, εμβολιάστηκαν σε βασικό θρεπτικό μέσο ανίχνευσης χιτινολυτικής δράσης. Για κάθε μικροοργανισμό εκτελέσθηκαν 3 επαναλήψεις. Από τους 13 μικροοργανισμούς που εξετάστηκαν, δύο στελέχη Raf 1 και Raf 19, παρουσίασαν αλλαγή στο χρώμα του υποστρώματος, από κίτρινο σε μωβ, υποδηλώνοντας την ικανότητα λύσης χιτίνης.



Εικόνα 3.4. Ανάπτυξη των μικροοργανισμών σε ειδικό θρεπτικό εκτίμησης ικανότητας χιτινόλυσης. Αλλαγή στο χρώμα του υποστρώματος (από κίτρινο σε μωβ) υποδηλώνει την ύπαρξη χιτινολυτικής δραστηριότητας.

	Raf 1	Raf 2	Raf 3	Raf 4	Raf 5	Raf 6	Raf 7	Raf 8	Raf 11	Raf 14	Raf 15	Raf 16	Raf 19
Διαλυτοποίηση Φωσφόρου	✓	✓	✓	✗	✗	✓	✗	✓	✓	✗	✗	✓	✗
Παραγωγή IAA	✗	✗	✓	✗	✗		✓	✗	✗	✗	✓		
Λύση Χιτίνης	✓	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✓

✓ =Θετικό ✓ =Χαμηλή Ικανότητα ✗ =Αρνητικό

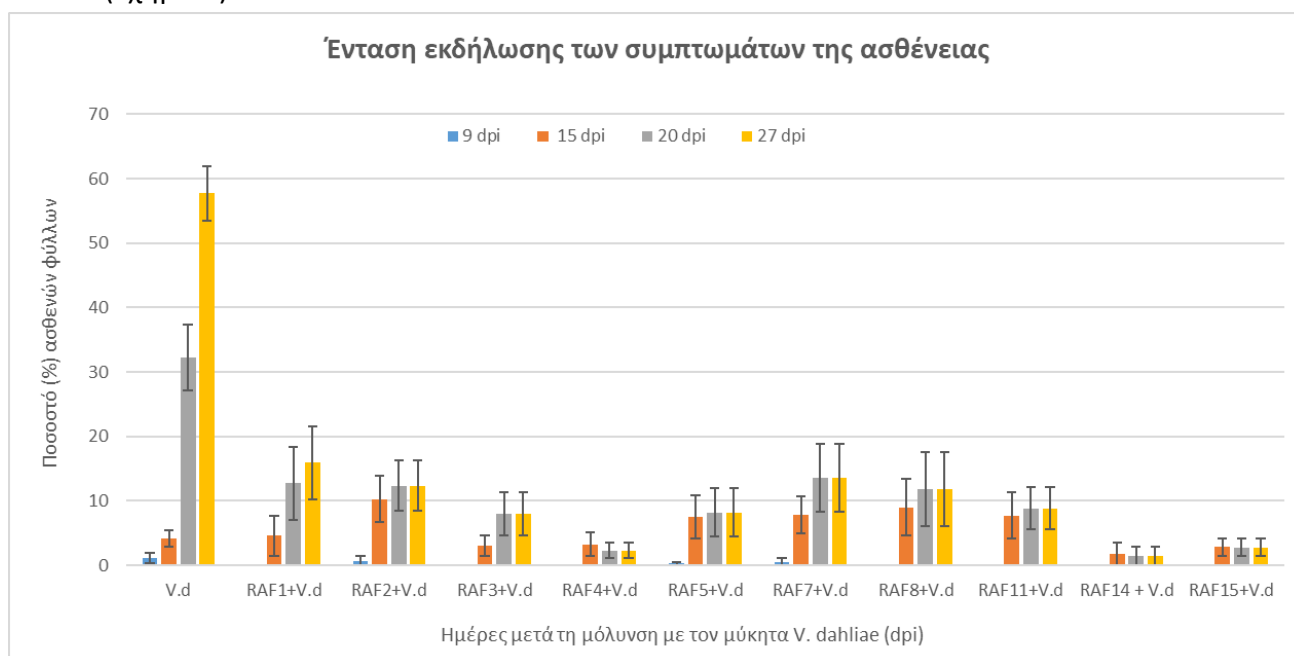
Πίνακας 3.1 Συνοπτικός πίνακας με όλες τις ιδιότητες στις οποίες έδειξαν θετικοί ή αρνητικοί οι εξεταζόμενοι απομονωμένοι μικροοργανισμοί.

3.6 *In planta* Πειράματα

Εκτός από τις διάφορες εργαστηριακές βιοδοκιμές στους επιλεγμένους μικροοργανισμούς που απομονώθηκαν από αλατούχα εδάφη, 10 στελέχη (Raf 1, Raf 2, Raf 3, Raf 4, Raf 5, Raf 7, Raf 8, Raf 11, Raf 14, Raf 15), εφαρμόστηκαν με ριζοπότισμα, κάθε μικροοργανισμός ξεχωριστά, σε φυτά τομάτας. Η εφαρμογή του κάθε στελέχους γινόταν σε 10 φυτά τομάτας και στη συνέχεια υπολογίστηκε ο μέσος όρος των συμπτωμάτων από τις κάθε επαναλήψεις. Με αυτόν τον τρόπο, διερευνήθηκε η πιθανή φυτοπροστατευτική δράση εναντίον του μύκητα *Verticillium dahliae*, η πιθανή ικανότητα βιοδιεγερτικής τους δράσης και η πιθανή φυτοπροστατευτική δράση στην αβιοτική καταπόνηση της αλατότητας (NaCl).

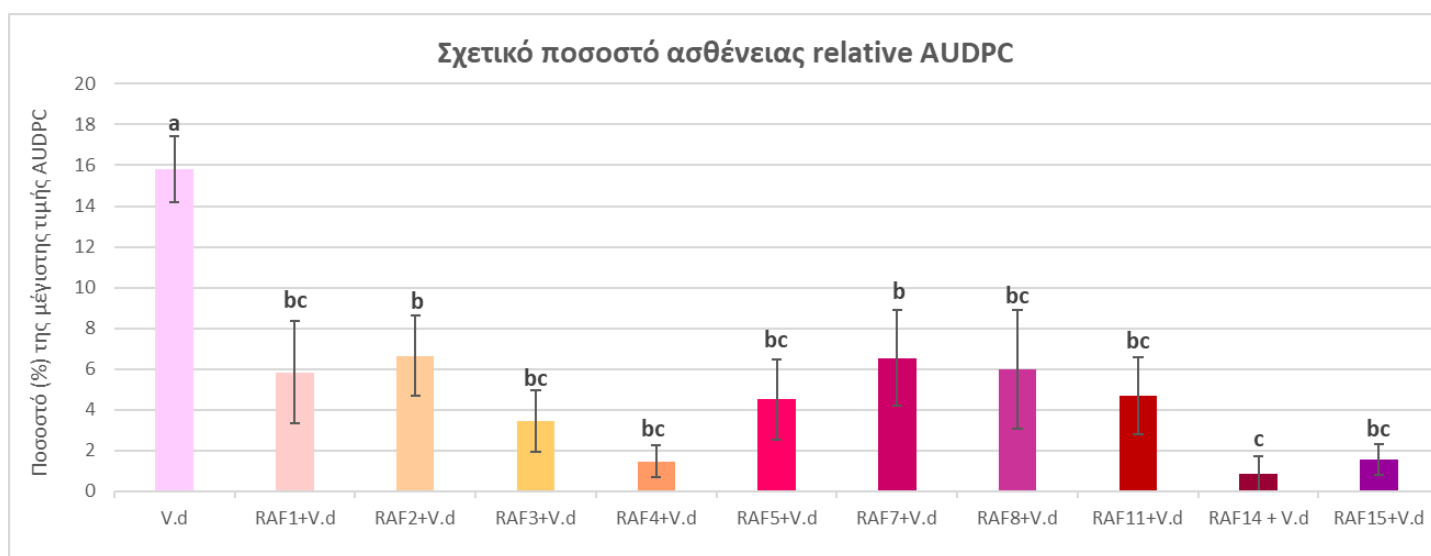
3.6.1 1^ο Πείραμα *in planta*: Μελέτη της επίδρασης των 10 απομονωμένων μικροοργανισμών έναντι του μύκητα *V. dahliae*

Στο πρώτο πείραμα σε φυτά τομάτας, παρατηρήθηκε η επίδραση στην ασθένεια του βερτισιλλίου, από τον εμβολιασμό του εδάφους με κάθε μικροοργανισμό ξεχωριστά. Για τα αποτελέσματα αυτού του πειράματος υπολογίστηκε το ποσοστό εμφάνισης της ασθένειας (Σχήμα 1) και το ποσοστό εμβαδού ασθένειας (rAUDPC) (Σχήμα 2).



Διάγραμμα 3.3. Η εξέλιξη των συμπτωμάτων της ασθένειας της κάθε εφαρμογής (Vd + μικροοργανισμός) σε σύγκριση με το μολυσμένο μάρτυρα (Vd). Οι κατακόρυφες γραμμές απεικονίζουν το τυπικό σφάλμα.

Σύμφωνα με το διάγραμμα 3.3, η ένταση εκδήλωσης των συμπτωμάτων της ασθένειας ήταν ιδιαίτερα υψηλή στο μολυσμένο μάρτυρα σε σχέση με τις εφαρμογές των 10 μικροοργανισμών, σε όλες τις μετρήσεις που ελήφθησαν 20 και 27 ημέρες μετά τη μόλυνση με το μύκητα. Οι μεταχειρίσεις Raf 4+Vd, Raf 14+Vd και Raf 15+Vd παρουσίασαν τα λιγότερο ασθενή φύλλα, κατά 92,8%, 95,5% και 91,3% αντίστοιχα από τα μολυσμένα φυτά του μάρτυρα, 20 ημέρες μετά τη μόλυνση και κατά 96%, 97,5% και 95,1% αντίστοιχα από τα μολυσμένα φυτά του μάρτυρα, 27 ημέρες μετά τη μόλυνση.

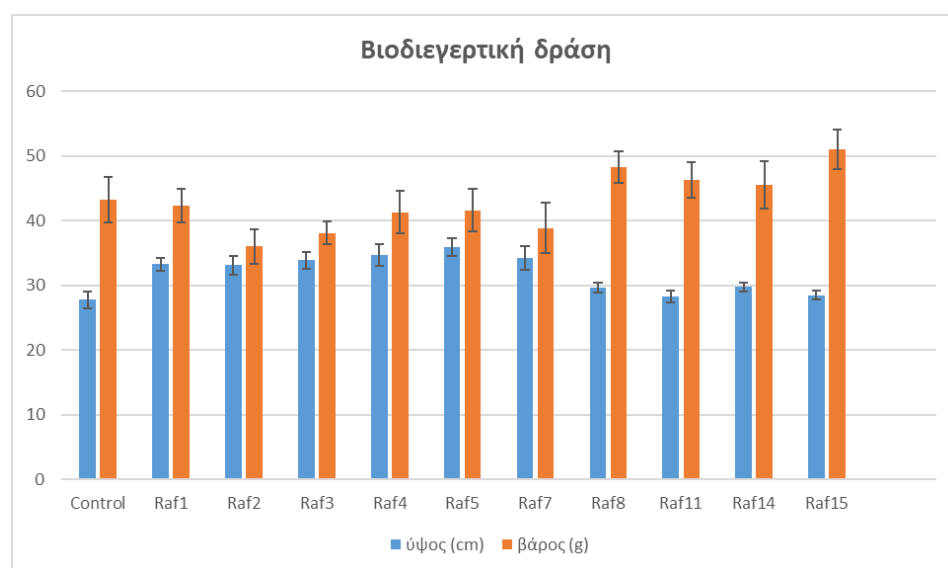


Διάγραμμα 3.4. Το σχετικό ποσοστό ασθένειας της κάθε εφαρμογής (Vd + μικροοργανισμός) σε σύγκριση με τον μολυσμένο μάρτυρα (Vd). Οι εφαρμογές που διαφέρουν μεταξύ τους στατιστικά σημαντικά σε επίπεδο σημαντικότητας 5% ($\alpha=0,05$), φέρουν διαφορετικό γράμμα σύμφωνα με τον έλεγχο της ελάχιστης σημαντικής διαφοράς του Fisher. Οι κατακόρυφες γραμμές απεικονίζουν το τυπικό σφάλμα.

Σύμφωνα με το διάγραμμα 3.4, το σχετικό ποσοστό ασθένειας για όλες τις εφαρμογές (Vd + μικροοργανισμός) ήταν στατιστικά σημαντικά χαμηλότερο σε σχέση τον μολυσμένο μάρτυρα (Vd). Μεταξύ των εφαρμογών (Vd + μικροοργανισμός), δεν υπήρξε στατιστική διαφορά στο σχετικό ποσοστό της ασθένειας, με εξαίρεση την εφαρμογή Raf 14+Vd που διαφέρει στατιστικά από τις εφαρμογές Raf 2+Vd και Raf 7+Vd. Συνεπώς, η εφαρμογή Raf 14+Vd εμφανίζει το χαμηλότερο ποσοστό ασθένειας το οποίο είναι 94,5% φορές μικρότερο συγκριτικά με το μάρτυρα (Vd).

3.6.2 2^ο Πείραμα *in planta*: Μελέτη της επίδρασης των 10 απομονωμένων μικροοργανισμών στο ύψος και το βάρος των φυτών

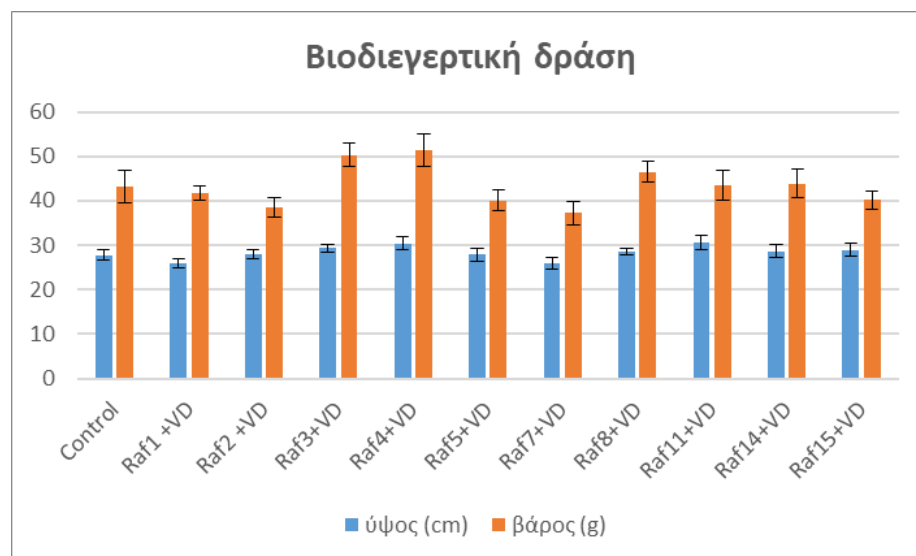
Στο πείραμα αυτό, μετρήθηκε το ύψος και το βάρος 8 φυτών από κάθε εφαρμογή και ο μέσος όρος των μετρήσεων συγκρίθηκε με αυτό του μάρτυρα, με σκοπό τη μελέτη εύρεσης πιθανής βιοδιεγερτικής δράσης. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι στις εφαρμογές των βιολογικών παραγόντων το ύψος των φυτών ήταν παραπλήσιο με αυτό του μάρτυρα, με αμελητέα αύξηση σε όλες τις εφαρμογές. Τα φυτά στα οποία εφαρμόστηκε ο βιολογικός παράγοντας Raf 5, παρουσίασαν το μεγαλύτερο ύψος, αυξημένο κατά 8 cm συγκριτικά με τον μάρτυρα. Σχετικά με το βάρος, δεν παρουσιάστηκαν σημαντικές διαφορές στις εφαρμογές των βιολογικών παραγόντων συγκριτικά με το μάρτυρα. Το στέλεχος Raf 15 εμφάνισε τη μεγαλύτερη αύξηση του βάρους (κατά 7,7 g), ενώ το στέλεχος Raf 3 εμφάνισε την μεγαλύτερη μείωση του βάρους (κατά 7,2 g).



Διάγραμμα 3.5. Ο μέσος όρος του ύψους και βάρους των 10 βακτηριακών στελεχών, συγκριτικά με του μάρτυρα. Οι κατακόρυφες γραμμές απεικονίζουν το τυπικό σφάλμα.

Επιπλέον, μελετήθηκε η πιθανή βιοδιεγερτική δράση των 10 βακτηριακών στελεχών στα φυτά που είχαν προηγουμένως μολυνθεί από το μύκητα *V. dahliae* (27 ημέρες μετά τη μόλυνση). Το ύψος των φυτών ήταν παραπλήσιο σε όλες τις εφαρμογές, με μικρές διακυμάνσεις τάξεως 2 cm. Ως αναφορά το βάρος, δεν παρουσιάστηκαν σημαντικές διαφορές συγκριτικά με το μάρτυρα. Το στέλεχος Raf

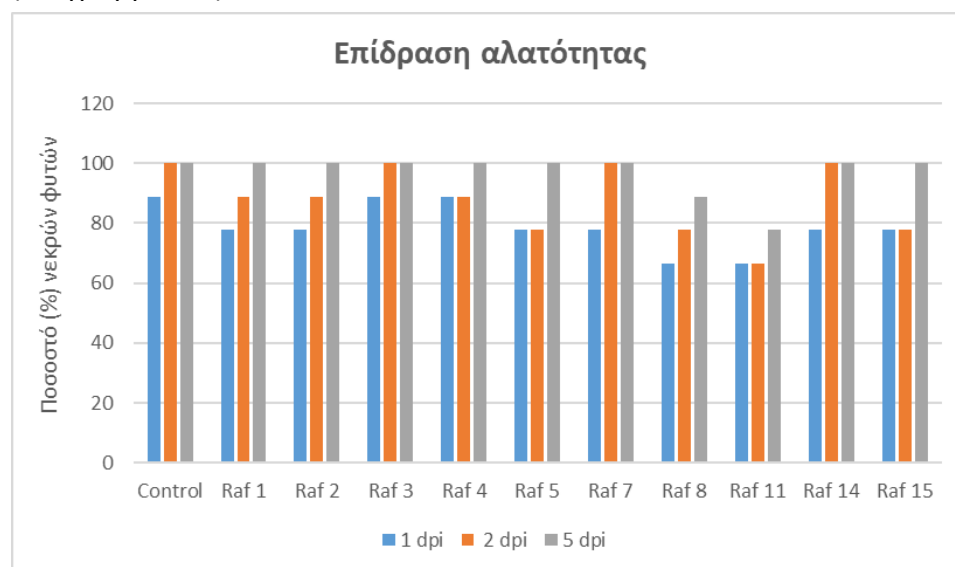
4+Vd εμφάνισε τη μεγαλύτερη αύξηση του βάρους (κατά 8,2 g), ενώ το στέλεχος Raf 7+Vd εμφάνισε την μεγαλύτερη μείωση του βάρους (κατά 6 g).



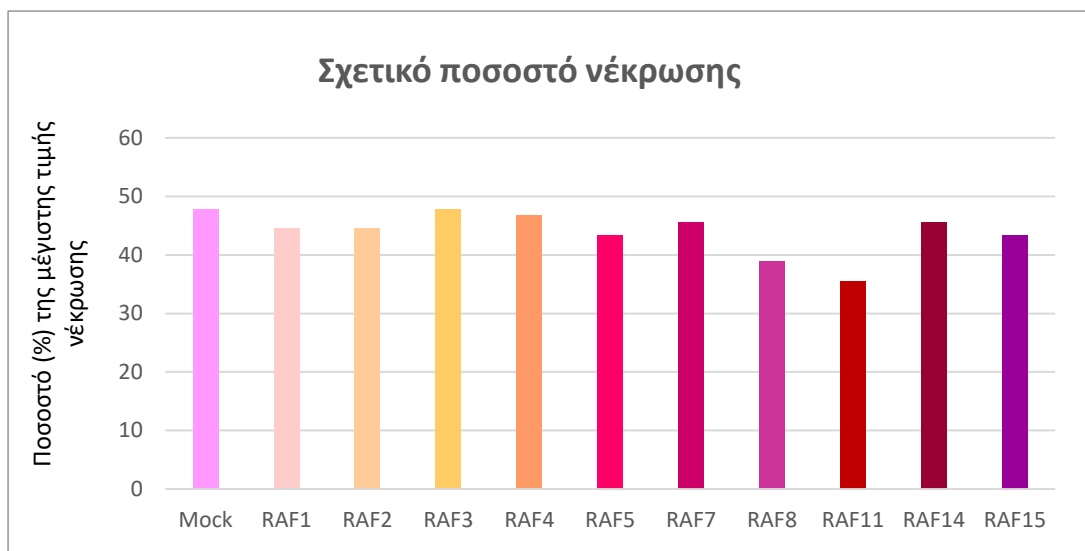
Διάγραμμα 3.6. Ο μέσος όρος ύψους και βάρους των 10 βακτηριακών στελεχών, σε φυτά που είχαν προηγουμένως μολυνθεί με το μύκητα *Verticillium dahliae*, συγκριτικά με του μάρτυρα. Οι κατακόρυφες γραμμές απεικονίζουν το τυπικό σφάλμα.

3.6.3 3^ο Πείραμα *in planta*: Μελέτη της επίδρασης της αλατότητας στα 10 στελέχη απομονωμένων μικροοργανισμών

Στο τρίτο πείραμα, παρατηρήθηκε η επίδραση του NaCl στα φυτά τομάτας που είχαν προηγουμένως εμβολιαστεί με τους 10 μικροοργανισμούς. Για τα αποτελέσματα του πειράματος υπολογίστηκε το ποσοστό νεκρών φυτών (Διάγραμμα 3.7) και το σχετικό ποσοστό νέκρωσης των φυτών, που οφείλεται στην αλατότητα (Διάγραμμα 3.8).



Διάγραμμα 3.7. Η εξέλιξη της ποσοστιαίας νέκρωσης των φυτών που έχουν εμβολιαστεί με βιολογικούς παράγοντες, συγκριτικά με τα φυτά μάρτυρες.



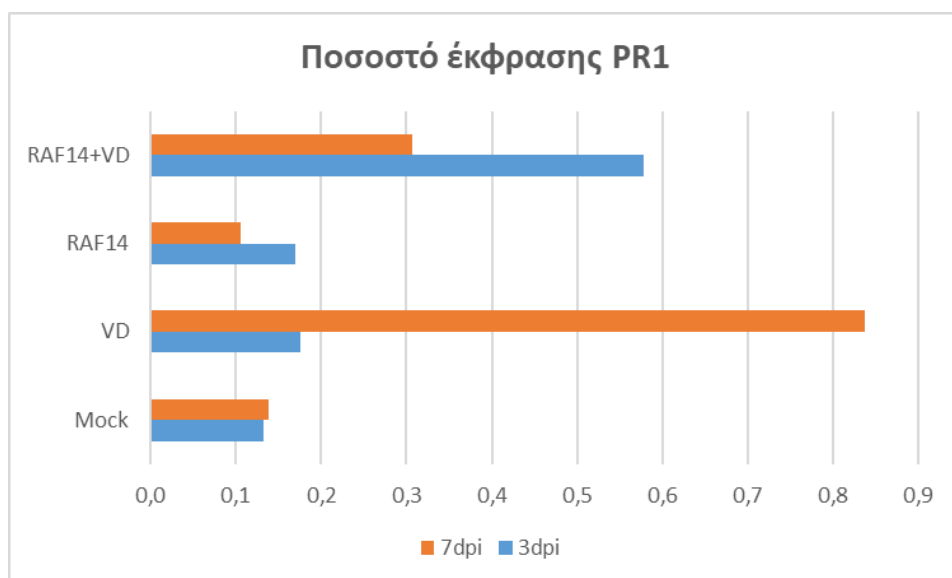
Διάγραμμα 3.8. Το σχετικό ποσοστό νέκρωσης σε κάθε εφαρμογή με μικροοργανισμό, συγκριτικά με το μάρτυρα.

Σύμφωνα με το διάγραμμα 3.8, η εφαρμογή ορισμένων από τους εξεταζόμενους μικροοργανισμούς, έδειξε να παρέχει προστασία στα φυτά τομάτας έναντι του NaCl, 5 ημέρες μετά την εφαρμογή του. Ειδικότερα, η αυξημένη αλατότητα προκάλεσε παραπλήσιες επιδράσεις στη βιωσιμότητα των φυτών συγκριτικά με το μάρτυρα στις εφαρμογές Raf 1, Raf 2, Raf 3, Raf 4, Raf 5, Raf 7, Raf 14 και Raf 15. Η εφαρμογές που ξεχώρισαν ήταν οι Raf 8 και Raf 11, όπου στη εφαρμογή Raf 8 το σχετικό ποσοστό νέκρωσης των φυτών ήταν μικρότερο κατά 4,2%, ενώ στην εφαρμογή Raf 11 ήταν μικρότερο κατά 5,8%, συγκριτικά με το μάρτυρα.

3.6.4 4^ο Πείραμα: Μελέτη του ποσοστού της έκφρασης των γονιδίων *PR1* και *PIN2*, ως αντίδραση στο φυτοπαθογόνο μύκητα *V. dahliae*

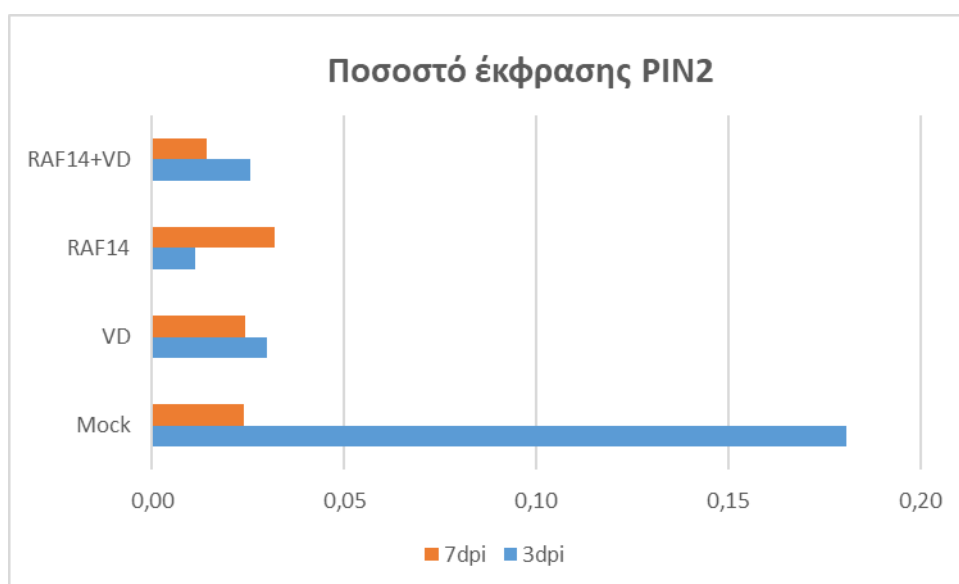
Στο πείραμα αυτό αξιολογήθηκε η έκφραση των γονιδίων *PR1* και *PIN2* που σχετίζονται με την άμυνα των φυτών. Ειδικότερα, έγινε σύγκριση της έκφρασης των γονιδίων αυτών, σε μολυσμένα φυτά που περιείχαν το βιολογικό παράγοντα Raf 14, σε μολυσμένα φυτά που δεν περιείχαν το βιολογικό παράγοντα και σε φυτά μάρτυρες. Για να προσδιοριστεί το επίπεδο έκφρασης των γονιδίων, το ολικό RNA των φυτών απομονώθηκε 3 και 7 ημέρες μετά την μόλυνση και μετατράπηκε σε cDNA για την πραγματοποίηση Real time-quantitative PCR (qPCR).

Όπως φαίνεται στο διάγραμμα 3.9, η έκφραση του γονιδίου *PR1* στην εφαρμογή Raf 14+ Vd είναι πολύ πιο έντονη συγκριτικά με το μάρτυρα (περίπου 4 φορές πιο έντονη, 3 ημέρες μετά τη μόλυνση και 2 φορές πιο έντονη, 7 ημέρες μετά τη μόλυνση). Επίσης, παρατηρήθηκε μεγάλη αύξηση στην έκφραση του γονιδίου *PR1* στα φυτά μολυσμένα με το φυτοπαθογόνο μύκητα, 7 ημέρες μετά τη μόλυνση.



Διάγραμμα 3.9. Έκφραση του γονιδίου *PR1*, 3 και 7 ημέρες ύστερα από την μόλυνση του φυτού με το μύκητα *Verticillium dahliae*.

Η έκφραση του γονιδίου *PIN2*, όπως φαίνεται στο παρακάτω διάγραμμα, διαπιστώθηκε σημαντικά μικρότερη στην εφαρμογή Raf 14+ Vd, συγκριτικά με τον μάρτυρα (σχεδόν 7 φορές μικρότερη, 3 ημέρες μετά τη μόλυνση και 2 φορές μικρότερη, 7 ημέρες μετά τη μόλυνση).



Διάγραμμα 3.10. Έκφραση του γονιδίου *PIN2*, 3 και 7 ημέρες ύστερα από την μόλυνση του φυτού με το μύκητα *Verticillium dahliae*

4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η αλατότητα αποτελεί έναν αβιοτικό παράγοντα που αποτελεί σημαντική απειλή για τη γεωργία και τη γονιμότητα του εδάφους, τη στιγμή που η ανάγκη για παραγωγή τροφίμων μεγαλώνει λόγω του συνεχώς αυξανόμενου πληθυσμού. Οι δυσμενείς επιπτώσεις που προκαλεί στη βλαστικότητα του σπόρου, την ανάπτυξη της ρίζας και του βλαστού, την ανθοφορία, την ποιότητα των καρπών, την παραγωγή, τη μορφολογία των φύλλων και τη φωτοσύνθεση, μειώνουν την αξία της καλλιέργειας και της γεωργική βιωσιμότητα της πληγείσας γης. Οι τρόποι αντιμετώπισης του προβλήματος είναι σχετικά περιορισμένοι και περιλαμβάνουν τη χρήση προετοιμασμένου σπόρου και σποροφύτων, την εφαρμογή κατάλληλων θρεπτικών στοιχείων μέσω της λίπανσης και την αναπαραγωγή ποικιλιών με μεγαλύτερη αντοχή. Τα τελευταία χρόνια, ιδιαίτερες προσπάθειες γίνονται στην αντιμετώπιση των επιπτώσεων της αλατότητας μέσω της επίδρασης μυκορριζών (VAM), ενώ η χρήση βακτηρίων ως βιολογικούς παράγοντες, αποτελεί μία ελπιδοφόρα μέθοδο, που χρήζει περισσότερης έρευνας.

Ο μύκητας *V. dahliae* προκαλεί σημαντική απώλεια στην παγκόσμια παραγωγή, προσβάλλοντας πάνω από 200 είδη ξενιστών όπως δενδρώδεις καλλιέργειες, κηπευτικά και αυτοφυή φυτά. Είναι ένας φυτοπαθογόνος μύκητας που προσβάλλει το αγγειακό σύστημα των φυτών και μπορεί δύσκολα να ελεγχθεί. Ο λόγος οφείλεται στο γεγονός ότι η ασθένεια δεν μπορεί να αντιμετωπιστεί με μυκητοκτόνα από τη στιγμή που εισέλθει και αποικίσει τα αγγεία του ξύλου, στο μεγάλο εύρος ξενιστών που αυξάνεται συνεχώς, καθώς και στην ικανότητα του παθογόνου να επιβιώνει στο έδαφος για αρκετά χρόνια, υπό τη μορφή των μικροσκληρωτίων. Η πιο αποτελεσματική προσέγγιση για την αντιμετώπιση της ασθένειας είναι η εφαρμογή της ηλιοαπολύμανσης, ως προληπτικό μέτρο και η αποφυγή όσο το δυνατόν, του φυτοπαθογόνου μύκητα με περιορισμούς καραντίνας. Παράλληλα, γίνεται προσπάθεια εύρεσης ανθεκτικών ποικιλιών φυτών στο φυτοπαθογόνο μύκητα. Η ανάγκη εύρεσης εναλλακτικών μεθόδων αντιμετώπισης της ασθένειας είναι πολύ έντονη και τα τελευταία χρόνια πραγματοποιούνται πολλές μελέτες στη χρήση βιολογικών παραγόντων. Η χρήση ωφέλιμων βακτηρίων και μυκήτων αποτελεί μία ελπιδοφόρο μέθοδο για την αντιμετώπιση της ασθένειας, όχι μόνο επειδή μέχρι

σήμερα δεν υπάρχουν ενδεδειγμένα χημικά σκευάσματα, αλλά και επειδή αποτελούν φιλοπεριβαλλοντικές μεθόδους. Έχει βρεθεί ότι διάφορα στελέχη των ειδών *Pseudomonas*, *Cellulomonas* και *Streptomyces*, όπως και το ριζοβακτήριο *Paenobacillus alvei* (K165), έχουν την ικανότητα να δρούν ανταγωνιστικά του μύκητα *V. dahliae* και να λειτουργούν ως βιολογικοί παράγοντες για την αντιμετώπιση της ασθένειας (Wadi & Easton, 1985· Tjamos et al., 2005)

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε η μελέτη της φυτοπροστατευτικής δράσης 13 βακτηριακών στελεχών, τα οποία είχαν απομονωθεί από τη ριζόσφαιρα αλοφύτων της περιοχής της Ραφήνας, έναντι των δυσμενών επιδράσεων που προκαλεί το NaCl και ο φυτοπαθογόνος μύκητας *V. dahliae*. Αρχικά πραγματοποιήθηκαν ορισμένα *in vitro* πειράματα εκτίμησης των ιδιοτήτων των απομονωμένων μικροοργανισμών. Στο πείραμα ανταγωνισμού των βακτηριακών στελεχών με το μύκητα *V. dahliae*, δεν παρατηρήθηκε κάποια εμφανή ζώνη παρεμπόδισης αλλά η ανάπτυξη του μύκητα σε ορισμένες εφαρμογές περιορίστηκε σε σχέση με τις υπόλοιπες και σε σχέση με τον μάρτυρα (πχ. Raf 11+Vd). Η μείωση αυτή της ανάπτυξης του μύκητα μπορεί να οφείλεται στην ύπαρξη αντιβιοτικών ενώσεων που ελευθερώθηκαν στο μέσο θρέψης (PDA), κατά την μικροβιακή δραστηριότητα του αντίστοιχου βιολογικού παράγοντα. Ως αναφορά την εκτίμηση ικανότητας διαλυτοποίησης φωσφόρου, βρέθηκε ότι 7 στελέχη πραγματοποιούν διαλυτοποίηση. Το υψηλότερο ποσοστό διαλυτοποίησης πραγματοποίησε ο μικροοργανισμός Raf 1. Τα βακτήρια που προκαλούν διαλυτοποίηση φωσφόρου μπορούν να βελτιώσουν την γενική υγεία των φυτών, καθώς έχουν τη δυνατότητα να μειώνουν το pH, να αυξάνουν τα επίπεδα του φωσφόρου στη ριζόσφαιρα, δημιουργώντας σύμπλοκα με το φώσφορο και να αυξάνουν τις εκκρίσεις της ρίζας. Τα αποτελέσματα της εξέτασης παραγωγής ινδολοξικού οξέος (IAA), έδειξαν ότι 3 δείγματα (Raf 3, Raf 7 και Raf 15) έχουν την ικανότητα να παράγουν, σε σημαντικές ποσότητες, IAA. Το IAA αποτελεί τον κυριότερο εκπρόσωπο των αυξινών, έχοντας ρυθμιστικό ρόλο σε βασικές λειτουργίες των φυτών όπως η επιμήκυνση των κυττάρων στα στελέχη του φυτού, η κυτταρική διαίρεση, η απόπτωση των φύλλων και καρπών, η γήρανση, η διαφοροποίηση κλπ. (Roberts, 2012). Επίσης οι αυξίνες που παράγονται από ριζοβακτήρια συμβάλουν σημαντικά στη διεργασία της αζωτοδέσμευσης (Malhotra & Srivastava, 2008). Τέλος, ως αναφορά την εκτίμηση

ικανότητας λύσης χιτίνης, βρέθηκε ότι δύο στελέχη (Raf 1 και Raf 19) έχουν την ικανότητα αυτή. Η χιτίνη είναι ένας φυσικός πολυσακχαρίτης που αποτελεί συστατικό των κυτταρικών τοιχωμάτων των μυκήτων, άρα η αποικοδόμησή της αποτελεί ένα σημαντικό μηχανισμό άμυνας, που μπορεί να χρησιμοποιηθεί στη βιολογική αντιμετώπιση.

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκαν 4 πειράματα *in planta* για τη διερεύνηση πιθανής αντιμετώπισης του μύκητα *Verticillium dahliae*, πιθανής ικανότητας βιοδιεγερτικής δράσης και πιθανής φυτοπροστατευτικής δράσης στην αβιοτική καταπόνηση της αλατότητας (NaCl). Τα αποτελέσματα του 1^{ου} πειράματος έδειξαν το σχετικό ποσοστό ασθένειας για όλες τις εφαρμογές (Vd + μικροοργανισμός) ήταν στατιστικά σημαντικά χαμηλότερο σε σχέση τον μολυσμένο μάρτυρα (Vd). Το χαμηλότερο ποσοστό ασθένειας εμφάνισε η εφαρμογή του βακτηρίου Raf 14, το οποίο ήταν περίπου 95% φορές μικρότερο συγκριτικά με το μάρτυρα (Vd). Οι μικροοργανισμοί Raf 4 και Raf 15, εμφάνισαν εξίσου σημαντική, αλλά σε μικρότερο ποσοστό, μείωση των συμπτωμάτων ασθένειας. Τα αποτελέσματα του 2^{ου} πειράματος έδειξαν ότι δεν υπήρξαν ιδιαίτερες διαφοροποιήσεις στο ύψος και το βάρος των φυτών μεταξύ των διαφόρων εφαρμογών των βιολογικών παραγόντων και του μάρτυρα. Τα αποτελέσματα του 3^{ου} πειράματος *in planta* έδειξαν ότι η εφαρμογή μόνο ορισμένων από τους εξεταζόμενους μικροοργανισμούς, μπορούν να παρέχουν προστασία στα φυτά τομάτας έναντι του NaCl, 5 ημέρες μετά την εφαρμογή του. Στις περισσότερες εφαρμογές, η αυξημένη αλατότητα προκάλεσε παραπλήσιες επιδράσεις στη βιωσιμότητα των φυτών συγκριτικά με το μάρτυρα. Η εφαρμογές που ξεχώρισαν ήταν οι Raf 8 και Raf 11, όπου στη εφαρμογή Raf 8 το σχετικό ποσοστό νέκρωσης των φυτών ήταν μικρότερο κατά 4,2%, ενώ στην εφαρμογή Raf 11 ήταν μικρότερο κατά 5,8%, συγκριτικά με το μάρτυρα.

Στο 4^ο πείραμα, αξιολογήθηκε το ποσοστό έκφρασης των γονιδίων *PR1* και *PIN2* του βακτηρίου Raf 14, ως αντίδραση στο φυτοπαθογόνο μύκητα *V. dahliae*. Ειδικότερα, το ολικό RNA των φυτών απομονώθηκε 3 και 7 ημέρες μετά την μόλυνση, μετατράπηκε σε cDNA και πραγματοποιήθηκε Real time-quantitative PCR (qPCR). Αρχικά, από τα αποτελέσματα του πειράματος παρατηρείται το φαινόμενο επαγωγής της άμυνας από το βιολογικό παράγοντα Raf 14. Η επαγωγή της άμυνας αποτελεί σημαντικό μηχανισμό που επιτρέπει στα φυτά να αντιμετωπίσουν τις επιθέσεις

επιβλαβών φυτοπαθογόνων, να διατηρήσουν την υγεία και την ανάπτυξή τους. Το μηχανισμό αυτό επιβεβαιώνουν τα παρόμοια επίπεδα της έκφρασης του γονιδίου *PR1* μεταξύ των εφαρμογών Raf 14 και Mock. Συνεπώς, ο μικροοργανισμός Raf 14 δεν ενεργοποιεί την άμυνα του φυτού όταν δεν υπάρχει κίνδυνος. Το φυτό μπαίνει σε κατάσταση «συναγερμού» μόνο μετά την εισβολή του παθογόνου μύκητα και αυτό επιβεβαιώνεται με τα υψηλότερα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *PR1* στην εφαρμογή Raf14+Vd, 3 ημέρες μετά τη μόλυνση.

Είναι γνωστό ότι το γονίδιο *PR1* ενεργοποιείται μέσω του βιοχημικού μονοπατιού του σαλικυλικού οξέος και το *PIN2* ενεργοποιείται μέσω του μονοπατιού του αιθυλενίου (Herman et al., 2007). Η αύξηση της έκφρασης του γονιδίου *PR1* στην εφαρμογή Raf 14+ Vd, συγκριτικά με τον μάρτυρα, υποδηλώνει την ενεργοποίηση του μονοπατιού του σαλικυλικού οξέος, ενώ η μειωμένη έκφραση του γονιδίου *PIN2*, συγκριτικά με τον μάρτυρα, δείχνει ότι το μονοπάτι του ιασμονικού οξέως και αιθυλενίου καταστέλλεται. Και οι δύο αυτές αλλαγές στην έκφραση των γονιδίων αποτελούν στρατηγικές που ενισχύουν την άμυνα των φυτών ενάντια της εισβολής του φυτοπαθογόνου μύκητα *V. dahliae*.

Ως αναφορά την αυξημένη έκφραση του γονιδίου *PR1* στην εφαρμογή Raf 14+ Vd 3 ημέρες μετά τη μόλυνση, συγκριτικά με την έκφρασή του 7 ημέρες μετά τη μόλυνση, μπορεί να δικαιολογηθεί από το βιολογικό κύκλο του φυτοπαθογόνου. Ειδικότερα, είναι γνωστό ότι μύκητας *V. dahliae* αρχικά τρέφεται βιοτροφικά και στη συνέχεια μεταβαίνει σε νεκροτροφικό στάδιο. Οπότε στις 3 ημέρες μετά τη μόλυνση αναμένεται η παρατηρούμενη αύξηση της έκφρασης του γονιδίου *PR1* που οφείλεται στην ενεργοποίηση της άμυνας του σαλικυλικού οξέος, έναντι του βιοτροφικού παθογόνου. Αντίστοιχα, στις 7 ημέρες μετά τη μόλυνση αναμένεται η αύξηση της έκφρασης του γονιδίου *PIN2* που οφείλεται στην ενεργοποίηση της άμυνας του αιθυλενίου και ιασμονικού οξέως, έναντι του νεκροτροφικού παθογόνου, πράγμα που δεν παρατηρήθηκε στο πείραμα που διεξήχθη. Τέλος, στα αποτελέσματα του πειράματος παρατηρήθηκε μία έντονη αύξηση στην έκφραση του γονιδίου *PR1* στα φυτά μολυσμένα με το φυτοπαθογόνο μύκητα, 7 ημέρες μετά τη μόλυνση. Αυτή η αύξηση ενδεχομένως οφείλεται σε μία αντίδραση του φυτού στην εισβολή του παθογόνου, που όμως εμφανίζεται σχετικά αργά.

Συμπερασματικά, φαίνεται ότι ορισμένοι εδαφογενείς μικροοργανισμοί μπορούν να προκαλέσουν διαλυτοποίηση φωσφόρου, παραγωγή ινδολοξικού οξέος (IAA) και χιτινόλυση και να ενεργοποιήσουν μηχανισμούς άμυνας των φυτών. Η ενεργοποίηση της διασυστηματικής αντοχής (ISR) εναντίον του μύκητα *V. dahliae* μέσω του βακτηριακού στελέχους Raf 14 ήταν ιδιαίτερα εμφανής και θέτει νέους ορίζοντες για την εφαρμογή βιολογικών μεθόδων για την προστασία των φυτών. Βέβαια, παρά τα ενθαρρυντικά αποτελέσματα, για την πλήρη κατανόηση των μηχανισμών δράσης των εδαφογενών μικροοργανισμών, είναι απαραίτητο να πραγματοποιηθεί περεταίρω έρευνα καθώς και εφαρμογή των πειραμάτων στο πεδίο, λαμβάνοντας υπόψιν των περιβαλλοντικών συνθηκών της κάθε περιοχής.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ελληνική:

1. Αγγίδης Α. (2006). Τομάτα Υπαίθρια (Επιτραπέζια-Βιομηχανική-Καλλιέργεια-Αξιοποίηση), Εκδόσεις Δ, Γαρταγάνης Γ' έκδοση
2. Ζιώγας Β., Μαρκόγλου Α., Γεωργική Φαρμακολογία (2007) Εκδόσεις: Εκτυπωτική Αττικής
3. Θανασουλόπουλος Κ. (1992). Μυκητολογικές ασθένειες δένδρων και αμπέλου. Μαθήματα Ειδικής Φυτοπαθολογίας. Εκδόσεις Ζήτη, Θεσσαλονίκη
4. Κορνάκου Ι. (2000). Η καλλιέργεια της τομάτας στο θερμοκήπιο, Εκδόσεις Σταμούλη Α.Ε.
5. Ολύμπιος Χ. (2001). Η τεχνική της καλλιέργειας των κηπευτικών στα θερμοκήπια, Εκδόσεις Σταμούλη Α.Ε.
6. Παναγόπουλος Χ. (2007). Ασθένειες καρποφόρων δένδρων και αμπέλων. Εκδόσεις Σταμούλη, Αθήνα
7. Τζάμος Ε. (2007). Φυτοπαθολογία, Εκδόσεις Σταμούλη, Αθήνα
8. Χατζόπουλος Π. (2001). Βιοτεχνολογία Φυτών, Εκδόσεις Έμβρυο

Αγγλική:

1. Abrisqueta J.M., Hernansaenz A., Alarcon J.J., Lozano M.A. (1991). Dinamica del Sistema radicular de dos genotipos de tomate en invernadero en riego por goteo sometidos aestres salino. Suelo y Planta, p. 351-361
2. Adams P. & Ho L.C. (1995). Uptake and distribution of nutrients in relation to tomato fruit quality. Acta Horticulturae, 412, p. 374-387
3. Adams P., Ho L.C. (1989). Effects of constant and fluctuating salinity on the yield, quality and calcium status of tomatoes. J. Horti. Sci., 64, p. 725-732
4. Agrios G. (2005) Plant Pathology. 5th Edition, Elsevier Academic Press, Amsterdam
5. Allagui M.B., Cruz V., Cuartero J. (1987). Tolerancia del tomate y especies afines a la germinacion en agua salada. Actas de las VI Jornadas de Seleccin y Mejora de Plantas Hortícolas, Murcia, p. 69-75

6. Alvarado A.D., Bradford K.J., Hewitt J.D. (1987). Osmotic priming of tomato seeds. Effects on germination, field emergence, seedling growth and fruit yield. *J. Am. Soc. Horti. Sci.*, 112, p. 427-432
7. Anderlini R. (1983). Η ντομάτα : τεχνική καλλιέργειας και φυτοπροστασία, Εκδόσεις Αγροτεχνική
8. Anzallag G.N., Lerner H.R., Poljakoff-Mayber A., (1990). Induction of increased salt tolerance in *Sorghum bicolor* by NaCl pretreatment. *J. Exp. Bot.* 41, p. 29-34.
9. Awad A.S., Edwards D.G., Campbell L.C. (1990). Phosphorus enhancement of salt tolerance of tomato. *Crop Sci.*, 30, p. 123-128
10. Ayers A.D. (1952). Seed germination is affected by soil moisture and salinity. *Agron. J.*, 44, p. 82-84
11. Berg G. & Ballin G. (1994). Bacterial antagonists of *Verticillium dahliae*. *J. Phytopathol.* in print
12. Berg G., Knaape C., Ballin G., Seidel D. (1994). Biological control of *Verticillium dahliae* kleb. by natural occurring rhizosphere bacteria. *Archives Of Phytopathology and Plant Protection*, 29(3), p. 249–262
13. Berrie A.M. & Drennan D.S. (1971). The effect of hydration-dehydration on seed germination. *New Phytologist*, 70, p. 135-142
14. Bewley J.D. & Black M. (1982). *Physiology and Biochemistry of Seeds in Relation to Germination*, vol. 2. Springer, Berlin, p. 375
15. Bhat R.G. & Subbarao K. V. (1999). Host Range Specificity in *Verticillium dahliae*.
16. Bolarin M.C., Fernandez F.G., Cruz V., Cuartero J. (1991). Salinity tolerance in four wild tomato species using vegetative yield salinity response curves. *J. Am. Soc. Horti. Sci.*, 116, p. 286-290
17. Botella M.A., Quesada M.A., Kononowicz A.K., Bressan R.A., Pliego F., Hasegawa P.M., Valpuesta V. (1994). Characterization and in situ localization of a salt-induced tomato peroxidase mRNA. *Plant Molecular Biol.*, 25, p. 105-114
18. Bowers J.H., Nameth S.T., Riedel R.M., Rowe R.C. (1996). Infection and colonization of potato roots by *Verticillium dahliae* as affected by *Pratylenchus penetrans* and *P. crenatus*. *Phytopathology*, 86, p. 614-621
19. Brandt W.H. (1964). Morphogenesis in *Verticillium*: effects of light and ultraviolet radiation on microsclerotia and melanin. *Can. J. Bot.*, 42, p. 2017-2023

20. Buckley P.M., Wyllie T.D., Devay J.E., (1969). Fine structure of conidia and conidium formation in *Verticillium albo-atrum* and *V. nigriscens*, 61, p. 240–250
21. Cano, E.A., Bolarin, M.C., Perez-Alfocea, F., Caro, M., (1991). Effect of NaCl priming on increased salt tolerance in tomato. *J. Horti. Sci.* 66, p. 621-628
22. Caro M., Cruz V., Cuartero J., Estan M.T., Bolarin M.C. (1991). Salinity tolerance of normal and cherry tomato cultivars. *Plant Soil*, 136, 249-255
23. Cerda A. & Bingham F.T. (1978). Yield, mineral composition, and salt tolerance of tomato and wheat as affected by NaCl and P nutrition. *Agrochimica*, 22, p. 140-149
24. Chen P., Lee B., Robb J., (2004). Tolerance to a non-host isolate of *Verticillium dahliae* in tomato. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 64, p. 283-291
25. Cogswell M. E., Zhang Z., Carriquiry A. L., Gunn J. P., Kuklina E. V., Saydah S. H., Yang Q and Moshfegh A. J. (2012). Sodium and potassium intakes among US adults. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 96(3), p. 647–657
26. Cramer M.D. & Lips S.H. (1995). Enriched rhizosphere CO₂ concentrations can ameliorate the influence of salinity on hydroponically grown tomato plants. *Physiologia Plantarum*, 94, p. 425-432
27. Cruz V. & Cuartero J. (1990). Effects of salinity at several developmental stages of six genotypes of tomato (*Lycopersicon* spp.). In: Cuartero, J., Gomez-Guillamon, M.L., Fernandez-Munoz, R., (Eds.), *Eucarpia Tomato 90*, Proc. XIth Eucarpia Meeting on Tomato Genetics and Breeding, Malaga, Spain, p. 81-86.
28. Cuartero J. & Fernández-Munoz R. (1999) Tomato and Salinity. *Scientia Horticulturae*, 78, p. 83-125
29. Cuartero J., Soria T. (1997). Productividad de tomates cultivados en condiciones salinas. *Actas de Horticultura*, 16, p. 214-221
30. Davies J.N. (1964). Effects of nitrogen, phosphorus and potassium fertilizers on the non-volatile organic acids of tomato fruit. *J. Sci. Food and Agric.*, 15, p. 665-673.
31. Diez M.J. & Nuez F. (2008). Tomato In: *Vegetables II: Handbook of Plant Breeding*. J. Prohens and F. Nuez (eds), Springer, New York, p. 249-323

32. Dumbroff E.B. & Cooper A.W. (1974). Effects of salt stress applied in balanced nutrient solutions at several stages during growth of tomato. *Botanical Gazette* 135, p. 219-224
33. Dunlap J.R. & Binzel M.L. (1996). NaCl reduces indol-3-acetyl acid levels in the roots of tomato plants independent of stress-induced abscisic acid. *Plant Physiol.* 112, p. 379-384
34. Dutta B.K. & Isaac. I. (1979). Effects of inorganic amendments (N, P and K) to soil on the rhizosphere microflora of antirrhinum plants infected with *Verticillium dahliae* Kleb. *Plant and Soil*, 52, p. 561-56
35. Dutta B.K. (1981). Studies on some fungi isolated from the rhizosphere of tomato plants and the consequent prospect for the control of *Verticillium*- wilt. *Plant and Soil*, 63, p. 209-216
36. El-Shourbagy M.N. & Ahmed A.M. (1975). Responses of two varieties of tomato to abrupt and gradual short-period sodium chloride exposure. *Plant Soil* 42, 255-271
37. FAOSTAT (2020). Available online at: <http://www.faTo.org/faostat/en/#data>. Accessed 08 Jun 2020
38. FAS/USDA (2003). Processed Tomato Products Outlook and Situation in Selected Countries. Available at: <http://www.fas.usda.gov/http>.
39. Feys B.J. & Parker J.E. (2000). Interplay of signaling pathways in plant disease resistance, *Trends in Genetics*
40. Flowers T.J., Flowers S.A., Greenway H. (1986). Effects of sodium chloride on tobacco plants. *Plant Cell Environ.* 9, p. 645-651
41. Flowers T.J., Flowers S.A., Hijibagheri M.A., Yeo A.R. (1991). Ion accumulation in the cell walls of rice plants growing under saline conditions: evidence for the Oertli hypothesis. *Plant Cell Environ.* 14, p. 319-325
42. Fradin E. & Thomma B. (2006). Physiology and molecular aspects of *Verticillium* wilt diseases caused by *V. dahliae* and *V. albo-atrum*, 7, p. 71–86
43. Fravel D.R. (1989). Biocontrol of *Verticillium* Wilt of Eggplant and Potato, *Vascular Wilt Diseases of Plants*, p. 487–492
44. Ghaffer A. (1988). Biological control of sclerotial diseases. *Biocontrol Plant Disease*, 1, 153-175

45. Ghassemi F., Jakeman A.J., Nix H.A. (1995). Salinisation of Land and Water Resources Human Causes Extent Management and Case Studies. CAB International, Wallingford, Oxon, p. 526
46. Gonzalez-Fernandez J.J. (1996). Tolerancia a la salinidad en el tomate en estado de plantula y enplanta adulta. Tesis doctoral. Córdoba University, p. 269
47. Gonzalez-Fernandez J.J., Cuartero J. (1993). Evolucion de la produccion de cuatro entradas de tomate cultivadas con sal. Actas de Horticultura, 10, p. 1067-1072
48. Green R.J. (1980). Soil factors affecting survival of microsclerotia of *Verticillium dahliae*. Phytopathology, 70, p. 353-355
49. Hall D.A. (1983). The influence of nitrogen concentration and salinity of recirculating solutions on the early-season vigour and productivity of glasshouse tomatoes. J. Horti. Sci., 58, p. 411-415
50. Hammond-Kosack K.E. & Jones J.D. (1996). Resistance gene-dependent plant defense responses. Plant Cell, 8(10)1, p. 773–1791.
51. Harvey, M., Quilley, S. and Beynon, H. (2002). Exploring the Tomato, Transformations of Nature, Society and Economy. Edgar Publishing, Cheltenham, UK, p. 304
52. Henni J.E. (1988). Evaluation of the effectiveness of certain antagonistic fungi against *Verticillium dahliae* Kleb. Cryptogamie, Mycologie, 8, p. 203-207
53. Herman M. A., Restrepo S., Smart C. D., (2007). Defense gene expression patterns of three SAR-induced tomato cultivars in the field. Physiological and Molecular Plant Pathology, 71(4-6), p. 192–200
54. Heuer B., Feigin A. (1993). Interactive effects of chloride and nitrate on photosynthesis and related growth parameters in tomatoes. Photosynthetica, 28, p. 549-554
55. Heuvelink E. (2005). Tomatoes, Wageningen University, The Netherlands, Crop Production Science in Horticulture Series, CAB International
56. Hirrel M.C. & Gardemann J.W. (1980). Improved growth of onion and bellpepper in saline soils by two vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. Soil Sci. Soc. Am. J. 44, p. 654-655
57. Hobson G.E. (1988). Pre- and post-harvest strategies in the production of high quality tomato fruit. Appl. Agric. Res., 3, p. 282-287

58. Huisman O.C. (1982). Interrelations of root growth dynamics to epidemiology of root invading fungi. *Annual Review of Phytopathology* 20, p. 303-327
59. Jaleel C.A., Gopi R., Gomathinayagam M. (2008). Effects of calcium chloride on metabolism of salt-stressed *Dioscorea rotundata*, *Acta biologica Cracoviensia. Series botanica*, 50
60. Jarvis PG. (1980). Stomatal response to water stress in conifers. In: "Adaptation of Plants to Water and High Temperature Stress", NC Turner and PJ Kramer (eds.), John Wiley & Sons, New York
61. Johnson D.A. & Dung J.K.S. (2010). Verticillium wilt of potato – the pathogen, disease and management. *Can. J. Plant Pathol.*, 32, 58–67
62. Johnson R.W., Dixon M.A., Lee D.R. (1992). Water relations of the tomato fruit during growth. *Plant Cell Environ.*, 15, 947-953
63. Jones MM. & Rawson HM (1979). Influence of rate of development of leafwater deficits upon photosynthesis, leaf conductance, water use efficiency and osmotic potential of sorghum. *Physiol. Plant.* 45, p. 103-111
64. Keinath A.P., Fravel D.R., Papavizas C.G. (1981). Potential of *Gliocladium roseum* for biocontrol of *Verticillium dahliae*. *Phytopathology*, 81, p. 644-648
65. Kishor P.B.K., Hong Z., Miao G.H., Hu C.A.A., Verma D.P.S. (1995). Overexpression of pyrroline-5-carboxylate synthase increases proline production and confers osmotolerance in transgenic plants. *Plant Physiol.*, 108, p. 1387-1394
66. Klosterman S.J., Atallah Z.K., Vallad G.E, Subbarao K.V. (2009). Diversity, pathogenicity and management of *Verticillium* Species. *Annu. Rev. Phytopathol.* 47, p. 39–62
67. Lindsey T., Mike D., Hernandez-Perez P. (2002). Verticillium Wilt in Spinach Seed Production. *Plant Dis.* 89, p. 4–11
68. Machado R. M. A. & Serralheiro R. P. (2017). Soil salinity: Effect on vegetable crop growth. Management practices to prevent and mitigate soil salinization. *Horticulturae* 3(2), p. 30
69. Malhotra, M., & Srivastava, S. (2008). Organization of the ipdC region regulates IAA levels in different *Azospirillum brasilense* strains: molecular and functional analysis of ipdC in strain SM. *Environmental Microbiology*, 10(5), p. 1365–1373

70. Marios J.J., Johnson S.A., Dunn M.T., Papavizas G.C. (1982). Biological control of Verticillium wilt of eggplant in the field. *Plant Disease* 66, p. 1166-1168
71. Mass E.V. (1986). Salt tolerance of plants. *Appl. Agric. Res.*, 1, p. 12-26
72. Menary R.C. & Van Stalen J. (1976). Effects of phosphorus nutrition and cytokinins on flowering in the tomato, *Lycopersicon esculentum* Mill. *Austr. J. Plant Physiol.*, 3, p. 201-205
73. Menzies J.D. (1962). Effect of anaerobic fermentation in soil on survival of sclerotia of *Verticillium dahliae* (Abstr.) *Phytopathology*, 52 p. 743
74. Mitchell J.P., Shennan C., Grattan S.R., May D.M. (1991). Tomato fruit yield and quality under water deficit and salinity. *J. Am. Soc. Horti. Sci.* 116, p. 215-221
75. Mizrahi Y. (1982). Effect of salinity on tomato fruit ripening. *Plant Physiol.*, 69, p. 966-970
76. Mizrahi Y., Taleisnik E., Kagan-Zur V., Zohas Y., Offenbach R., Matan E., Golan R. (1988). Asaline irrigation regime for improving tomato fruit quality without reducing yield. *J. Am. Soc. Horti. Sci.*, 113, p. 202-205
77. Munns R. (1993). Physiological processes limiting plant growth in saline soils: some dogmes and hypothesis. *Plant Cell Environ.*, 16, p. 15-24
78. Nanawati G.C. & Maliwal G.L. (1974). Note on the effect of salts on the growth, mineral nutrition and quality of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Indian J. Agric. Sci.*, 43, p. 612-614
79. Nguyen C., Yan W., Le Tacon F., Lapeyrie F. (1992). Genetic variability of phosphate solubilizing activity by monocaryotic and dicaryotic mycelia of the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* (Maire) P.D. Orton, *Plant and soil*. 1992, Vol 143, 2, p. 193-199
80. Olsson S. & Nordbring-Hertz B. (1985). Microsclerotia germination of *Verticillium dahliae* as affected by rape rhizosphere. *FEMS Microbial Ecology*, 31, p. 293-299
81. Papadopoulos I. & Rendig V.V., (1983). Tomato plant response to salinity. *Agron. J.*, 75, p. 696-700
82. Pasternak D., Twersky M., De Malach Y. (1979). Salt resistance in agricultural crops. In: Mussell H., Staples R.C. (Eds.), *Stress Physiology in Crop Plants*. Wiley, New York, p. 127-142

83. Pegg G.F. (1984). The impact of Verticillium diseases in agriculture. *Phytopath. mediterr.*, 23, p. 176-192
84. Perveen, R., Suleria, H. A. R., Anjum, F. M., Butt, M. S., Pasha, I., & Ahmad, S. (2015). Tomato (*Solanum lycopersicum*) Carotenoids and Lycopenes Chemistry Metabolism, Absorption, Nutrition, and Allied Health Claims - A Comprehensive Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 55(7), p. 919–929
85. Plaut Z. (1995). Photosynthesis in plants/crops under water and salt stress. In: “Handbook of Plant and Crop Physiology”, M. Pessarakis (ed.), Marcel Dekker, New York, 27, p. 587-603
86. Powelson, M.L., and R.C. Rowe (1993). Biology and management of early dying of potatoes. *Annual Review of Phytopathology*, 31, p. 111 -126
87. Prieto P., Navarroya C., Valverdecorredor A., Amyotte S.G., Dobinson K.F., Mercadoblanco, J., Segura A., Preston G., Wit P.D. (2010). Colonization process of olive tissues by *Verticillium dahliae* and its in planta interaction with the biocontrol root endophyte *Pseudomonas fluorescens* PICF7. *Microb. Biotechnol.* 2, p. 499–511
88. Prud E.C., Menge J.A., Jarrell W.M. (1984). Improved growth of tomato in salinized soil by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi collected from saline soils. *Mycologia*, 76, p. 74-84
89. Roberts J.A. (2012). Plant growth regulators. Springer Science & Business Media.
90. Sacher R.F. & Staples R.C. (1985). Inositol and sugars in adaptation of tomato to salt. *Plant Physiol.*, 77, p. 206-210
91. Saito T. & Ito H. (1974). Studies on the growth and fruiting in tomato X. Effects of early environmental conditions and cultural treatments on the morphological and physiological development of flower and flower drop 2. Effect of watering, defoliation and application of gibberellin. *J. Jpn. Soc. Horti. Sci.*, 36, p. 281-289
92. Sawinski K., Mersmann S., Robatzek S., Böhmer M. (2013). Guarding the Green: Pathways to Stomatal Immunity. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 26(6), p. 626-632
93. Schenk P. M., Kazan K., Wilson I., Anderson J. P., Richmond T., Somerville S. C., Manners J. M. (2000). Coordinated plant defense responses in *Arabidopsis*

- revealed by microarray analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(21), p. 11655–11660
94. Schnathorst W.C. (1981). Life cycle and epidemiology of *Verticillium*. In: M.E. Mace, A.A. Bell, and C.H. Beckman (Eds.), *Fungal wilt diseases of plants*. Academic Press, New York, p. 81-111
 95. Schreiber L.R., Gregory G.F., Krause C.R., Ichida J.M. (1988). Production, partial purification and antimicrobial activity of novel antibiotic produced by *Bacillus subtilis* isolated from *Ulmus americana*. *Can. J. Bot.*, 66, p. 2338-2346
 96. Serrano R. (1996). Salt tolerance in plants and microorganisms: Toxicity targets and defence responses. *Int. Rev. Cytol.*, 165, p. 1-52
 97. Sharaf A.R. & Hobson G.E. (1986). Effect of salinity on the yield and quality of normal and nonripening mutant tomatoes. *Acta Horticulturae*, 190, p. 175-181.
 98. Siemonsma, J.S. & Piluek, K. (1993). *Prosea: Plant Resources of South- East Asia*, No. 8: Vegetables. Pudoc Scientific Publishers, Wageningen, The Netherlands, p. 1199-1205
 99. Sims, W.L. (1980). History of tomato production for industry around the world. *Acta Horticulturae*, 100, p. 25
 100. Snapp S.S. & Shennan C. (1992). Effects of salinity in root growth and death dynamics of tomato *Lycopersicon esculentum* Mill. *New Phytologist*, 121, p. 71-79.
 101. Soesanto L. (2000). *Ecology and Biological Control of Verticillium dahliae*, PhD Thesis Wageningen University, Wageningen, the Netherlands
 102. Spaepen S., Vanderleyden J., Okon Y. (2009). Plant Growth-Promoting Actions of Rhizobacteria. *Advances in Botanical Research*, 51, p. 283
 103. Strand Larry L. (1998). *Integrated Pest Management for Tomatoes*, fourth edition, University of California, Statewide integrated pest management project, division of agriculture and natural resources, publication 3274
 104. Strogonov B.P. (1964). Practical means for increasing salt tolerance of plants as related to type of salinity in the soil. In: Poljakoff-Mayber, Meyer, A. (Eds.), *Physiological Basis of Salt Tolerance of Plants*, Israel Program for Scientific Translations, Jerusalem, p. 218-244

105. Tahtamouni M.E, Hameed K.M., Saadoun I.M. (2006). Biological Control of *Sclerotinia sclerotiorum* Using Indigenous Chitinolytic Actinomycetes in Jordan, *The Plant Pathology Journal*, Volume 22, 2, p. 107-114
106. Taiz L., Møller I.M., Murphy A., Zeiger E. (2022). *Plant Physiology and Development*, Seventh Edition, Oxford University Press
107. Taiz L. & Zeiger E. (2013). *Φυτοπαθολογία φυτών*, 5th ed. Εκδόσεις Utopia
108. Tavakkoli E., Rengasamy P., McDonald G. K. (2010). High concentrations of Na⁺ and Cl⁻ ions in soil solution have simultaneous detrimental effects on growth of faba bean under salinity stress. *Journal of Experimental Botany*, 61(15), p. 4449-4459
109. Taylor A.G., Motes J.E., Kirkham M.B. (1982). Osmotic regulation in germinating tomato seedlings. *J. Am. Soc. Horti. Sci.*, 107, p. 387-390
110. Taylor, I.B. (1986). Biosystematics of the tomato. In: Atherton, J. and Rudich, G. (eds) *The Tomato Crop. A Scientific Basis for Improvement*. Chapman & Hall, New York, p. 1-34
111. Temple S.H., DeVay J., Forrester L.L. (1973). Temperature effects upon development and pathogenicity of defoliating and nondefoliating pathotypes of *Verticillium dahliae* in leaves of cotton plants. *Phytopathology*, 63, p. 953–958
112. Thomashow L.S., Weller D.M., Bonsall R.F., Pierson L.S. (1990). Production of the antibiotic phenazine-1-carboxylic Acid by fluorescent pseudomonas species in the rhizosphere of wheat. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56, p. 908-12
113. Tjamos E.C. (1989). Problems and Prospects in Controlling *Verticillium* Wilt, *Vascular Wilt Diseases of Plants*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, p. 441–456
114. Tjamos E.C. & Paplomatas E.J. (1987). Effect of soil solarization on the survival of fungal antagonists of *Verticillium dahliae*, EPPO Conference on Strategies and Achievements in the Microbial Control of Plant Diseases, Dijon (FR), p. 27–30
115. Tjamos S.E, Flemetakis E., Paplomatas E.J., Katinakis P (2005). Induction of resistance to *Verticillium dahliae* in *Arabidopsis thaliana* by the biocontrol agent K-165 and pathogenesis-related proteins gene expression. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 18, p. 551-561
116. Van Leperen W. (1996). Effects of different day and night salinity levels on vegetative growth, yield and quality of tomato. *J. Horti. Sci.*, 71, p. 99-111.

117. Van Loon L.C. & Van Strien E. A. (1999). The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 55(2), p. 85–97
118. Wadi J.A. & Easton G.D. (1985). Control of *Verticillium dahliae* by coating potato seed pieces with antagonistic bacteria. In: Parker, C.A., Rovira, A.D. Moore, K.J. and P.T.W. Wong (ed.). *Ecology and management of soilborne plant pathogens*. American Phytopathological Society, St. Paul, p. 134-136
119. Wijnands J. (2003). The international competitiveness of fresh tomatoes, peppers and cucumbers. *Acta Horticulturae*, 611, p. 79-90
120. Wilhelm S. (1955). Longevity of the verticillium wilt fungus in the laboratory and field. *Phytopathology*, 45:18, p. 0-181