

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ

ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΤΗΣ ΑΔΡΟΦΟΥΖΑΡΙΩΣΗΣ ΤΗΣ ΠΕΠΟΝΙΑΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

της φοιτήτριας

Μαΐστρου Σεβαστής

ΑΘΗΝΑ 2011

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Επειδή αυτή η μελέτη δεν θα είχε ολοκληρωθεί χωρίς τη βοήθεια ορισμένων ανθρώπων, θα ήθελα να τους ευχαριστήσω.

Ευχαριστώ θερμά τον επιβλέποντα Καθηγητή του εργαστηρίου Φυτοπαθολογίας κ. Παπλωματά Επαμεινώνδα για την ανάθεση του θέματος της μεταπτυχιακής αυτής μελέτης, καθώς επίσης και για την εμπιστοσύνη, την συμπαράσταση και την υπομονή που υπέδειξε κατά την διεκπεραίωση της. Τον ευχαριστώ επίσης για τις πολύτιμες συμβουλές και παρατηρήσεις του, τον χρόνο που αφιέρωσε και την άψογη συνεργασία μας.

Ευχαριστώ επίσης τον Λέκτορα του εργαστηρίου Φυτοπαθολογίας κ. Τζάμο Σωτήριο για την αμέριστη βοήθεια και συνεισφορά του σε σχέση με την πραγματοποίηση, από την αρχή έως το τέλος, της συγκεκριμένης μεταπτυχιακής μελέτης.

Θα ήθελα ακόμη να ευχαριστήσω τον Επίκουρο Καθηγητή του εργαστηρίου Φυτοπαθολογίας κ. Τσιτσιγιάννη Δημήτριο και την Λέκτορα του εργαστηρίου Μικροβιολογίας κ. Ταμπακάκη Αναστασία, που δέχτηκαν να εξετάσουν και να βαθμολογήσουν την μεταπτυχιακή μου μελέτη.

Τέλος έχω την ανάγκη να ευχαριστήσω όλους τους ανθρώπους του εργαστηρίου Φυτοπαθολογίας για την πολύτιμη βοήθεια τους κατά την εκπόνηση της συγκεκριμένης μεταπτυχιακής μελέτης. Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τους μεταπτυχιακούς φοιτητές Τσολακίδου Μαρία και Στριγγλή Γιάννη, γιατί με βοήθησαν όταν χρειάστηκε και δεν ήταν λίγες φορές.

Το μεγαλύτερο ευχαριστώ το οφείλω στους γονείς μου για την στήριξη και την συμπαράσταση τους όλα αυτά τα χρόνια.

Περιεχόμενα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	4
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	7
1.1 Οι Αδρομυκώσεις	7
1.2 Το γένος <i>Fusarium</i>	8
1.3 Το είδος <i>Fusarium oxysporum</i>	9
1.4 Οι Αδροφουζαριώσεις.....	13
1.5 Η Άμυνα των Φυτών.....	14
Επαγόμενη και Επίκτητη Διασυστηματική Αντοχή των Φυτών	16
1.6 Βιολογική Αντιμετώπιση	18
1.7 Η Αδροφουζαρίωση της Πεπονιάς.....	26
1.8 Ο Βιολογικός Παράγοντας K-165	29
1.9 Τα γονίδια LOX,PAL1 και CHIT1.....	31
1.10 Σκοπός της παρούσας μελέτης.....	32
2. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ.....	34
2.1 Πείραμα 1 ^ο : Μελέτη της αποτελεσματικότητας του βακτηρίου <i>Paenibacillus alvei</i> (στέλεχος K165) ως βιολογικού παράγοντα εναντίον του μύκητα <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>melonis</i>	34
2.1.1. Φυτικό υλικό	34
2.1.2. Παρασκευή της σκόνης επίπασης του μύκητα <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>melonis</i>	34
2.1.3. Παρασκευή αιωρήματος του βακτηρίου K165.....	35
2.1.4. Πείραμα Παθογένειας.....	35
2.2 Πείραμα 2 ^ο : Διερεύνηση της αποτελεσματικότητας διαφορετικών εφαρμογών του στελέχους K-165 εναντίον του <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>melonis</i>	36
2.2.1 Προετοιμασία πειράματος.....	36
2.2.2. Παρασκευή σκόνης επίπασης του βακτηρίου K-165.....	36

2.2.5. Διερεύνηση της αποτελεσματικότητας των διαφορετικών εφαρμογών του K-165.....	36
2.3 Πείραμα 3 ^ο : Μελέτη της πληθυσμιακής πυκνότητας στη ριζόσφαιρα του στελέχους K-165, όταν εφαρμόζεται με διαφορετικές μεθόδους	38
2.3.1 Προετοιμασία πειράματος.....	38
2.3.2 Εκτέλεση πειράματος.....	38
2.4. Πείραμα 4 ^ο : Αξιολόγηση της ικανότητας του στελέχους K-165 να επάγει διασυστηματική (ISR) αντοχή σε φυτά πεπονιάς, μέσω διαφορετικών εφαρμογών	40
2.4.1 Προετοιμασία πειράματος.....	40
2.4.2. Σχεδιασμός των εκκινήτων.....	40
2.4.3. Απομόνωση γονιδιακού DNA από τα φυτά πεπονιού.....	40
2.4.4. Απομόνωση RNA από φυτά Πεπονιού.....	41
2.4.5. Μέτρηση νουκλεϊκών οξέων	42
2.4.6. Αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής.....	42
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	44
3.1. Πείραμα 1 ^ο : Μελέτη της αποτελεσματικότητας του βακτηρίου <i>Paenibacillus alvei</i> (στέλεχος K165) ως βιολογικού παράγοντα εναντίον του μύκητα <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>melonis</i>	44
3.2. Πείραμα 2 ^ο : Διερεύνηση της αποτελεσματικότητας διαφορετικών εφαρμογών του στελέχους K-165 εναντίον του <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>melonis</i>	47
3.3 Πείραμα 3 ^ο : Μελέτη της πληθυσμιακής πυκνότητας στη ριζόσφαιρα του στελέχους K-165, όταν εφαρμόζεται με διαφορετικές μεθόδους	53
3.4. Πείραμα 4 ^ο : Αξιολόγηση της ικανότητας του στελέχους K-165 να επάγει διασυστηματική (ISR) αντοχή σε φυτά πεπονιάς, μέσω διαφορετικών εφαρμογών	56
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ- ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	61
BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	65

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στα πλαίσια αυτής της εργασίας έγινε προσπάθεια να αξιολογηθεί η αποτελεσματικότητα του βακτηρίου *Raenibacillus alvei* (στέλεχος K165) εναντίον του μύκητα *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis*, που προκαλεί την αδροφουζαρίωση της πεπονιάς. Η αποτελεσματικότητα του στελέχους έχει αποδειχθεί σε άλλα συστήματα παθογόνου-ξενιστή, κυρίως εναντίον του μύκητα *Verticillium dahliae*. Έγιναν δοκιμές παθογένειας τόσο για να εκτιμηθεί η ίδια η αποτελεσματικότητα του βιολογικού παράγοντα, όσο και για το ποιος είναι ο ενδεδειγμένος τρόπος εφαρμογής του στα φυτά, ώστε να επιτευχθεί η μέγιστη δυνατή αποτελεσματικότητα, με ταυτόχρονη διερεύνηση της πυκνότητας του πληθυσμού στη ριζόσφαιρα για κάθε μια από τις διαφορετικές εφαρμογές. Επιχειρήθηκε να διερευνηθεί κατά πόσο κάθε εφαρμογή επηρεάζει αυτή την πυκνότητα, αλλά και αν η πυκνότητα με τη σειρά της επηρεάζει την αποτελεσματικότητα του βιολογικού παράγοντα. Τέλος, διερευνήθηκε και η έκφραση τριών σημαντικών για την άμυνα των φυτών γονιδίων, του γονιδίου της LOX(lipoxygenase), της PAL(phenylalanine ammoniac lyase) και της CHIT1(chitinase), ώστε να εκτιμηθεί η ικανότητα του K-165 να επάγει τη διασυστηματική αντοχή φυτών πεπονιού. Το βακτήριο αποδείχθηκε πολύ ικανός ανταγωνιστής του παθογόνου, όμως μόνο όταν εφαρμόστηκε με ριζοπότισμα πριν και μετά το παθογόνο. Η πυκνότητα του φάνηκε ότι δεν επηρεάζει την αποτελεσματικότητά του, σε αντίθεση με το χρόνο που εφαρμόζεται, ο οποίος πρέπει να προηγείται της μόλυνσης. Τέλος, όσο αφορά τα γονίδια που μελετήθηκαν, το K-165 ενεργοποιεί την έκφραση των PAL και CHIT, αλλά όχι και του LOX γονιδίου, όταν εφαρμόζεται σε φυτά πεπονιού. Φαίνεται, άρα, πως υπάρχει επαγωγή των λανθανόντων αμυντικών μηχανισμών των φυτών, όμως μέσα από τη συσσώρευση του σαλικυλικού οξέος.

ABSTRACT

In this study the effectiveness of the bacterium *Paenibacillus alvei* (strain K-165) against *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis*, the pathogen that causes melon wilt, was investigated.

The effectiveness of the strain has been proven in other pathogen-plant host systems, mostly against *Verticillium dahliae*. Pathogenicity tests took place, in order to assess the effectiveness of the biological agent, but also to establish the best way to apply the biological agent to the rhizosphere of the plants, to achieve the maximum effect. At the same time, the population density of K-165 strain at the rhizosphere was evaluated in each and every different application, so as to see if there is any relationship between population density and effectiveness of the biological agent. At last, the expression of three important for the plant's defense genes was studied to determine whether the K-165 strain induce systemic resistance, when applied to melons.

The biological strain was proven capable to act against the melon's wilt pathogen, but only when applied as inoculum to the roots of the plant one week before and one after the infection. There was no correlation between the population density and effectiveness of the biological agent. As for the genes, that were studied, expression was established for the *PAL* and *CHIT1* genes, but not for the *LOX* gene, suggesting that ISR may take place through salicylic acid accumulation.

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ

K-165, *Fusarium oxysprum* f. sp. *melonis*, βιολογική αντιμετώπιση, ISR

KEYWORDS

K-165, *Fusarium oxysprum* f. sp. *melonis*, biological control, ISR

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Οι Αδρομυκώσεις

Αδρομυκώσεις είναι ικανά να προκαλέσουν 5 γένη μυκήτων, τα οποία είναι τα *Ceratocystis*, *Ophiostoma*, *Phoma*, *Fusarium* και *Verticillium*. Τα γένη *Ceratocystis* και *Ophiostoma*, προσβάλλουν κυρίως δασικά φυτά, όπως την αδρομύκωση της βελανιδιάς (*C. fagacearum*) και της φτελιάς (*O. novo-ulmi*), αντίστοιχα. Το *Phoma tracheiphila* προκαλεί την αδρομύκωση των εσπεριδοειδών. Πιο σημαντικά για τα καλλιεργούμενα φυτά είναι τα γένη *Fusarium* και *Verticillium*. Το γένος *Fusarium* και κυρίως το είδος *Fusarium oxysporum* προσβάλλει κατά κύριο λόγο ποώδη φυτά, λαχανικά, ανθοκομικά, βαμβάκι. Μπορεί να προσβάλλει πάνω από 100 είδη φυτών. Οι μύκητες του γένους *Verticillium* και ιδίως τα είδη *Verticillium albo-atrum* και *V. dahliae* προκαλούν αδρομυκώσεις σε ποώδεις και δενδρώδεις καλλιέργειες επίσης σε πάρα πολλά φυτά (Agiros, 2005).

Πρόκειται για ασθένειες καταστροφικές για τα φυτά, που εμφανίζουν πολύ μεγάλη εξάπλωση. Τα συμπτώματα των ασθενειών αφορούν χλωρώσεις, νεκρώσεις, μαράνσεις των φύλλων και συνήθως καταλήγουν στον θάνατο του φυτού-ξενιστή. Ο θάνατος του φυτού μπορεί να επέλθει μέσα σε λίγες εβδομάδες, μπορεί να συμβεί και μετά από χρόνια, σε δενδρώδεις ξενιστές. Τα παθογόνα των αδρομυκώσεων είναι χαρακτηριστικό ότι καθ' όσο εξελίσσεται η ασθένεια αναπτύσσονται και αναπαράγονται μέσα στα αγγεία του ξύλου και ίσως σε κάποια γειτονικά κύτταρα. Στην επιφάνεια των φυτών εμφανίζονται και αρχίζουν να πολλαπλασιάζονται, μόνο όταν νεκρωθεί το φυτό (Agiros, 2005).

Όλες οι αδρομυκώσεις μοιράζονται κάποια κοινά χαρακτηριστικά και όσο αφορά τα συμπτώματα, αλλά και τις διαδικασίες που λαμβάνουν χώρα στο φυτό. Από τα πρώτα συμπτώματα είναι η απώλεια της σπαργής των φύλλων, τα οποία γίνονται μαλακά και χλωρωτικά και στη συνέχεια μαραίνονται, κιτρινίζουν και τελικά νεκρώνονται, ενώ το ίδιο συμβαίνει και με τους νεαρούς βλαστούς. Χαρακτηριστικοί είναι και καστανοί μεταχρωματισμοί, που εμφανίζονται στα αγγεία των προσβεβλημένων φυτών. Οι μεταχρωματισμοί αυτοί μάλλον οφείλονται στην εναπόθεση μελανίνης στα κυτταρικά τοιχώματα και τη χρώση με φαινολικές ουσίες (Pegg, 1981). Μέσα στα αγγεία των φυτών ο μύκητας αναπτύσσεται παράγοντας μυκήλιο και σπόρια, φράσσοντας έτσι το αγγείο. Η απόφραξη των αγγείων οφείλεται σε πήγματα που σχηματίζονται από τη συγκέντρωση και οξείδωση δευτερογενών μεταβολιτών της αποδόμησης των φυτικών κυττάρων από τη δράση ενζύμων των παθογόνων (DeVay, 1989). Η οξείδωση και η

μετατόπιση αυτών των δευτερογενών μεταβολιτών πιστεύεται ότι ευθύνεται και για τον καστανό μεταχρωματισμό των αγγείων του ξύλου (Pegg, 1981; 1989). Σε πολλά φυτά η απόφραξη των αγγείων γίνεται πιο έντονη εξαιτίας της δημιουργίας τυλώσεων από τα γειτονικά παρεγγυματικά κύτταρα και οι οποίες προεξέχουν μέσα στα αγγεία. Οι τυλώσεις, καθώς και κάποιες εναποθέσεις αποτελούν αντίδραση του φυτού στην παρουσία του παθογόνου. Το παθογόνο παράγει επίσης τοξίνες, οι οποίες μεταφέρονται μέσω των αγγείων σε ολόκληρο το φυτό, εμποδίζοντας φυσιολογικές λειτουργίες, όπως η φωτοσύνθεση και η διαπνοή (Agris, 2005).

1.2 Το γένος *Fusarium*

Το γένος *Fusarium* είναι ένα από τα πλέον σημαντικά από οικονομικής άποψης γένη μυκήτων, εξαιτίας της ικανότητας του να προκαλεί ασθένειες στα φυτά, αλλά και της πιθανής παραγωγής τοξινών, που επηρεάζουν τα ζώα και τον άνθρωπο και θεωρούνται καρκινογόνες. Επιπλέον, ορισμένα είδη είναι ικανά να επηρεάζουν απευθείας και τον άνθρωπο, ιδιαίτερα ασθενείς που βρίσκονται σε ανοσοκαταστολή. Είδη του γένους συναντώνται σε όλο τον κόσμο, ωστόσο δεν είναι όλα τα είδη κοσμοπολίτικα, αφού ορισμένα κυριαρχούν σε ψυχρότερες περιοχές και άλλα σε τροπικές και υποτροπικές. Στα φυτά τα είδη του γένους *Fusarium* μπορούν να προκαλέσουν μεγάλο εύρος ασθενειών. Θεωρείται πως όλα σχεδόν τα καλλιεργούμενα φυτά μολύνονται από ένα τουλάχιστον είδος του γένους. Μάλιστα είναι πολλές οι περιπτώσεις που οι επιδημίες που έχουν προκαλέσει αυτά τα είδη αποδείχθηκαν καταστροφικές για συγκεκριμένες καλλιέργειες ολόκληρων περιοχών, π.χ. η καλλιέργεια της μπανάνας το 1960 στον Παναμά κόντεψε να καταστραφεί ολοσχερώς έπειτα από προσβολή από το μύκητα *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*.

Τα πρώτα χρόνια που ακολούθησαν την ταυτοποίηση του γένους από τον Link, ως μοναδικό κριτήριο για την κατάταξη ενός είδους στο γένος *Fusarium* ήταν ο σχηματισμός ή μη των χαρακτηριστικών μακροκονιδίων. Αυτό οδήγησε στο να φτάσει το γένος να αποτελείται από περίπου 1000 είδη. Τάξη σε αυτό το χάος θέλησαν να βάλουν οι Wollenweber και Reinking στα μέσα του 1930 θέτοντας τις βάσεις των πολυάριθμων συστημάτων ταξινόμησης που ακολούθησαν (Wollenweber & Reinking, 1935). Σύμφωνα με αυτό το γένος χωρίστηκε σε 16 τμήματα και αποτελούνταν από 65 είδη και 77 υποείδη. Κάθε τμήμα περιείχε είδη όμοια σε κρίσιμα μορφολογικά χαρακτηριστικά, όπως η μορφή των μακροκονιδίων και περιλάμβανε ελάχιστα είδη.

Το παραπάνω σύστημα αν και μείωσε κατά πολύ τον αριθμό των ειδών στήριζε την κατάταξη τους στην πραγματικότητα στις διαφορές των ειδών παρά στις ομοιότητες. Τις δεκαετίες του 1940 και 1950 οι Snyder και Hansen μείωσαν τον αριθμό των ειδών σε μόλις 9 (Snyder & Hansen, 1940, 1941, 1945, 1954). Τα είδη αυτά ήταν τα εξής: *F. oxysporum*, *F. solani*, *F. moniliforme*, *F. roseum*, *F. lateritium*, *F. tricinctum*, *F. nivale*, *F. rigidiuscula*, και *F. episphaeria*. Έκτοτε ακολούθησαν πολλά και διαφορετικά συστήματα ταξινόμησης, τα οποία διέφεραν τόσο στα είδη που περιελάμβαναν, όσο και στα κριτήρια που χρησιμοποιούσαν. Τα τελευταία 60 χρόνια η ταξινόμηση του γένους *Fusarium* έχει επηρεαστεί από δύο σχολές: την Ευρωπαϊκή, στην οποία καταγράφηκαν πάνω από 65 είδη, με βάση λεπτομερείς μορφολογικές διαφοροποιήσεις, και την Αμερικάνικη με 9 μόνο είδη, αν και τα τελευταία χρόνια έχει αποδειχθεί ότι τελικά ήταν περισσότερα. Αν και οι δύο σχολές έχουν πλησιάσει πολύ η μια την άλλη υπάρχουν αρκετές δυσκολίες στην απόλυτη συμφωνία τους.

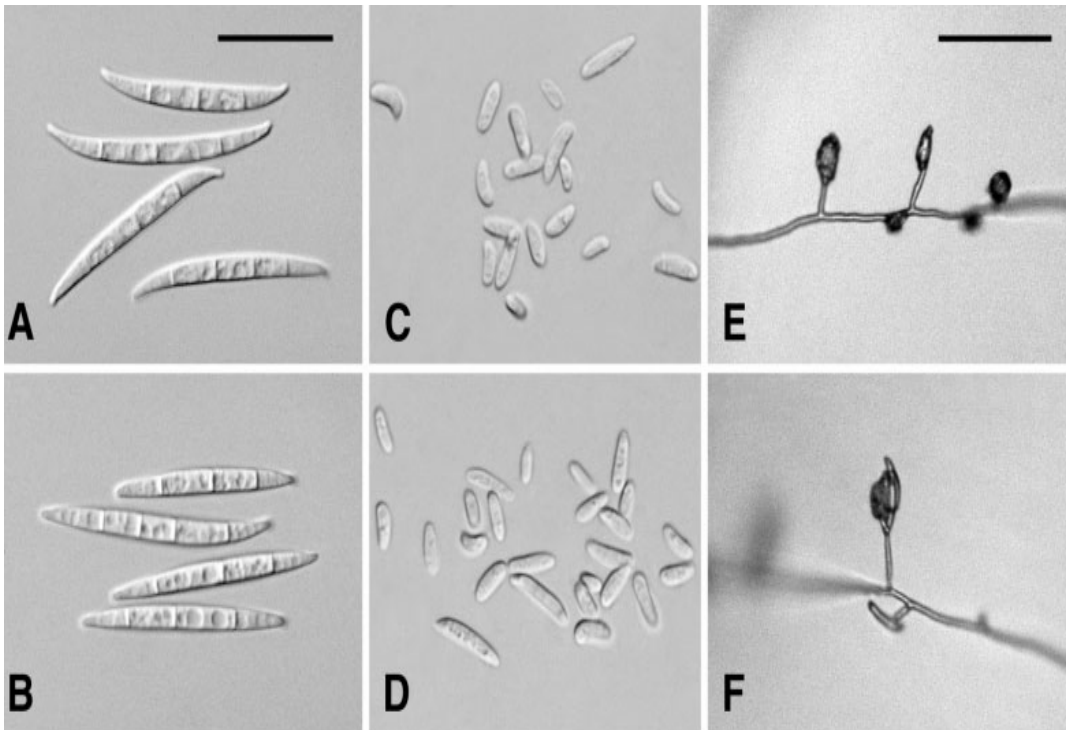
1.3 Το είδος *Fusarium oxysporum*

Το είδος *Fusarium oxysporum* είναι ένα κοσμοπολίτικο είδος και σημαντικό παθογόνο των αδρομυκώσεων-αδροφουζαριώσεων στη συγκεκριμένη περίπτωση. Είναι το πλέον διαδεδομένο από τα είδη του γένους *Fusarium* και μπορεί να ανακτηθεί από σχεδόν όλα τα εδάφη, από τη Αρκτική μέχρι τους τροπικούς, ακόμα και στην έρημο, είτε καλλιεργούνται είτε όχι. Μπορεί να διασπαρθεί με τα έντομα, να το βρούμε σε θαλάσσια άλγη. Είναι αναμφίβολα το πιο σημαντικό από οικονομικής άποψης είδος του γένους, δεδομένων των πολλών ξενιστών του και των απωλειών που προκαλεί όταν προσβάλλει ένα φυτό. Η μεγάλη του διασπορά και η οικονομική του σημασία το καθιστούν ένα από τα πλέον μελετημένα είδη, με περίπου 6000 άρθρα να έχουν δημοσιευτεί. Εκτός από τα φυτά φαίνεται ότι μπορεί να επηρεάσει άμεσα και τον άνθρωπο, προκαλώντας επιπεφυκίτιδες, δερματίτιδες και πιο σοβαρές μολύνσεις σε ασθενείς με προβλήματα στο ανοσοποιητικό τους σύστημα. Είναι εξάλλου κοινό παθογόνο στα νοσοκομεία. Ο γενικός κανόνας είναι ότι το είδος δεν παράγει μυκοτοξίνες, όπως άλλα είδη *Fusarium*, αν και έχουν βρεθεί κάποια στελέχη που παρήγαγαν μυκοτοξίνες.

Το είδος *Fusarium oxysporum* περιλαμβάνει στελέχη σαπροφυτικά, παθογόνα και μη παθογόνα, ικανά να επιβιώσουν και να αναπτυχθούν για μεγάλα χρονικά διαστήματα στην οργανική ύλη του εδάφους και τη ριζόσφαιρα πολλών φυτών (Garrett, 1970). Τα στελέχη που προκαλούν αδρομυκώσεις χαρακτηρίζονται από πάρα πολύ μεγάλη εξειδίκευση ως προς το φυτό-ξενιστή. Τις περισσότερες φορές δεν μολύνουν ούτε καν συγγενικά φυτά του φυτού-ξενιστή. Τα στελέχη

αυτά διακρίνονται σε ειδικές μορφές, ανάλογα με το φυτό που προσβάλλουν, ενώ υπάρχει και μια περαιτέρω διάκριση σε φυλές, που σχετίζεται με την ποικιλία που προσβάλλουν. Το γένος είναι εξαιρετικά ετερογενές και πιστεύεται πως στην πραγματικότητα πρόκειται για περισσότερα του ενός είδη. Σήμερα, μέσα στο είδος υπάρχουν πάνω από 120 ειδικές μορφές.

Όπως γίνεται αντιληπτό η ταξινόμηση όχι μόνο του γένους *Fusarium*, αλλά και του είδους *Fusarium oxysporum* είναι εξαιρετικά δύσκολη. Επειδή η τέλεια μορφή των στελεχών του είδους παραμένει άγνωστη, η ταξινόμηση του βασίζεται σε μορφολογικά χαρακτηριστικά της ατελούς μορφής, όπως είναι το μέγεθος και το σχήμα των μακροκονιδίων, η παρουσία ή η απουσία μικροκονιδίων και χλαμυδοσπορίων, το χρώμα των αποικιών και η δομή των κονιδιοφόρων (Windels, 1992). Το πόσο δύσκολη είναι η ταξινόμηση ενός είδους με βάση τα παραπάνω κριτήρια αποδεικνύεται από τα πολλά και διαφορετικά συστήματα, που έχουν προταθεί, όπου μπορεί να αναγνωρίζουν από 30 έως 101 είδη ανάλογα (Booth, 1971; Gerlach & Nirenberg, 1982; Nelson *et al.*, 1983). Βάσει μορφολογικών κριτηρίων είναι πολύ δύσκολο να διακριθούν μεταξύ τους τα είδη του *F. oxysporum* από είδη που ανήκουν στα *Elegans* and *Liseola*, ενώ είναι σχεδόν αδύνατη η διάκριση ανάμεσα στα παθογόνα, σαπροφυτικά και βιολογικούς παράγοντες στελέχη του *F. oxysporum*.



Εικ. 1: *Fusarium oxysporum*

A-B: μακροκονίδια; **C-D:** μικροκονίδια; **E-F:** μικροκονίδια *in situ* (προσαρμογή από “the *Fusarium* Laboratory Manual”, Leslie & Summerel, p. 212)

Μέχρι σήμερα έχουν προταθεί διάφορα συστήματα και κριτήρια, για την καλύτερη ταξινόμηση και ταυτοποίηση των ειδικών μορφών, πέρα από τα μορφολογικά χαρακτηριστικά. Το 1985 ο Puhalla πρότεινε ένα σύστημα ταξινόμησης, που βασίζονταν στην συμβατότητα των στελεχών κατά την αγενή αναπαραγωγή και τα κατέταξε σε ομάδες βλαστικής συμβατότητας (vegetative compatibility group VCG). Απομονώσεις που είναι συμβατές ως προς τον αγενή πολλαπλασιασμό σχηματίζουν ένα σταθερό ετεροκάρυο μυκήλιο, ενώ απομονώσεις ασύμβατες ένα ετεροκάρυο μυκήλιο ασταθές ή/και παροδικό. Αν και έχει κάποια χρησιμότητα αυτή η κατάταξη παρουσιάζει σοβαρά μειονεκτήματα, αφού όπως έχει αποδειχθεί τα στελέχη μιας ειδικής μορφής να ανήκουν σε μια και μόνο ή σε πάνω από μια τέτοια ομάδα (Kistler *et al.*, 1998). Παρόμοια είναι και η κατάσταση και για τα μη παθογόνα στελέχη. Τα στελέχη μιας απομόνωσης μπορεί να ανήκουν σε μία ομάδα, αλλά να είναι και ασύμβατα (Gordon & Okamoto, 1992; Kondo *et al.*, 1997; Steinberg *et al.*, 1997). Ακόμα και αν δυο στελέχη βρίσκονται στην ίδια ομάδα συμβατότητας ως προς την αγενή αναπαραγωγή αυτό δεν αποτελεί εγγύηση γενετικής ομοιομορφίας, αφού μπορεί να κουβαλούν μόρια μιτοχονδριακού DNA με παρόμοια ή εντελώς διαφορετική αλληλουχία. Όμως και μια συγκεκριμένη αλληλουχία μιτοχονδριακού DNA μπορεί επίσης να βρεθεί σε στελέχη βλαστικά ασύμβατα. Αυτά που είναι συνήθως συντηρημένα στα συμβατά στελέχη είναι τα χαρακτηριστικά ανάπτυξης και τα πρότυπα χρήσης των πηγών άνθρακα.

Τόσο για την αναγνώριση των ειδών όσο και τον καθορισμό των εξελικτικών σχέσεων μεταξύ τους οι ερευνητές έχουν στραφεί πλέον στη χρήση μοριακών τεχνικών και δεικτών. Έχουν προταθεί για αυτό τον σκοπό πολλές και διαφορετικές αλληλουχίες γονιδίων. Χρήσιμη για την διάκριση κάποιων στελεχών φάνηκε η αλληλουχία της β-τουμπουλίνης (O'Donnell *et al.*, 2000), ενώ των ITS περιοχών δεν βοήθησε αρκετά (O'Donnell & Cigelnik, 1997). Με τη συνδυασμένη χρήση των RFLP (restriction fragment length polymorphism) και VCG's οι Rosewich *et al* το 1999 βρήκαν ότι το στέλεχος *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* μεταφέρθηκε στην Ευρώπη από τη Φλώριδα. Ο Assigbetse *et al.* το 1994 χρησιμοποιώντας την τεχνική του RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA) μπόρεσε να διακρίνει τις φυλές του *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* στο βαμβάκι.

Αν και οι μοριακές τεχνικές είναι ικανές να ταυτοποιήσουν τα παθογόνα στελέχη ακόμα και τις φυλές αυτών, η ταυτοποίηση των ειδικών μορφών απαιτεί τη χρήση βιοδοκιμών. Ο μύκητας ελέγχεται για την παθογένεια του σε διάφορα είδη φυτών, ενώ οι διαφορετικές ποικιλίες ενός είδους χρησιμοποιούνται για να καθορισθεί η φυλή. Οι βιοδοκιμές αυτές αν και χρήσιμες έχουν δύο μεγάλα μειονεκτήματα. Όσο αφορά τον χαρακτηρισμό των παθογόνων στελεχών είναι

χρονοβόρες, ενώ δεν είναι αξιόπιστες για τον χαρακτηρισμό των μη παθογόνων. Όταν έχουν αναγνωριστεί πάνω από 120 ειδικές μορφές και φυλές για το είδος, κάθε απομόνωση θα έπρεπε να υποβάλλεται σε έναν άπειρο αριθμό βιοδοκιμών, κάτι που δεν είναι εφικτό. Είμαστε υποχρεωμένοι, άρα, να δεχτούμε ότι τα μη παθογόνα στελέχη είναι στελέχη που απέτυχαν να προκαλέσουν ασθένεια στον περιορισμένο αριθμό ξενιστών, στους οποίους εμβολιάστηκαν. Η σωστή κατάταξη και ταυτοποίηση ενός παθογόνου είναι πολύ σημαντική, γιατί διευκολύνει τόσο τη μελέτη του όσο και την αναγνώριση του στον αγρό. Συγκεκριμένα, για το *Fusarium oxysporum*, η πολύ μεγάλη εξειδίκευση του και η εισαγωγή νέων ποικιλιών σε μια περιοχή κάνει ακόμα πιο σημαντική την παραπάνω διαδικασία.

Φυσιολογικές μελέτες σχετικά με την αλληλεπίδραση παθογόνου-ξενιστή όσο αφορά το *F. oxysporum* δεν είναι συνήθειες, όμως πιστεύεται ότι εμπλέκονται αρκετοί και διαφορετικοί μηχανισμοί. Μερικά στελέχη του είδους είναι παθογόνα απέναντι στην *Arabidopsis* και έτσι κάποιες από τις πρωτεΐνες και άλλα μόρια που εμπλέκονται έχουν αναγνωριστεί. Θα αναφερθούν ενδεικτικά κάποια από αυτά.

Η MAP κινάση, βρέθηκε ότι είναι απαραίτητη για κάποια στελέχη του *Fusarium oxysporum*, ώστε να είναι παθογόνα. Σε μελέτες που έγιναν με στελέχη, που δεν μπορούσαν να παράγουν την πρωτεΐνη, φάνηκε ότι η υφή διεισδύσεως του μύκητα δεν ήταν ικανή να προσδεθεί στη ρίζα του φυτού και ότι η ανάπτυξη του μύκητα στους ιστούς του φυτού ήταν προβληματική (Di Pietro *et al.*, 2001). Ακόμα βρέθηκε ότι η υφή διεισδύσεως διαβρέχεται εύκολα, κάτι που πιθανόν να σημαίνει μικρή περιεκτικότητα σε υδροφοβίνες, μια τάξη πρωτεϊνών απαραίτητη για την προσκόλληση του μύκητα στις ρίζες (Wosten *et al.*, 1994).

Σχετικά, με τα ένζυμα που εκκρίνει ο μύκητας, ώστε να ξεπεράσει το εμπόδιο του κυτταρικού τοιχώματος (CWDE, cell wall degrading enzymes), η κατάσταση δεν είναι ξεκάθαρη. Ένα παράδειγμα είναι ότι, ενώ η κυριότερη από τις ενδοπολυγαλακτορουνάσες που εκκρίνει το *Fusarium oxysporum* είναι η PG1 (Di Pietro *et al.*, 1996), στελέχη του *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* με ελαττωματικό το αντίστοιχο γονίδιο δεν είχαν μειωμένη παθογένεια (Di Pietro *et al.*, 1998), προφανώς γιατί υπάρχουν περισσότερα του ενός γονίδια που κωδικοποιούν πολυγαλακτορουνάσες. Με τις πηκτινικές λυάσες φαίνεται επίσης ότι η απενεργοποίηση ενός γονιδίου δεν αρκεί να μειώσει την μολυσματική ικανότητα του μύκητα, όταν όμως έγινε ταυτόχρονη απενεργοποίηση δύο PL γονιδίων, τότε μειώθηκε σημαντικά η μολυσματική ικανότητα του μύκητα *Fusarium solani* f.sp. *pisi* (Rogers *et al.*, 2000). Οι ξυλανάσες και οι πρωτεάσες φαίνεται ότι δεν παίζουν ρόλο στην παθογένεια του μύκητα (Gomez *et al.*, 2001; 2002, Di Pietro *et al.*, 2001), όμως εκφράζονται καθ' όλη τη διάρκεια της προσβολής.

Απενεργοποίηση του γονιδίου της πρωτεϊνικής κινάσης μη καταβολισμού της σακχαρόζης (*SNFI*, sucrose non-fermenting 1), που ελέγχει την έκκριση διαφόρων κυτταρολυτικών ενζύμων, οδήγησε σε μειωμένη παραγωγή τους και τελικά μειωμένη μολυσματικότητα (Ospina & Giraldo, 2003).

Όσο αφορά τις αντιδράσεις του παθογόνου στην άμυνα του φυτού υπάρχουν αναφορές στελεχών του είδους σχετικά με την ικανότητα τους να υποβαθμίζουν αρκετές ουσίες, που συνθέτουν τα φυτά για να προστατευτούν. Τόσο το *F. oxysporum* όσο και το *F. solani* μπορούν να αποδομήσουν την α-τοματίνη -μια φυτοαλεξίνη που συνθέτει η τομάτα- με τη διαφορά ότι τα γονίδια στα δύο στελέχη διαφέρουν και υπάρχει ένα πολυκλωνικό αντίσωμα που αναγνωρίζει το ένζυμο από το *F. oxysporum*, αλλά όχι και από το *F. solani* (Lairini *et al.*, 1997;1997;1998). Η δράση της συνθάσης της χιτίνης είναι επίσης απαραίτητη για την πλήρη έκφραση της παθογένειας στελεχών του είδους (Martin-Udiroz *et al.*, 2004). Τέλος το φουζαρικό οξύ θεωρείται ως ένα βαθμό καθοριστικό στην σήψη του βολβού του γένους *Gladiolus* spp (Remotti *et al.*, 1996), όμως δεν είναι ξεκάθαρος ο ακριβής ρόλος του στην παθογένεια.

1.4 Οι Αδροφουζαριώσεις

Το *Fusarium oxysporum*, όπως ειπώθηκε και παραπάνω, είναι εδαφογενής μύκητας και έτσι έχει την ικανότητα να επιβιώνει στο έδαφος απουσία ξενιστή για μεγάλα χρονικά διαστήματα, μέσω των γλαμυδοσπορίων. Τα γλαμυδοσπόρια είναι αγενή σπόρια, ανθεκτικά, μέσω των οποίων επιβιώνει ο μύκητας σε δυσμενείς συνθήκες. Στην πραγματικότητα αν ένα έδαφος μολυνθεί από τον μύκητα, τότε θα παραμείνει για πάντα μολυσμένο (Agiros, 1997).

Όταν οι ρίζες των φυτών πλησιάζουν τα γλαμυδοσπόρια του μύκητα, οι εκκρίσεις τους προκαλούν την βλάστηση τους και οι υφές που προκύπτουν προσκολλώνται στις ρίζες των φυτών (Bishop and Cooper, 1983b; Di Pietro *et al.*, 2001a). Η διείσδυση μπορεί να είναι είτε άμεση (Rodriguez-Gálvez and Mendgen, 1995) είτε μέσω πηλγών και στην περιοχή των ακρορριζίων (Agiros, 2005). Το μυκήλιο τότε προχωρά μεσοκυτταρικά στο φλοιό της ρίζας, έως ότου φτάσει στα αγγεία του ξύλου, όπου εισέρχεται από τα βοηθία (Bishop and Cooper, 1983b). Από εδώ και πέρα ο μύκητας βρίσκεται πλέον μόνο μέσα στα αγγεία του ξύλου, χρησιμοποιώντας τα για να αποικίσει ολόκληρο το φυτό (Bishop and Cooper, 1983a). Αυτό επιτυγχάνεται μέσω της παραγωγής μικροκονιδίων, τα οποία μεταφέρονται από τον ανιόντα χυμό. Τα μικροκονίδια αυτά με τη σειρά τους βλαστάνουν και το μυκήλιο που δίνουν διατρύπα τα ανώτερα τοιχώματα των αγγείων, παράγοντας περισσότερα μικροκονίδια στο επόμενο αγγείο.

Τα χαρακτηριστικά συμπτώματα μάρανσης οφείλονται σε έλλειψη νερού, κυρίως λόγω απόφραξης των αγγείων. Η μάρανση είναι το αποτέλεσμα συνδυασμού δραστηριοτήτων του παθογόνου και αντιδράσεων του φυτού στη μόλυνση, όπως η συσσώρευση μέσα στο αγγείο μυκηλίου και τοξινών, από τη πλευρά του μύκητα, και πηγμάτων, κόμμεων και τυλώσεων από το φυτό, που με αυτό τον τρόπο προσπαθεί να ανακόψει την εξάπλωση του παθογόνου, καθώς και την κατάρρευση των αγγείων εξαιτίας του πολλαπλασιασμού των γειτονικών παρεγχυματικών κυττάρων (Beckman, 1987).

Για όσο διάστημα το φυτό είναι ζωντανό ο μύκητας παραμένει αποκλειστικά μέσα στα αγγεία του φυτού και σε κάποια γειτονικά κύτταρα. Μόνο όταν το φυτό νεκρωθεί περνάει στον παρεγχυματικό ιστό και πολλαπλασιάζεται στην επιφάνεια του φυτού. Το *F. oxysporum* κατέχει λοιπόν μια πολύ εξειδικευμένη οικολογική θέση, την οποία μοιράζεται μόνο μερικά άλλα παθογόνα, όπως τα *Verticillium dahliae* και *Ceratocystis ulmi* (Agrios, 1997).

Η επιτυχής μόλυνση από το *Fusarium oxysporum* είναι ένα πολύ σύνθετο φαινόμενο, το οποίο απαιτεί: 1) την αναγνώριση των ριζών μέσω άγνωστων ουσιών σημάτων 2) την προσκόλληση στις ρίζες και την διαφοροποίηση σε υφή διεισδύσεως 3) διάτρηση του φλοιού της ρίζας και υποβάθμιση των φυσιολογικών φραγμών του ξενιστή, όπως η ενδοδερμίδα, ώστε να φτάσει στα αγγεία του ξύλου 4) προσαρμογή στο περιβάλλον του ξενιστή, που συμπεριλαμβάνει και την ανθεκτικότητα στις όποιες αντιμικροβιακές ουσίες 5) πολλαπλασιασμό των υφών και παραγωγή μικροκονιδίων μέσα στα αγγεία του ξύλου 6) έκκριση των καθοριστικών για την παθογένεια παραγόντων, όπως μικρά πεπτίδια και τοξίνες

Παραπάνω αναφέρθηκαν κάποιες μελέτες σχετικές με τους μηχανισμούς αυτούς και τα αποτελέσματά τους, όμως, όπως ειπώθηκε, οι γνώσεις μας είναι ακόμη περιορισμένες.

1.5 Η Άμυνα των Φυτών

Τα φυτά είναι αναγκασμένα συνεχώς να υπερασπίζονται τους εαυτούς τους εναντίον επιθέσεων από βακτήρια, ιούς, μύκητες, εχθρούς, ακόμα και άλλα φυτά. Εξαιτίας της αδυναμίας κίνησης, για τα φυτά δεν υπάρχει η προοπτική της διαφυγής από τον κίνδυνο, όπως για τα σπονδυλωτά. Αυτό έχει οδηγήσει σε μια βασική διαφορά στον τρόπο που αμύνονται. Στα φυτά κάθε κύτταρο κατέχει μια προϋπάρχουσα ή επαγόμενη αμυντική ικανότητα, σε αντίθεση με τα θηλαστικά όπου μόνο εξειδικευμένα κύτταρα αναλαμβάνουν την άμυνα του οργανισμού. Παρόλα αυτά πρόκειται για ένα αποτελεσματικό αμυντικό σύστημα, αφού όσο αφορά φυσικούς πληθυσμούς η ασθένεια δεν παύει να είναι η εξαίρεση και όχι ο κανόνας.

Υπάρχουν τέσσερις βασικοί λόγοι για τους οποίους ένα παθογόνο αποτυγχάνει να μολύνει ένα φυτό και να προκληθεί ασθένεια: 1) το φυτό που δέχεται επίθεση δεν είναι ικανό να υποστηρίξει την επιβίωση του συγκεκριμένου παθογόνου και έτσι θεωρείται μη ξενιστής 2) το φυτό διαθέτει τους απαραίτητους δομικούς φραγμούς ή δευτερογενείς μεταβολίτες, ώστε να μπορεί να περιορίσει την ανάπτυξη του συγκεκριμένου παθογόνου 3) το φυτό αναγνωρίζει το παθογόνο και ενεργοποιεί αμυντικούς μηχανισμούς περιορίζοντας την περαιτέρω εξάπλωση του 4) μεταβάλλονται δυσμενώς οι περιβαλλοντικές συνθήκες πριν το παθογόνο μολύνει το φυτό στο επίπεδο που να μην επηρεάζεται από εξωγενείς παράγοντες. Οι τρεις πρώτοι παράγοντες αντιπροσωπεύουν γενετική ασυμβατότητα μεταξύ παθογόνου και φυτού-ξενιστή και αφορούν το αμυντικό μηχανισμό των φυτών.

Τα φυτά έχουν αναπτύξει ένα παθητικό αμυντικό σύστημα καθώς και έναν εγγενή ενεργητικό μηχανισμό άμυνας. Όσο αφορά το παθητικό αμυντικό σύστημα αυτό περιλαμβάνει κυρίως την ύπαρξη δομών και κατασκευών που δρουν ως φραγμοί και τοξινών που εμποδίζουν την εξάπλωση του παθογόνου. Ο εγγενής ενεργητικός μηχανισμός άμυνας διαφοροποιείται βιοχημικά στο βασικό ανοσοποιητικό σύστημα (basal innate immune system) και στο ανοσοποιητικό σύστημα των γονιδίων ανθεκτικότητας (resistance (R) - gene-mediated innate immune system), τα οποία ενεργοποιούνται 10-30min μετά την επαφή με το παθογόνο και 2-3h, αντίστοιχα.

Το αμυντικό σύστημα των φυτών θα μπορούσε να θεωρηθεί ότι αποτελείται από 4 φάσεις. Η πρώτη αφορά την αναγνώριση των PAMPs από τις διακυτταρικές πρωτεΐνες-υποδοχείς αναγνώρισης (pattern recognition receptors, PRRs) και την ενεργοποίηση της βασικής ανθεκτικότητας των φυτών, με σκοπό τον περιορισμό της εξάπλωσης του παθογόνου. Στη δεύτερη φάση κάποια παθογόνα παράγουν ειδικούς διεγέρτες, τους τελεστές ή αλλιώς γόνους αμολυσματικότητας (Avr), που μπορούν να παρέμβουν στη βασική ανοσοποίηση οδηγώντας σε ευαισθησία του φυτού στο παθογόνο. Αυτή η ανθεκτικότητα είναι εξειδικευμένη ως προς το παθογόνο. Στην τρίτη φάση οι ειδικές πρωτεΐνες, προϊόντα των γόνων ανθεκτικότητας (R genes), αναγνωρίζουν αυτούς τους ειδικούς διεγέρτες, όπου και μέσω των κατάλληλων σημάτων ενεργοποιείται το εγγενές αμυντικό σύστημα των φυτών. Το αποτέλεσμα είναι ανθεκτικότητα του φυτού, που μπορεί να έχει τη μορφή Αντίδρασης Υπερευαισθησίας (Hypersensitive Response, HR) μπορεί και κάποια άλλη μορφή. Στην τελευταία φάση η φυσική επιλογή καθιστά τα παθογόνα ικανά να αποφύγουν την ενεργοποίηση του αμυντικού συστήματος των φυτών, είτε απορρίπτοντας είτε διαφοροποιώντας το συγκεκριμένο γόνο μολυσματικότητας ή ενεργοποιώντας επιπλέον γόνους. Η φυσική επιλογή, όμως, οδηγεί και τα φυτά στο να κάνουν ακριβώς το ίδιο με τους γόνους ανθεκτικότητας (Jones & Dangl, 2006).

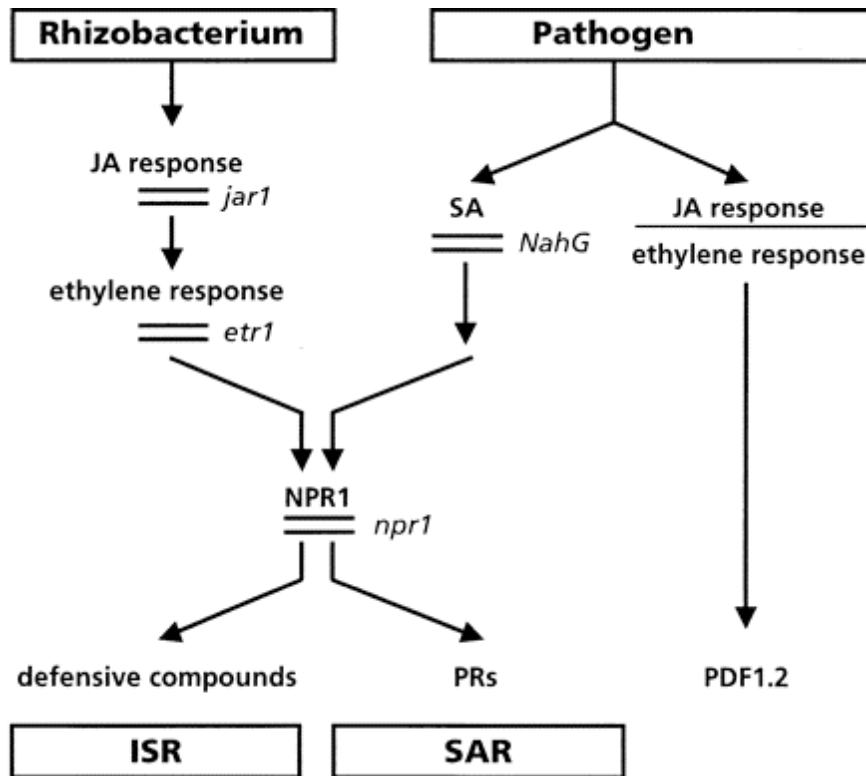
Οι ακριβείς μηχανισμοί και αλληλεπιδράσεις που λαμβάνουν χώρα κατά τις παραπάνω διαδικασίες πάνε πέρα από τους σκοπούς αυτής της εργασίας.

Επαγόμενη και Επίκτητη Διασυστηματική Αντοχή των Φυτών

Πρόκειται για την διέγερση των λανθανόντων μηχανισμών άμυνας των φυτών, έτσι ώστε ένα φυτό, το οποίο είναι ευπαθές σε ένα παθογόνο να καθίσταται πλέον ανθεκτικό. Διαχωρίζεται σε Επίκτητη Διασυστηματική Αντοχή (systemic acquired resistance, SAR) και σε Επαγόμενη Διασυστηματική Αντοχή (induced systemic resistance, ISR). Η αντοχή αυτή μπορεί να είναι τοπικού ή συστηματικού χαρακτήρα. Η αναφορά στη SAR θα είναι πολύ σύντομη. Για να συμβεί πρέπει η αρχική μόλυνση με ένα παθογόνο να οδηγήσει σε σχηματισμού νεκρωτικού ιστού, είτε ως σύμπτωμα είτε ως αποτέλεσμα της Αντίδραση Υπερευαισθησίας. Ενεργοποιείται, όμως, και από κάποια χημικά μόρια. Συνήθως αφορά την έκφραση των πρωτεϊνών παθογένεσης (PR proteins) και οξειδωτικών ενζύμων. Σημαντικό ρόλο θεωρείται ότι έχει το σαλικυλικό οξύ (Salicylic Acid, SA).

Η Επαγόμενη Διασυστηματική Αντοχή προκαλείται από τα ριζοβακτήρια, που αποικίζουν τις ρίζες του φυτού. Αν και είχαν αναφερθεί αρκετά περιστατικά που ο αποικισμός των ριζών από αυτά τα βακτήρια οδηγούσε σε μείωση της εμφάνισης και της σοβαρότητας της ασθένειας σχετικά πρόσφατα άρχισε να μελετάται ο ακριβής ρόλος τους. Η επαγωγή των λανθανόντων μηχανισμών αντοχής στα φυτά από τα ριζοβακτήρια περιγράφηκε για πρώτη φορά από τον van Peer και τους συνεργάτες του το 1991, όταν εμβολίασε φυτά γαρυφαλλιάς με το στέλεχος WCS417 και παρατήρησε ότι το φυτό είχε αναπτύξει συστηματική προστασία στο παθογόνο *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* και τον Wei την ίδια χρονιά, που παρατήρησε ότι 6 από τα 94 στελέχη ριζοβακτηρίων που εφάρμοσε σε φυτά αγγουριάς, προστάτευαν το φυτό από τον μύκητα *Colletotrichum orbiculare*. Η επαγόμενη αυτή αντοχή μπορεί να έχει τοπική ή συστηματική μορφή (Van Loon 2000). Αυτή η μορφή αντοχής στα παθογόνα δεν είναι εξειδικευμένη, όπως η άμυνα μέσω των γόνων ανθεκτικότητας (R genes). Από τη στιγμή που επάγονται οι αμυντικοί μηχανισμοί προστατεύουν το φυτό για ένα πολύ μεγάλο μέρος της ζωής του (Van Loon et al. 1998). Κατά την ISR έχει βρεθεί ότι ενεργοποιούνται στο φυτό μηχανισμοί που έχουν να κάνουν με την ενίσχυση των κυτταρικών τοιχωμάτων, τη παραγωγή φυτοαλεξινών, τη σύνθεση πρωτεϊνών παθογένειας (PR proteins) (Hammond-Kosack & Jones, 1996). Η ενεργοποίηση της άμυνας από το φυτό υπονοεί ότι ίσως ακόμα και τους ωφέλιμους οργανισμούς τους αντιλαμβάνεται όπως τα παθογόνα. Έχει φανεί ότι ακόμα και στις συμβιωτικές σχέσεις των φυτών με μικροοργανισμούς ενεργοποιούνται αμυντικοί μηχανισμοί, όταν αυτές πλέον δεν είναι

χρήσιμες στο φυτό (Parniske et al., 1991; Hause and Fester, 2005). Τα ένζυμα που έχουν αναφερθεί να εκφράζονται κατά την ISR είναι το PAL, οι περοξειδάσες, οι PR proteins, η β-1,3-γλουκανάση, χιτινάσες κ.α. (Park & Kloepper, 2000; Cartieux et al., 2003; Verhagen et al., 2004; Wang et al., 2005; Shuhegger et al., 2006). Ο τρόπος που ενεργοποιείται η ISR από τα ριζοβακτήρια δεν είναι ξεκάθαρος. Η ISR θεωρείται ότι ενεργοποιείται μέσω του μονοπατιού του ιασμονικού οξέος, ενώ κρίνεται απαραίτητη η παρουσία του αιθυλενίου, αλλά και της πρωτεΐνης NPR1, πρωτεΐνη που είναι απαραίτητη κατά τη SAR, και δεν οδηγεί στην έκφραση των PR proteins (Pieterse et al., 1998). Υπάρχουν, όμως, αναφορές για ενεργοποίηση μηχανισμών άμυνας στα φυτά από τα ριζοβακτήρια, που μοιάζουν με αυτών της SAR (Chen et al., 1999; Maurhofer et al., 1994; De Meyer et al., 1999; Park & Kloepper, 2000; Tjamos *et al.*, 2005). Πρόσφατα, επίσης, βρέθηκε ότι τα ριζοβακτήρια, που ανήκουν στο γένος *Bacillus*, δεν χρειάζονται την πρωτεΐνη NPR1, για να επάγουν την άμυνα των φυτών (Kloepper et al., 2004). Η ενεργοποίηση της ISR έχει πολύ μεγάλη εξειδίκευση, όσο αφορά το συνδυασμό βακτηρίου-ξενιστή (Bakker et al., 2003; Meziane et al., 2005; Van Loon & Bakker, 2005). Η αποτυχία ενεργοποίησης της μπορεί να αποδοθεί σε μειωμένο πληθυσμό του βακτηρίου στη ρίζα-απαιτείται συγκέντρωση 10^5 βακτηριακών κυττάρων/g. ρίζας για να ενεργοποιηθεί η ISR (Raaijmakers et al., 1995)-, τα ριζικά εκκρίματα των φυτών να μην διεγείρουν την παραγωγή ουσιών για την επαγωγή των μηχανισμών άμυνας από τα βακτήρια (Gomez-Gomez & Boller, 2002; Zipfel et al., 2004) ή το φυτό να είναι ανίκανο να επάγει αμυντικούς μηχανισμούς.



Εικ. 2: Σχεδιάγραμμα της επαγωγής ανθεκτικότητας στα φυτά από PGPR (προσαρμογή από Pieterse et al., 1998)

1.6 Βιολογική Αντιμετώπιση

Πολλοί και διαφορετικοί ορισμοί έχουν δοθεί, για να περιγράψουν τον όρο *βιολογική αντιμετώπιση*. Σύμφωνα με τους Cook και Baker (1983) «Βιολογική Αντιμετώπιση είναι η μείωση του μολύσματος ή της ικανότητας του παθογόνου να προκαλεί ασθένεια, όταν αυτή επιτυγχάνεται μέσω ενός ή περισσότερων οργανισμών εκτός του ανθρώπου». Βασιζόμενοι σε αυτή την ευρεία ερμηνεία του όρου, οι οργανισμοί και οι διαδικασίες που εμπλέκονται περιλαμβάνουν: α. αμολυσματικά ή μειωμένης μολυσματικότητας ικανότητας άτομα ή πληθυσμούς ανάμεσα στα παθογόνα είδη β. ανταγωνιστικούς μικροοργανισμούς γ. χειρισμούς των φυτών-ξενιστών, ώστε να αυξηθεί η ανθεκτικότητά τους στο παθογόνο. Η βιολογική αντιμετώπιση μπορεί να επιτευχθεί με διάφορους τρόπους, όπως μαζική παραγωγή ανταγωνιστών, επιλογή ανθεκτικών φυτών, καλλιεργητικές πρακτικές, που σκοπό θα έχουν την ρύθμιση της μικροβιακής ισορροπίας.

Η βιολογική αντιμετώπιση των παθογόνων είναι μια στρατηγική, που προτάθηκε σχεδόν μισό αιώνα πριν, σε ένα συνέδριο που έλαβε χώρα το 1965 στο Μπέρκλεϋ με τίτλο: ‘ Οικολογία των παθογόνων του εδάφους, πρελούδιο στην βιολογική αντιμετώπιση’ (Baker and Snyder, 1965). Τόσα χρόνια μετά και όμως η βιολογική αντιμετώπιση βρίσκεται ακόμα σε νηπιακό στάδιο. Στην Ευρωπαϊκή Αγορά κυκλοφορούν σήμερα ελάχιστοι βιολογικοί παράγοντες (biological control agents, BCAs). Η μεγάλη διαφορά είναι όμως ότι στις μέρες μας αυξάνεται η απαίτηση των καταναλωτών για γεωργικά προϊόντα με όσο λιγότερα χημικά κατάλοιπα και την προστασία του περιβάλλοντος. Επιπλέον, σε ό,τι έχει να κάνει με τα εδαφογενή παθογόνα, των οποίων η χημική καταπολέμηση είναι δύσκολη, πολλά από τα σκευάσματα που χρησιμοποιούνταν για την απολύμανση των εδαφών, όπως το βρωμιούχο μεθύλιο, καταργήθηκαν κάνοντας ακόμα πιο σημαντική την βιολογική αντιμετώπιση αυτών.

Η πιο σημαντική ίσως μορφή, που μπορεί να επιτευχθεί ο βιολογικός έλεγχος των ασθενειών είναι μέσω του ανταγωνισμού παθογόνων και μη παθογόνων μικροοργανισμών. Ο μικροβιακός αυτός ανταγωνισμός υπονοεί την απευθείας αλληλεπίδραση δύο μικροοργανισμών που κατέχουν την ίδια οικολογική θέση. Υπάρχουν τρεις κύριοι τύποι τέτοιων αλληλεπιδράσεων: ο παρασιτισμός, η αντιβίωση και ο ανταγωνισμός για θρεπτικά στοιχεία.

Ο παρασιτισμός ενός φυτοπαθογόνου μικροοργανισμού από άλλους μικροοργανισμούς, συμπεριλαμβανομένων και των ιών, είναι ένα πολύ γνωστό φαινόμενο. Οι παρασιτικές ιδιότητες του *Trichoderma* spp. εναντίον παθογόνων όπως του *Rhizoctonia solani* έχουν μελετηθεί εκτενώς (Chet and Baker, 1981). Ο παρασιτισμός αυτός περιλαμβάνει την έκκριση χιτινασών και κυτταρινασών, την απελευθέρωση μικρών μορίων από το παθογόνο και μέσω χημειοτροπισμού την επαφή του με τις υφές του τελευταίου. Ακολουθεί συσπείρωση των υφών του *Trichoderma* γύρω από τις υφές του *R. solani*, έκκριση επιπλέον λυτικών ενζύμων και τελικά διείδυση του *Trichoderma* (Djonović et al. 2006; Woo et al. 2006). Περιλαμβάνει την εξειδικευμένη αναγνώριση από τον ανταγωνιστή του παθογόνου στόχου και την έκκριση διαφόρων κυτταρολυτικών ενζύμων, καθιστώντας τον ανταγωνιστή ικανό να εισέλθει στις υφές του παθογόνου. Άλλα μυκοπαράσιτα σαν τα *Coniothyrium minitans* (Jones et al., 2004a) και *Sporidesmium sclerotivorum* (Adams and Fravel, 1993) είναι αποτελεσματικά στον έλεγχο παθογόνων που σχηματίζουν σκληρότια. Δύο στελέχη του *Coniothyrium minitans* κυκλοφορούν στην Ευρώπη ως βιολογικοί παράγοντες. Αυτός ο τύπος ανταγωνισμού που σκοπό έχει τον θάνατο του παθογόνου συνεπάγεται μειωμένη πυκνότητα μολύσματος. Ωστόσο, ο παρασιτισμός των μυκήτων από ιούς ή σωματίδια σαν τους ιούς, όπως διπλής έλικας RNA(dsRNA) οδηγεί σε μειωμένη μολυσματική ικανότητα, αφού συνήθως οι υφές του παθογόνου αδυνατούν να

διδυμούνται στα κύτταρα του ξενιστή. Υπομολυσματικά στελέχη του *Cyphonectria parasitica* χρησιμοποιούνται για την αντιμετώπιση της σήψης της καστανιάς. Η υπομολυσματικότητα είναι μεταδοτική, αφού το RNA αυτό έχει την ικανότητα να μεταδίδεται σε συμβατά μολυσματικά στελέχη. Έτσι υπό ευνοϊκές συνθήκες μπορεί να εξαπλωθεί φυσικά σε ολόκληρους μολυσμένους δενδρόκηπους (Milgroom and Cortesi, 2004).

Η αντιβίωση είναι ο τρόπος ανταγωνισμού που προκύπτει από την παραγωγή από έναν μικροοργανισμό δευτερογενών μεταβολιτών, τοξικών για άλλους μικροοργανισμούς. Η αντιβίωση είναι ένα πολύ κοινό φαινόμενο, υπεύθυνο για την δράση πολλών βιολογικών παραγόντων, όπως των φθορίζουσων στελεχών του *Pseudomonas* spp., καθώς και στελεχών των γενών *Bacillus* spp., *Streptomyces* spp. και *Trichoderma* spp. Μια ευρεία ποικιλία μορίων με αντιβιοτικές ιδιότητες έχει περιγραφεί και έχει καταγραφεί ο τρόπος με τον οποίο καταστείλουν διάφορα φυτοπαθογόνα (Fravel, 1988; Loper and Lindow, 1993; Weller και Thomashow, 1993). Οι ουσίες αυτές μπορεί να είναι καθαρά αντιβιοτικά, αλλά και ένζυμα, βακτηριοσίνες, πτητικές ουσίες με αντιμυκητιακή δράση. Ένα δεδομένο στέλεχος βιολογικού παράγοντα είναι πιθανό να παράγει πάνω από μία αντιβιοτική ουσία, με διαφορετικό τρόπο δράσης και εναντίον διαφορετικών παθογόνων. Για να εξακριβωθεί ο ακριβής τρόπος δράσης ενός δευτερογενούς μεταβολίτη απαιτείται η δημιουργία μεταλλαγμένων στελεχών, μη ικανών να παράγουν τη συγκεκριμένη ουσία. Είναι σημαντικό να τονιστεί ότι μια και μόνο ουσία με αντιμικροβιακή δράση δεν αρκεί για να εξηγήσει όλη την ανταγωνιστική δράση του βιολογικού παράγοντα. Η ικανότητα του στελέχους CHA0 του *Pseudomonas* sp. να παράγει DAPG (2,4-diacetylphloroglucinol) (Keel et al., 1992) και υδροκυάνιο (Voisard et al., 1989) ταυτόχρονα παίζει σημαντικό ρόλο στην επιτυχία του στην αντιμετώπιση του *Thielaviopsis basicola*. Ως αντιβιοτικά μπορούν να δράσουν και ουσίες όπως κάποια κυτταρολυτικά ένζυμα (Adesina et al. 2007), διεγέρτες που εκκρίνονται από το τύπου III εκκριτικό σύστημα των βακτηρίων (Rezzonico et al., 2005).

Ο ανταγωνισμός για τα θρεπτικά στοιχεία είναι ένα γενικό φαινόμενο, που ρυθμίζει την δυναμική των πληθυσμών των μικροοργανισμών που ανταγωνίζονται για τα ίδια θρεπτικά στοιχεία ή θέσεις αποικισμού και έχουν τις ίδιες φυσιολογικές απαιτήσεις, όταν αυτοί ακριβώς οι πόροι είναι περιορισμένοι. Ο ανταγωνισμός για θρεπτικά στοιχεία λαμβάνει χώρα στην επιφάνεια των φύλλων, όπου μπορεί να εμποδίσει την βλάστηση των σπορίων των μυκήτων και να μειώσει την προσβολή (Fokkema, 1996). Είναι επίσης κοινός στο έδαφος, ειδικά για πηγές άνθρακα, και θεωρείται υπεύθυνος για το φαινόμενο της μυκόστασης (Lockwood, 1977), δηλαδή την ικανότητα του ίδιου του εδάφους να καταστέλλει την βλάστηση των σπορίων των μυκήτων.

Σίγουρα αποτελεί έναν από τους τρόπους δράσης των βιολογικών παραγόντων. Ένα από τα πιο καλά καταγεγραμμένα παραδείγματα όσο αφορά τον ανταγωνισμό για πηγές άνθρακα είναι αυτό μεταξύ των παθογόνων και μη στελεχών του *Fusarium oxysporum*. Ο ανταγωνισμός για ιχνοστοιχεία είναι εξίσου συχνός. Για παράδειγμα, ο ανταγωνισμός για σίδηρο είναι ένας από τους τρόπους δράσης της φθορίζοντων στελεχών του *Pseudomonas* spp. (Schippers et al., 1987; Bakker et al., 1991; Lemanceau & Alabouvette, 1993; Loper and Henkels, 1997). Ανταγωνισμός μπορεί να υπάρχει, όμως, και για τις θέσεις προσβολής στην επιφάνεια των ριζών. Οι Mandeel και Baker (1991), μελετώντας τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ παθογόνων και μη στελεχών του *F. oxysporum*, πιθανολογώντας ότι οι θέσεις προσβολής στην ρίζα δεν είναι απεριόριστες θα μπορούσε να προστατευθεί το φυτό εάν αυξάνονταν ο πληθυσμός των μη παθογόνων στελεχών. Το 2006 οι Olivain et al. παρατήρησαν έντονο αποικισμό της επιφάνειας ριζών τομάτας από το μη παθογόνο στέλεχος, το οποίο ανταγωνιζόταν το *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* και αναλόγως των συγκεντρώσεων των δύο στελεχών η ασθένεια μπορούσε να περιοριστεί, όχι όμως και να εξαλειφθεί.

Ένας άλλος τρόπος δράσης των βιολογικών παραγόντων είναι η επαγωγή των αμυντικών μηχανισμών των φυτών, δηλαδή η επαγόμενη διασυστηματική αντοχή (ISR), στην οποία αναφερθήκαμε αναλυτικά στους μηχανισμούς άμυνας των φυτών. Η ISR τυπικά λαμβάνει χώρα, όταν ένας επαγωγικός παράγοντας, παθογόνος ή μη, εφαρμόζεται πριν από την πρόκληση μόλυνσης με ένα παθογόνο και έχει ως αποτέλεσμα μείωση της ασθένειας σε σχέση με τα φυτά, που δεν είχε γίνει εφαρμογή του παράγοντα. Ο Kuc (1987) είναι ο πρώτος που κατέγραψε τις πρώτες ενδείξεις συστηματικής προστασίας σε φυτά αγγουριάς απέναντι στο παθογόνο *Colletotricum orbiculare*, αφού είχε προηγηθεί εφαρμογή του ίδιου παθογόνου στις κοτυληδόνες του φυτού. Είναι επίσης αποδεδειγμένο ότι ο εμβολιασμός ενός φυτού-ξενιστή με μια μη συμβατή ειδική μορφή του *F. oxysporum* συνεπάγεται μειωμένη σοβαρότητα ασθένειας από την προσβολή με την συμβατή ειδική μορφή (Biles and Martyn, 1989). Όλο και περισσότερες μελέτες ασχολούνται με την επαγόμενη διασυστηματική ανθεκτικότητα στα φυτά-ξενιστές, μετά την εφαρμογή βιολογικών παραγόντων. Όπου αφορά εδαφογενή παθογόνα, τα άρθρα έχουν να κάνουν με πειράματα όπου το ριζικό σύστημα είναι χωρισμένο και το μη-παθογόνο στέλεχος εφαρμόζεται σε διαφορετικές ρίζες από το παθογόνο (split-root system) ή απευθείας στο στέλεχος, ώστε να μην υπάρχει καμία επαφή μεταξύ τους και έτσι η οποιαδήποτε μείωση του ποσοστού της ασθένειας αποδίδεται στην ISR (Biles and Martyn, 1989; Mandeel and Baker, 1991; Kroon et al., 1992; Olivain et al., 1995; Fuchs et al., 1997; Larkin and Fravel, 1999). Οι Fuchs et al. (1997) απέδωσαν δράση του μη παθογόνου στελέχους Fo47 στην τομάτα σε επαγωγή

της ανθεκτικότητας του φυτού, η οποία συνδέθηκε με την αυξημένη δραστηριότητα χιτινασών, της β 1,3-γλουκανάσης και της β 1,4-γλυκοσιδάσης. Οι Olivain et al. (2003) θεώρησαν ότι οι αμυντικοί μηχανισμοί που επάχθηκαν στο φυτό σχετίζονταν με τη βλάστηση των κονιδίων παθογόνων και μη στελεχών του *F. oxysporum*. Έδειξαν ότι το μη παθογόνο στέλεχος οδήγησε σε κύτταρα λιναριού στην επαγωγή φυσιολογικών διαδικασιών, όπως αυξημένο pH, παραγωγή υπεροξειδίου του υδρογόνου, εισροή ιόντων ασβεστίου και κυτταρικό θάνατο, που σε άλλα φυτά έχουν συνδεθεί με την ISR. Πολλοί βιολογικοί παράγοντες έχει καταγραφεί ότι επάγουν μηχανισμούς ανθεκτικότητας στα φυτά, όπως οι φθορίζουσες pseudomonades (Klopper et al., 1993; Van Loon et al., 1998) και τα είδη του γένους *Trichoderma* (Harman et al., 2004b). Η κυριότερη κριτική που αφορά την βιολογική αντιμετώπιση των παθογόνων έχει να κάνει με την έλλειψη συνέπειας ως προς το αποτέλεσμα. Πολλοί λόγοι μπορεί να είναι υπεύθυνοι για αυτό. Είναι σημαντικό κατά την εφαρμογή των βιολογικών παραγόντων να μην ξεχνάμε ότι πρόκειται για ζωντανούς οργανισμούς με ορισμένες απαιτήσεις και όχι χημικά μόρια με συγκεκριμένη συμπεριφορά κάτω από δεδομένες συνθήκες. Ένα γενικά αποδεκτό πλεονέκτημα των βιολογικών παραγόντων είναι η μεγάλη τους εξειδίκευση. Η εφαρμογή τους δεν πρόκειται να επηρεάσει οργανισμούς μη-στόχους και έτσι έχουμε πολύ μεγαλύτερη προστασία του περιβάλλοντος, σε σύγκριση με ευρέως φάσματος ουσίες. Στην πράξη, όμως, αυτό αποδεικνύεται ότι μπορεί να είναι και μειονέκτημα, αφού ένας παθογόνος μικροοργανισμός μπορεί να αντιπροσωπεύεται από διαφορετικούς παθότυπους, στους οποίους να μην είναι αποτελεσματικός ο βιολογικός παράγοντας (Schisler et al., 2000). Επιπλέον, οι κλιματικές συνθήκες ενώ είναι ιδανικές συνήθως για την ανάπτυξη του παθογόνου, μπορεί να μην είναι ευνοϊκές για το μέγιστο της απόδοσης του βιολογικού παράγοντα (Nicot et al., 2002). Είναι απαραίτητο να μελετηθούν καλά η επίδραση που έχει η μορφή του βιολογικού παράγοντα, η δόση εφαρμογής και ο χρόνος εφαρμογής στην αποτελεσματικότητα του βιολογικού παράγοντα, ώστε να εξασφαλιστεί το μέγιστο δυνατό αποτέλεσμα (Jones et al. 2004a, b). Τέλος, η ποικιλομορφία τόσο του παθογόνου όσο και των κλιματικών συνθηκών σε συνθήκες αγρού είναι πολύ μεγαλύτερη από ό,τι θα μπορούσε να υπάρξει στο εργαστήριο. Περιορισμοί προκύπτουν και εξαιτίας των διαφορετικών τρόπων δράσης του βιολογικού παράγοντα, οι οποίοι δεν έχουν πάντα το ίδιο αποτέλεσμα στην θνησιμότητα και τη δραστηριότητα του παθογόνου-στόχου. Όταν η ανταγωνιστική δράση έχει ως αποτέλεσμα την τη μείωση της ποσότητας του μολύσματος, όπως ο παρασιτισμός του *Coniothyrium* στο *Sclerotinia sclerotiorum*, η αποτελεσματικότητα του βιολογικού παράγοντα εξαρτάται από την ποσοτική σχέση του πληθυσμού του παράγοντα με τον πληθυσμό του παθογόνου. Για να είναι αντίστοιχα αποτελεσματικός ένας βιολογικός

παράγοντας, του οποίου ο τρόπος δράσης είναι η παραγωγή αντιβίωσης εναντίον του παθογόνου, πρέπει να εφαρμοστεί στο σωστό μέρος και στο σωστό χρόνο. Οι δευτερογενείς μεταβολίτες συνήθως δεν παράγονται σε μεγάλες ποσότητες και δεν μεταφέρονται σε μεγάλες αποστάσεις, γι' αυτό και είναι απαραίτητο ο παράγοντας να τοποθετηθεί στο σημείο της μόλυνσης, έτσι ώστε να εξασφαλιστεί η επαφή του με το παθογόνο. Τέλος όταν ο ανταγωνισμός για τροφή είναι ο τρόπος με τον οποίο δρα ο βιολογικός παράγοντας, ο πληθυσμός του πρέπει να είναι ίσος αν όχι μεγαλύτερος από τον πληθυσμό του παθογόνου. Και αν και αυτό είναι εύκολο να επιτευχθεί στο εργαστήριο σε συνθήκες αγρού δεν είναι, δεδομένου ότι δεν είναι γνωστό το ποσό του μολύσματος του παθογόνου.

Φαίνεται από τους παραπάνω περιορισμούς ότι ο πλέον επιθυμητός τρόπος δράσης των βιολογικών παραγόντων είναι η επαγωγή των μηχανισμών άμυνας των φυτών, αφού η ανθεκτικότητα θα εκφραστεί σε όλο το φυτό και σε μεγάλη απόσταση από το σημείο που τοποθετήθηκε ο βιολογικός παράγοντας. Στην πράξη, όμως, τα πράγματα δεν είναι τόσο ξεκάθαρα. Δεν πρέπει να ξεχνάμε ότι τα φυτά στη φύση υποβάλλονται καθημερινά σε κάθε είδους καταπονήσεις. Η προσθήκη ενός βιολογικού παράγοντα μπορεί να αυξήσει την ήδη υπάρχουσα αντοχή των φυτών, όμως ακόμα και τότε αυτό να μην είναι αρκετό για να τα προστατεύσει από το παθογόνο. Επιπλέον, ούτε η αντίδραση των φυτών σε ένα βιολογικό παράγοντα είναι πάντα σταθερή, δεδομένου ότι εξαρτάται κατά πολλούς από το είδος του φυτού, την καλλιεργούμενη ποικιλία, το στάδιο ανάπτυξης και τις περιβαλλοντικές συνθήκες (Van Loon, 2000).

Για να βελτιωθεί η συνέπεια των βιολογικών παραγόντων θα ήταν χρήσιμο να μπορούσαν να συνδυαστούν διαφορετικοί τρόποι δράσης, που θα εκφράζονταν είτε ταυτόχρονα είτε διαδοχικά. Οι πλέον αποτελεσματικοί βιολογικοί παράγοντες που εφαρμόζονται μπορούν να δράσουν με περισσότερους από έναν τρόπους και είναι ικανοί να προστατεύσουν το ίδιο φυτό από πολλά παθογόνα ή πολλά φυτά από το ίδιο παθογόνο π.χ. *Pseudomonas* spp. ή *Trichoderma* spp. Αυτό θα μπορούσε να γίνει είτε με τον συνδυασμό διαφορετικών βιολογικών παραγόντων είτε με συνδυασμό διαφορετικών τρόπων δράσης σε έναν παράγοντα.

Στα πλαίσια της βιολογικής αντιμετώπισης, όπως ειπώθηκε και παραπάνω, περιλαμβάνονται, πέρα από την εφαρμογή βιολογικών παραγόντων, και εκείνες οι καλλιεργητικές πρακτικές που βοηθούν τα εδάφη να διατηρήσουν μια καλή ισορροπία μεταξύ ωφέλιμων και επιβλαβών μικροοργανισμών. Παρακάτω θα αναφερθούν κάποιες από αυτές τις τεχνικές, όπως η αμειψισπορά, η ηλιοαπολύμανση κ.α.

Η αμειψισπορά είναι από τις πλέον κλασσικές καλλιεργητικές πρακτικές, με σκοπό την βελτίωση της παραγωγής ποιοτικά και ποσοτικά. Η μονοκαλλιέργεια από την άλλη έχει κατηγορηθεί για την αύξηση ειδικά των ασθενειών που οφείλονται σε εδαφογενή παθογόνα και την έξαρση επιδημιών. Με την μονοκαλλιέργεια έχουμε συσσώρευση του μολύσματος στο έδαφος, ενώ με την αμειψισπορά μπορεί να αποφευχθεί και η συσσώρευση του μολύσματος, αλλά για κάποια παθογόνα πιστεύεται ότι όταν πρόκειται για φυτά μη-ξενιστές μπορεί να διεγείρουν την βλάστηση των ανθεκτικών μορφών των παθογόνων, τα οποία χωρίς ξενιστές δεν επιβιώνουν. Με την αμειψισπορά μπορεί να διεγερθούν και οι ωφέλιμοι οργανισμοί του εδάφους και να αυξηθεί ο πληθυσμός τους. Ο Mazzola (1999) έδειξε ότι η καλλιέργεια σιταριού πριν την φύτευση δένδρων μηλιάς τα προστατεύει από ένα σύμπλεγμα παθογόνων, κάτι που αποδόθηκε στην αύξηση του πληθυσμού των φθορίζουσων *Pseudomonas* spp. Υπάρχει και η περίπτωση η μονοκαλλιέργεια σε κάποιες περιπτώσεις αν δεν βοηθάει τουλάχιστον δεν ζημιώνει την καλλιέργεια. Η καλλιέργεια για 4 συνεχόμενα χρόνια σιταριού ή κριθαριού οδηγεί σε αύξηση των φθορίζοντων στελεχών του *Pseudomonas* sp., που παράγουν DAPG και προστασία από τον μύκητα *Gaeumannomyces graminis* (Dulout et al., 1997; Raaijmakers and Weller 1998; Weller et al., 2002)

Η διαχείριση των υπολειμμάτων είναι πολύ σημαντική. Σε κάποιες περιπτώσεις το να αφεθούν τα υπολείμματα στην επιφάνεια του εδάφους μπορεί να οδηγήσει σε μείωση της ασθένειας, μέσω της αύξησης της δραστηριότητας των ανταγωνιστών, αλλά μπορεί και σε αύξηση, προσφέροντας καταφύγιο στα παθογόνα. Η καταστροφή των φυτών λίγο πριν τη συγκομιδή μπορεί να αυξήσει τον πολλαπλασιασμό του παθογόνου και του μολύσματος στο έδαφος, για αυτό καλύτερα είναι να προηγείται η καταστροφή των ριζών (Stanghellini et al. 2004b). Το όργωμα έχει τα ίδια διαφορούμενα αποτελέσματα. Το συμβατικό όργωμα ανακατεύει το έδαφος, απομακρύνει τα υπολείμματα και διαταράσσει τις υφές των παθογόνων, μειώνοντας σε κάποια την μολυσματική τους ικανότητα, όπως του *R. solani* (Roget et al., 1996; Bailey and Lazarovits, 2003).

Η ηλιοαπολύμανση είναι μια μέθοδος, που χρησιμοποιεί την ηλιακή ενέργεια για να αυξήσει τη θερμοκρασία του εδάφους, ώστε να φτάσει σε ένα επίπεδο, όπου τα παθογόνα να θανατώνονται ή τουλάχιστον να εξασθενούν, με τελικό σκοπό να μπορέσουν να ελεγχθούν ικανοποιητικά οι ασθένειες. Η ηλιοαπολύμανση δεν σκοτώνει όλους τους μικροοργανισμούς στο έδαφος, αλλά μετατοπίζει την εδαφική ισορροπία προς τη μεριά των ευεργετικών μικροοργανισμών. Πράγματι, πολλά άρθρα καταγράφουν καταστάσεις όπου η αποτελεσματικότητα της ηλιοαπολύμανσης δεν προκύπτει μόνο εξαιτίας της μείωσης του πληθυσμού των παθογόνων, μα και εξαιτίας της αύξησης της συγκέντρωσης και της δραστηριότητας των ανταγωνιστικών προς τα παθογόνα μικροοργανισμών. Έχει ευρύ φάσμα δράσης εναντίον μυκήτων, νηματωδών, βακτηρίων,

ζιζανίων, αρθροπόδων. Πολλές φορές συμβάλλει και στην αύξηση της παραγωγής, ίσως γιατί συμβάλλει στον έλεγχο παθογόνων ή επιβλαβών μικροοργανισμών που ευθύνονται για εδάφη μειωμένης παραγωγικής ικανότητας, φαινόμενο που συχνά αποδίδεται με τον όρο «άρρωστο έδαφος» (Bouhot, 1997). Μια ακόμα ενδιαφέρουσα ιδιότητα της ηλιοαπολύμανσης είναι η μακράς διάρκειας αποτελεσματικότητα της. Έχει βρεθεί ότι ο έλεγχος των παθογόνων αλλά και η αύξηση της παραγωγής μπορεί να διαρκούν έως και τρία χρόνια μετά την εφαρμογή της (Gallo et al. 2007). Αυτό ίσως να οφείλεται τόσο στην μείωση του μολύσματος όσο και στην αύξηση της κατασταλτικής ικανότητας του εδάφους (Lopez-Escudero & Blanco-Lopez, 2001). Εννοείται πως δεν είναι όλα τα παθογόνα το ίδιο ευαίσθητα. Αν και σε γενικές γραμμές η μέθοδος είναι αποτελεσματική εναντίον των μυκήτων, έχουν υπάρξει και αποτυχίες. Ιδιαίτερα αποτελεσματική είναι σε περιοχές ζεστές και με μεγάλη ηλιοφάνεια, όπως είναι οι Μεσογειακές (Katan, 1996). Καλύτερη για πιο ψυχρές περιοχές είναι η βιολογική απολύμανση του εδάφους, που βασίζεται στην κάλυψη του εδάφους με πλαστικά φύλλα, αφού πρώτα έχει ενσωματωθεί φρέσκια οργανική ύλη (Blok et al., 2000). Οι μηχανισμοί που εμπλέκονται σε αυτή την σχετικά πρόσφατη τεχνική δεν είναι απολύτως γνωστοί. Η ζύμωση της οργανικής ύλης στο έδαφος, κάτω από τα πλαστικά φύλλα, οδηγεί στην παραγωγή τοξικών μεταβολιτών και αναερόβιων συνθηκών, τα οποία δημιουργούν ένα μη ευνοϊκό περιβάλλον για τους μύκητες. Ανάλογα με ποιος από τους δύο μηχανισμούς λαμβάνει χώρα οι Lamers et al. (2004) πρότειναν δύο διαφορετικούς ορισμούς: α.) βιοκαπνισμός, όταν πρόκειται για την προσθήκη φυτών, που παράγουν τοξικούς μεταβολίτες και β.) βιοαπολύμανση, όταν πρόκειται για την δημιουργία αναερόβιων συνθηκών. Συχνά χρησιμοποιούνται φυτά από την οικογένεια Brassicaceae, τα οποία περιέχουν γλυκοσινολάτες, μια τάξη οργανικών μορίων, που υδρολύονται σε τοξικά υποπροϊόντα, που με τη σειρά τους έχουν βιοκτόνο δράση σε κάποια εδαφογενή παθογόνα (Kirkegaard et al., 1998; Lawrence and Matthiessen, 2004). Ένα πρόβλημα που υπήρχε ήταν ότι για να μπορούν να χρησιμοποιηθούν αυτά τα φυτά ως τροφή για τα ζώα είχε γίνει μια επιλογή ποικιλιών με χαμηλή περιεκτικότητα σε γλυκοσινολάτες, όμως πρόσφατα έχουν δημιουργηθεί ποικιλίες με υψηλή περιεκτικότητα, ειδικά για αυτό το σκοπό. Χρησιμοποιούνται και φυτά της οικογένειας Alliaceae, που επίσης περιέχουν μόρια με άμεση ή έμμεση τοξική επίδραση στα παθογόνα. Η αποδόμηση των ιστών του σκόρδου, του κρεμμυδιού και του πράσου οδηγεί στην παραγωγή πτητικών ουσιών του θείου, που μετατρέπονται σε δισουλφίδια, ουσίες τοξικές για μύκητες, νηματώδεις και αρθρόποδα (Arnault et al., 2004). Οι Block et al (2000) ανέφεραν δραστική μείωση στον πληθυσμό των *F. oxysporum* f.sp. asparagi και *R. solani*, ύστερα από προσθήκη στο έδαφος λάχανων και κάποιου χόρτου. Η μέθοδος αν και υποσχόμενη απαιτεί μια κάποια αλλαγή στον τρόπο που εξασκείται η γεωργία,

αφού το χωράφι θα πρέπει να παραμείνει ακαλλιέργητο για αρκετές εβδομάδες, όπως και με την ηλιοαπολύμανση.

Προς το παρόν, οι κανονισμοί της Ευρωπαϊκής Ένωσης απαιτούν την ανακύκλωση των αποβλήτων. Για τα οργανικά απόβλητα, η κομποστοποίηση είναι μια ενδιαφέρουσα προσέγγιση, αφού την καθιστά χρήσιμη για γεωργική χρήση. Πρόκειται για μια βιολογική διαδικασία, που χαρακτηρίζεται από μια κρίσιμη θερμοκρασία, στην οποία οι θερμοευαίσθητοι παθογόνοι μικροοργανισμοί καταστρέφονται και έτσι το προϊόν είναι απαλλαγμένο από φυτοπαθογόνα (Bollen, 1985a, b; Coventry et al., 2004). Αυτές οι κομπόστες περιέχουν επίσης κάποια θρεπτικά στοιχεία, κυρίως ιχνοστοιχεία, που βελτιώνουν την γονιμότητα του εδάφους, ενώ έχουν και κάποια ικανότητα να αυξάνουν τις κατασταλτικές ιδιότητες του εδάφους εναντίον των νηματώδων (Lumsden et al., 1983; Oyarzum et al., 1998; Erhart et al., 1999; Widmer et al., 2002) και των ασθενειών των κηπευτικών (Cotxarrera et al., 2002; Hoitink and Boehm, 1999; Tilston et al., 2002). Η αποτελεσματικότητα στον έλεγχο των ασθενειών εξαρτάται από τις χημικές ιδιότητες των υλικών από όπου προήλθε, τη διαδικασία που ακολουθήθηκε, τους μικροοργανισμούς που εγκαταστάθηκαν μετά την κρίσιμη θερμοκρασία και το ίδιο το παθογόνο. Συνήθως ένα compost καταπολεμά κάποια και όχι όλα τα παθογόνα, ενώ όλα τα composts δεν καταπολεμούν τα ίδια παθογόνα. Μοναδική εξαίρεση σε αυτό είναι οι αδροφουζαριώσεις, γιατί η προσθήκη αυτών στο έδαφος δημιουργεί έναν ανταγωνισμό για θρεπτικά στοιχεία και το φουζάριο είναι ευαίσθητο σε αυτό τον ανταγωνισμό (Alabouvette, 1986).

1.7 Η Αδροφουζαρίωση της Πεπονιάς

Υπεύθυνος για την ασθένεια είναι ο μύκητας *Fusarium oxysporum* Schlechtend. Fr. f. sp. *melonis* (Leach & Currence) W.C. Snyder & H.N. Hans. Η ασθένεια περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1933 στη Minnesota των Η.Π.Α.

Ο μύκητας *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* ανήκει στην οικογένεια Moniliaceae, της τάξης Moniliales των αδηλομυκήτων. Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω γενικά για το είδος *Fusarium oxysporum*, δεν έχει βρεθεί η τέλεια μορφή κανενός από τα στελέχη που το αποτελούν.

Οι αγενείς αναπαραγωγικές κατασκευές του μύκητα περιλαμβάνουν τα :

Μικροκονίδια

Τα μικροκονίδια είναι άφθονα, οβάλ ή νεφροειδή, μονοκύτταρα και σχηματίζονται στα φιαλίδια, το οποίο μπορεί να βρίσκεται είτε σε διακλάδωση κονιδιοφόρου είτε σε υφή. Περισσότερα είναι τα μικροκονίδια που σχηματίζονται σε φιαλίδια κονιδιοφόρων. Τα

μικροκονίδια είναι ικανά να μολύνουν το φυτό, όμως στον αγρό έχουν μικρή σημασία ως μόλυσμα, λόγω του εφήμερου χαρακτήρα τους.

Μακροκονίδια

Τα μακροκονίδια είναι δρεπανοειδή, οξυκατάληκτα (*oxysporum*), έχουν 3-5 κύτταρα, και σχηματίζονται σε μεγάλους αριθμούς στα σποριοδόχεια. Και αυτά είναι ικανά να μολύνουν, όμως ο πρωταρχικός τους ρόλος φαίνεται να είναι η επιβίωση του παθογόνου, αφού από αυτά σχηματίζονται τα χλαμυδοσπόρια.

Χλαμυδοσπόρια

Πρόκειται για ανθεκτικές κατασκευές επιβίωσης του μύκητα. Σχηματίζονται όταν οι συνθήκες του περιβάλλοντος δεν είναι ευνοϊκές για την ανάπτυξη του μύκητα ή όταν πεθαίνει το φυτό. Παράγει δύο τύπους χλαμυδοσποριών είτε ανάμεσα στα μακροκονίδια είτε μέσα στο μυκήλιο (Thomas *et al.*, 1996).

Το παθογόνο έχει τέσσερις φυλές, που προέκυψαν από την εύρεση δύο διαφορετικών κυρίαρχων γονιδίων ανθεκτικότητας (*Fom1* και *Fom2*). Ανάλογα με τις αντιδράσεις στελεχών σε τρεις διαφορετικές ποικιλίες πεπονιάς, με διαφορετικούς γόνους αντοχής, προέκυψαν οι φυλές R1, R2, R0 και R1,2, αφού μόνο τόσες μπορούν να υφίστανται με δύο μόνο κυρίαρχα γονίδια (Risser *et al.*, 1976). Στην Ευρώπη κυριαρχούν οι φυλές R1 και R0. Στην Ελλάδα, συγκεκριμένα, έχουν βρεθεί και οι τέσσερις φυλές του παθογόνου. Πιστεύεται πως σε μια περιοχή υπήρχαν αρχικά και οι τέσσερις φυλές του παθογόνου και η καλλιέργεια ανθεκτικών ποικιλιών, με την πίεση επιλογής που άσκησε οδήγησε στην επικράτηση κάποιων, σε κάθε περιοχή (Bouhot, 1981).

Η διασπορά της προσβολής στον αγρό είναι κατά κηλίδες, δεδομένου ότι έχουμε να κάνουμε με ένα εδαφογενές παθογόνο. Τα φυτά είναι ευπαθή στην ασθένεια σε όλα τα στάδια της ανάπτυξης τους. Τα συμπτώματα της προσβολής εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από το ποσό του μολύσματος στο έδαφος, τις περιβαλλοντικές συνθήκες, τα θρεπτικά στοιχεία (ευνοείται ιδιαίτερα από το άζωτο) και την ευαισθησία του ξενιστή. Οι μύκητες του είδους *Fusarium oxysporum* αναπτύσσονται καλύτερα σε θερμοκρασίες κοντά στους 22°C (Thomas *et al.*, 1996), ενώ υπάρχει σημαντική μείωση των συμπτωμάτων, όταν η θερμοκρασία ξεπεράσει τους 30°C. Υψηλές θερμοκρασίες φαίνεται ότι εμποδίζουν την προσβολή, η οποία συχνά καταλήγει σε φυτά κίτρινα και καθηλωμένα, αλλά όχι μαραμμένα. Όσο αφορά τα εδάφη εμφανίζεται πιο σοβαρή η ασθένεια σε ελαφρά, αμμώδη, όξινα εδάφη, αν και ούτε αυτό είναι απόλυτο πάντα (Baker & Cook, 1974). Τα αρχικά συμπτώματα της ασθένειας περιλαμβάνουν μια θαμπή, γκριζοπράσινη εμφάνιση των φύλλων, η οποία προηγείται της απώλειας σπαργής και της μάρανσης. Τα φύλλα παρουσιάζουν χλωρωτικές κηλίδες, που στην πορεία γίνονται νεκρωτικές. Τα συμπτώματα εμφανίζονται πρώτα

στα γηραιότερα φύλλα και προχωρούν στα νεότερα. Τα αρχικά συμπτώματα λαμβάνουν χώρα όταν το φυτό αρχίζει να αναρριχάται. Η μάρανση μπορεί να συμβεί σε μία μόνο καταβολάδα αφήνοντας το υπόλοιπο φυτό ανεπηρέαστο (ημιπληγία).

Κάτω από συνθήκες υψηλής πίεσης μολύσματος ή όταν πρόκειται για πολύ ευαίσθητο ξενιστή μπορεί να μαραθεί ολόκληρο το φυτό και να πεθάνει μέσα σε σύντομο χρονικό διάστημα. Σε αυτές τις περιπτώσεις τα φυτά νεκρώνονται, χωρίς να έχει προηγηθεί χλώρωση. Τα προσβεβλημένα φυτά που δεν πεθαίνουν συχνά είναι καθηλωμένα και έχουν αξιόλογα μειωμένη παραγωγή. Επίσης, όταν υπάρχει μεγάλη ποσότητα μολύσματος τα σπορόφυτα μπορεί να σαπίσουν καθώς αναδύονται από το έδαφος. Στο καρπούζι και το πεπόνι μια καφέ νεκρωτική λωρίδα μπορεί να είναι ορατή εξωτερικά στο λαιμό του φυτού και να επεκτείνεται κατά μήκος του βλαστού. Η διάδοση της ασθένειας γίνεται κατά κύριο λόγο με το έδαφος, τα υπολείμματα της καλλιέργειας και μολυσμένο πολλαπλασιαστικό υλικό.

Όσο αφορά την αντιμετώπιση της ασθένειας ο πλέον οικονομικός τρόπος είναι η καλλιέργεια ανθεκτικών ποικιλιών. Το πρόβλημα είναι ότι καμία ποικιλία δεν είναι ανθεκτική και στις 4 φυλές του παθογόνου, επομένως απαιτείται να γνωρίζουμε ποια φυλή βρίσκεται στο έδαφος που θα καλλιεργήσουμε. Ο εμβολιασμός της επιθυμητής ποικιλίας σε ανθεκτικά υποκείμενα, όπως τα *Benicasa cerifera*, *Cucurbita ficifolia* και *Cucurbita pepo* var. *medullosa* (Παναγόπουλος, 1995), είναι πολύ αποτελεσματική τεχνική. Η χημική καταπολέμηση συνίσταται στην απολύμανση του εδάφους, όμως τα περισσότερα χημικά απολυμαντικά έχουν καταργηθεί, ενώ κρίνεται και οικονομικά ασύμφορη (Παναγόπουλος, 1995). Η ρύθμιση του pH του εδάφους στο 6-7 και η μείωση του αζώτου περιορίζουν τα συμπτώματα της ασθένειας. Επειδή, η διάδοση του παθογόνου γίνεται με το πολλαπλασιαστικό υλικό αυτό απαιτείται να είναι υγιές. Σημαντική θεωρείται και η άμεση καταστροφή των ασθενών φυτών.

Σε σχέση με τις μεθόδους που περιγράφηκαν στα πλαίσια της βιολογικής αντιμετώπισης πρακτική αξία στην περίπτωση της αδροφουζαρίωσης της πεπονιάς έχουν η ηλιοαπολύμανση, βιοαπολύμανση, η προσθήκη οργανικής ουσίας στο έδαφος και οι βιολογικοί παράγοντες. Η αμειψισπορά δεν θεωρείται ικανή να επηρεάσει σε μεγάλο βαθμό το παθογόνο τόσο λόγω της μεγάλης ανθεκτικότητας των χλαμυδοσπορίων στο έδαφος, αλλά και επειδή το *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* είναι εξαιρετικά ικανό να αποικίζει ρίζες φυτών μη-ξενιστών (Gordon et al., 1989). Η ηλιοαπολύμανση, η βιοαπολύμανση και η προσθήκη οργανικής ουσίας στο έδαφος, με τους περιορισμούς και τα οφέλη που ήδη αναφέρθηκαν, δεν είναι ικανές να εξαλείψουν το παθογόνο από το έδαφος, όμως μπορούν να μειώσουν σημαντικά τον πληθυσμό

του, ώστε αν συνδυαστούν με κάποια άλλη μέθοδο ή κάποιο βιολογικό παράγοντα να επιτευχθεί καλύτερη αντιμετώπιση της ασθένειας.

Διάφοροι βιολογικοί παράγοντες έχουν εφαρμοστεί εναντίον του *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*. Η δράση των μη παθογόνων στελεχών έχει αναφερθεί εναντίον της αδροφουζαρίωσης πολλών φυτών (Garibaldi *et al.*, 1986; Mandeel & Baker, 1991; Lemanceau & Alabouvette, 1991; Larkin *et al.*, 1996; Fravel & Larkin, 2002), καθώς και του πεπονιού ((Rouxel *et al.*, 1979; Larkin & Fravel, 1998). Αναφορές για θετική επίδραση στα φυτά πεπονιάς ενάντιον της αδροφουζαρίωσης έχουν υπάρξει για στελέχη του μύκητα *Trichoderma harzianum* (Suárez-Estella *et al.*, 2006; Martínez-Medina, A., et al, 2010), *Penicillium oxalicum* (De Cal *et al.*, 2009).

1.8 Ο Βιολογικός Παράγοντας K-165

Για την αντιμετώπιση της αδρομύκωσης από τον μύκητα *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε ως βιολογικός παράγοντας το βακτήριο *Paenibacillus alvei* και πιο συγκεκριμένα το βακτηριακό στέλεχος K-165.

Το βακτήριο απομόνωσαν το 2004 οι Tjamos *et al.* από τα ακρορρίζια φυτών τομάτας, που είχαν καλλιεργηθεί σε ηλιοαπολυμανθέν έδαφος. Το βακτήριο σε αυτή τη μελέτη βρέθηκε ικανό να προστατεύσει φυτά μελιτζάνας και φυτά πατάτας από τον μύκητα *Verticillium dahliae*, τόσο σε πειράματα θερμοκηπίου όσο και σε πειράματα αγρού. Επίσης βρέθηκε ότι το στέλεχος προωθεί την αύξηση των φυτών, παράγει χιτινάσες και είναι ικανό να αποικίσει όχι μόνο την ριζόσφαιρα, αλλά και την ενδοριζόσφαιρα φυτών τομάτας και μελιτζάνας.

Σε άλλες μελέτες που έγιναν με τον συγκεκριμένο βιολογικό παράγοντα το 2005 οι Tjamos *et al.* απέδειξαν ότι επάγει τους μηχανισμούς της ISR φυτών *Arabidopsis thaliana* εναντίον του μύκητα *Verticillium dahliae*, μέσω του μονοπατιού του σαλικυλικού οξέος. Σε άλλη μελέτη βρέθηκε ότι το K-165 μπορεί να μειώσει τη βλαστική ικανότητα των μικροσκληρωτίων του μύκητα *Verticillium dahliae* κατά 50% στη ζώνη επιμήκυνσης φυτών μελιτζάνας, αλλά ακόμα και αρκετά μακρύτερα σε έδαφος χωρίς φυτά αν και σε μικρότερο ποσοστό, ενώ δεν επηρεάζει το μήκος των υφών από τα μικροσκληρώτια που έχουν βλαστήσει (Antonopoulos & Tjamos *et al.*, 2007).

Τέλος επάγει τους μηχανισμούς άμυνας και σε φυτά μελιτζάνας με αποτέλεσμα και τη μείωση του ποσοστού της ασθένειας, αλλά εμποδίζει και την βλάστηση των μικροσκληρωτίων του μύκητα *Verticillium dahliae* κατά 27% και 20% αντίστοιχα. Ακόμα σε μελέτες του εργαστηρίου το στέλεχος K-165 έχει βρεθεί ότι παράγει αντιβίωση και εμποδίζει την ανάπτυξη του μύκητα *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* (εικ. 3).

Όσο αφορά το στέλεχος K165^{nif}, που χρησιμοποιήθηκε σε κάποια από τα πειράματα, πρόκειται για μια μεταλλαγή του K-165, με ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό Rifampicin, το οποίο δρα στη RNA πολυμεράση των βακτηρίων, με αποτέλεσμα την παρεμπόδιση της σύνθεσης RNA. Η ανθεκτικότητα προκύπτει από μεταλλαγή στην υπομονάδα β της RNA πολυμεράσης (ανθεκτικότητα λόγω μειωμένης συγγένειας). Το στέλεχος αυτό χρησιμοποιήθηκε, ώστε να είναι πιο εύκολη η απομόνωση του από το έδαφος, με την προσθήκη του αντιβιοτικού στο θρεπτικό υλικό, στο οποίο θα αναπτύσσονταν το βακτήριο.

Το στέλεχος K-165 ανήκει στα βακτήρια που προωθούν την ανάπτυξη των φυτών (plant-growth-promoting rhizobacterium, PGPR). Τα βακτήρια αυτά μπορεί να προωθούν την ανάπτυξη των φυτών απλά και μόνο προστατεύοντας τα από τα παθογόνα, όμως σε πολλές περιπτώσεις αυτό μπορεί να συμβεί και απουσία παθογόνου (Van Loon & Bakker, 2003). Ένας από τους πιο καλά μελετημένους μηχανισμούς, με τους οποίους προωθείται η ανάπτυξη των φυτών, είναι η αύξηση της διαθεσιμότητας του N, από τα βακτήρια του γένους *Rhizobium*. Τα βακτήρια που προωθούν την ανάπτυξη των φυτών διευκολύνουν την απορρόφηση και άλλων στοιχείων, κάνοντας τα διαθέσιμα για τα φυτά εκτός από το άζωτο, όπως P, Fe και διάφορων ιχνοστοιχείων (Dobbelaere et al. 2003; Vessey 2003). Ένας άλλος μηχανισμός είναι η παραγωγή ορμονών και ουσιών, που ρυθμίζουν την ανάπτυξη των φυτών (Frankenberger & Arshad, 1995), όπως αυξίνες (Barbieri and Galli 1993). Επηρεάζουν, επίσης, τη συγκέντρωση του αιθυλενίου στις ρίζες, το οποίο σε μεγάλες ποσότητες προωθεί την γήρανση των φυτών και την αποκοπή των οργάνων. Κάποια βακτήρια διαθέτουν το ένζυμο απαμινάση του 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC), που είναι η πρόδρομη ουσία στη σύνθεση του αιθυλενίου στα φυτά, και το χρησιμοποιούν ως πηγή άνθρακα. Έτσι τα φυτά δεν μπορούν να συσσωρεύσουν αιθυλένιο στις ρίζες τους, που παραμένουν υγιείς (Glick 2005).

Οι τρόποι, με τους οποίους τα ριζοβακτήρια αυτά προστατεύουν τα φυτά από τα παθογόνα είναι η αντιβίωση, ο ανταγωνισμός για τροφή, η επαγωγή διασυστηματικής αντοχής (ISR), αλλά και μέσω της ίδιας της προώθησης της ανάπτυξης των φυτών. Πολλές φορές τα φυτά είναι ευαίσθητα σε παθογόνα, όταν είναι σε νεαρή ηλικία. Μειώνοντας αυτό το διάστημα μειώνονται και οι πιθανότητες το φυτό να προσβληθεί από το παθογόνο (Visker et al. 2003). Επίσης η μείωση του αιθυλενίου μειώνει την καταπόνηση του φυτού και έτσι το καθιστά πιο ανθεκτικό απέναντι στα παθογόνα (Wang et al. 2000). Υπάρχει ακόμα η περίπτωση να προκαλέσουν αλλαγή στις εκκρίσεις των ριζών, ποσοτικές και ποιοτικές (Phillips et al. 2004), και ίσως εντονότερη έκκριση λυτικών ενζύμων.



Εικ. 3: Στη φωτογραφία διακρίνεται στο κέντρο το βακτήριο και γύρω από αυτό η ζώνη παρεμπόδισης της ανάπτυξης του μύκητα *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis*, που δημιουργεί (φωτογραφία από το Εργ. Φυτοπαθολογίας του ΓΠΑ)

1.9 Τα γονίδια LOX, PAL1 και CHIT1

Στην παρούσα εργασία και για τη διερεύνηση εάν το βακτήριο επάγει την ISR, όταν εφαρμοστεί σε φυτά πεπονιού μελετήθηκε η έκφραση των γονιδίων *LOX* (lipoxygenases), *PAL* (phenylalanine ammoniac lyase) και *CHIT* (chitinases). Το γονίδιο *PAL* είναι το πρώτο ένζυμο στο μονοπάτι της βιοσύνθεσης των φαινυλοπροπανοειδών και καταλύει τη μετατροπή της *L* φαινυλαλανίνης σε *trans* κινναμικό οξύ (cinnamic acid), το οποίο παρέχει τις πρόδρομες ουσίες για το σχηματισμό των φαινολικών ουσιών και της λιγνίνης στα φυτά, αλλά και του σαλικυλικού οξέος (Nicholson & Hammerschmidt, 1992; Sticher *et al.*, 1997). Στα περισσότερα φυτά κωδικοποιείται από μια οικογένεια ισοενζύμων, ο αριθμός των οποίων διαφέρει από φυτό σε φυτό (Bolwell *et al.*, 1985; Joos & Hahlbrock, 1992;). Η έκκριση του διεγείρεται από διάφορους εξωγενείς παράγοντες (πληγές, φως, μολύνσεις) και σχετίζεται με το στάδιο ανάπτυξης του φυτού (Maunch-Mani & Slusarenko, 1996; Wu & Lin, 2002). Το γονίδιο ενεργοποιείται πιο γρήγορα και εκφράζεται εντονότερα και περισσότερο σε μη συμβατές σχέσεις παθογόνου-ξενιστή (Maher *et al.*, 1994; Cui *et al.*, 1996). Η έκφραση του γονιδίου έχει βρεθεί να παρουσιάζει δύο κορυφές κατά την SAR και τη δεύτερη μόνο κατά την ISR. Η πρώτη κορυφή είναι ανεξάρτητη από το SA, αφού εμφανίζεται

πριν το σχηματισμό του, και η δεύτερη ενεργοποιείται από το JA και οδηγεί στο σχηματισμό φαινολικών ουσιών και λιγνίνης (Martinez *et al.*, 2001; Shores *et al.*, 2004).

Η έκκριση των χιτινασών στα φυτά μπορεί να διεγερθεί από διάφορους παράγοντες, όπως προσβολή από μύκητες, βακτήρια, ιούς, πληγές και διαφόρων μορφών καταπονήσεις, το σαλικυλικό οξύ, το αιθυλένιο, αυξίνες και κυτοκινίνες (Graham and Sticklen, 1994). Δεδομένου ότι η χιτίνη είναι βασικό συστατικό των κυτταρικών τοιχωμάτων των μυκήτων, η μελέτη της σε προσβολές από μύκητες είναι σχετική. Η αυξημένη δραστηριότητα των χιτινασών αποδομεί τη χιτίνη στα κυτταρικά τοιχώματα των μυκήτων (van Loon *et al.*, 2006). Πολλές πρωτεΐνες παθογένεσης (PR proteins) στα φυτά είναι χιτινάσες (van Loon & van Strien, 1999). Το γονίδιο *CHIT1* κωδικοποιεί μια χιτινάση μέλος της κλάσης III των χιτινασών. Η έκκριση τους έχει βρεθεί ότι διαφέρει ανάμεσα στις ευαίσθητες και ανθεκτικές ποικιλίες πεπονιού (Balde *et al.*, 2005). Η έκκριση τους σχετίζεται με την συσσώρευση σαλικυλικού οξέος (Sticher *et al.*, 1997), αν και οι χιτινάσες κλάσης III φαίνεται να επάγονται από το ιασμονικό οξύ (Samac & Shah, 1991; Salzer *et al.*, 2000).

Το γονίδιο *LOX* κωδικοποιεί μια λιποξυγενάση. Οι λιποξυγενάσες είναι αντίστοιχα τα πρώτα ένζυμα στο βιοσυνθετικό μονοπάτι παραγωγής του ιασμονικού οξέος. Μέσα σε ένα επανατροφοδοτούμενο κύκλο τα ένζυμα αυτά χρησιμοποιώντας ως αρχικές ουσίες το λινολενικό και το λινολεϊκό οξύ, οδηγούν στην παραγωγή του ιασμονικού οξέος (Melan *et al.*, 1993; Raymond *et al.*, 1998). Διακρίνονται σε 9-LOX και 13-LOX, ανάλογα με τη θέση ενσωμάτωσης του OH στα παραπάνω οξέα (Feussner & Wasternack, 2002). Οι περισσότερες μελέτες συσχετίζουν την δραστηριότητα των 13-LOX με την παραγωγή του ιασμονικού οξέος.

1.10 Σκοπός της παρούσας μελέτης

Οι μύκητες του γένους *Fusarium oxysporum* είναι εδαφογενή παθογόνα, που προκαλούν αδρομυκώσεις και έχουν παγκόσμια εξάπλωση. Κάθε χρόνο οι καταστροφές που προκαλούν στα καλλιεργούμενα φυτά είναι σημαντικές, αφού προσβάλλει τα περισσότερα καλλιεργούμενα φυτά. Ο μύκητας *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* προκαλεί την αδροφουζαρίωση της πεπονιάς και είναι υπεύθυνος για μεγάλες απώλειες στις περιοχές που κυρίως καλλιεργείται (Katan, 1996). Έχει την ικανότητα να επιβιώνει για μεγάλα χρονικά διαστήματα στο έδαφος, με τη μορφή γλαυδοσπορίων και να αποικίζει αποτελεσματικά τις ρίζες φυτών μη ξενιστών (Gordon *et al.*, 1989). Με την κατάργηση των περισσότερων σκευασμάτων για τη χημική απολύμανση του εδάφους, πέρα από κάποιες καλλιεργητικές πρακτικές, που βοηθούν στη μείωση της ασθένειας, η

έρευνα για την αντιμετώπιση τους έχει στραφεί στην εύρεση αποτελεσματικών μικροοργανισμών (μύκητες, βακτήρια κυρίως) στον ανταγωνισμό με τα παθογόνα αυτά

Ο σκοπός αυτή της εργασίας ήταν η μελέτη ενός τέτοιου βιολογικού παράγοντα, του *Paenibacillus alvei* και συγκεκριμένα του στελέχους K-165. Εξετάστηκε αρχικά η αποτελεσματικότητα του εναντίον του μύκητα *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* και έπειτα η καλύτερη μέθοδος εφαρμογής του στα φυτά πεπονιάς, καθώς και η χρονική στιγμή που πρέπει να γίνει αυτή η εφαρμογή. Ακόμα μελετήθηκε η πυκνότητα του βακτηρίου στη ρίζα και κατά πόσο επηρεάζει την αποτελεσματικότητα του εναντίον του παθογόνου. Στο τελευταίο μέρος της έρευνας εξετάστηκε η ικανότητα του στελέχους να επάγει τους αμυντικούς μηχανισμούς του φυτού.

2. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

2.1 Πείραμα 1^ο: Μελέτη της αποτελεσματικότητας του βακτηρίου *Raenibacillus alvei* (στέλεχος K165) ως βιολογικού παράγοντα εναντίον του μύκητα *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*.

2.1.1. Φυτικό υλικό

Το φυτικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε ήταν αποκλειστικά σπόροι υβριδίου πεπονιού (*Cucumis melo*) της ποικιλίας ARAVA (F1) της εταιρίας Zeraim Gedera Ltd.

2.1.2. Παρασκευή της σκόνης επίπασης του μύκητα *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis*.

Η απομόνωση του *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* διατηρούνταν σε αποστειρωμένο χόμα μέσα σε φιαλίδιο McCartney στο ψυγείο (4°C). Η μεταφορά των μυκήτων γίνονταν από το αρχικό μέσο διατήρησης, σε τριβλία Petri με PDA υπό ασηπτικές συνθήκες. Έπειτα τα τριβλία τοποθετούνταν σε σκοτεινό επωαστικό θάλαμο με σταθερή θερμοκρασία 22°C.

Για την παρασκευή της σκόνης επίπασης του παθογόνου μεταφέρθηκε υπό ασηπτικές συνθήκες σε κωνική φιάλη, που περιείχε 100ml υγρό θρεπτικό υλικό SSN (Sucrose Sodium Nitrate)(Sinha και Wood, 1968), ένα κομμάτι μυκηλίου, από τη ζώνη ανάπτυξης του μύκητα, από το τριβλίο με το PDA. Η κωνική τοποθετήθηκε σε περιστροφικό επωαστικό θάλαμο στους 28°C και στις 140r.p.m για 2 μέρες. Έπειτα, έγινε διήθηση με τυρόπανο, ώστε να μείνει μόνο το θρεπτικό υλικό με τα χλαμυδοσπόρια του μύκητα. Από το παραπάνω υλικό παραλήφθηκε 1ml, το οποίο προστέθηκε σε φιαλίδιο McCartney, μαζί με 9ml απιονισμένο νερό, ώστε να επιτευχθεί αραίωση 10 φορές. Με τη χρήση του αιματοκυτόμετρου βρέθηκε η συγκέντρωση των χλαμυδοσπορίων στο θρεπτικό υλικό και βάσει του τύπου $C_1V_1=C_2V_2$, προστέθηκε σε απιονισμένο νερό ο κατάλληλος όγκος από το αρχικό μόλυσμα του μύκητα, με τελικό σκοπό να παραληφθεί αιώρημα συγκέντρωσης χλαμυδοσπορίων 10^4 .

Στη συνέχεια ζυγίστηκαν 3kg σκόνης ταλκ. Στη σκόνη αυτή προστέθηκε το παραπάνω αιώρημα χλαμυδοσπορίων σε αναλογία 1/10, δηλαδή έτσι .ώστε σε 10g σκόνης να αντιστοιχεί 1ml από το αιώρημα. Ήταν σημαντικό τα δύο υλικά να ανακατευτούν πολύ καλά, ώστε να επιτευχθεί όσο γίνεται πιο ομοιόμορφη διασπορά των χλαμυδοσπορίων στη σκόνη επίπασης. Η σκόνη επίπασης

αποθηκεύτηκε σε νάιλον σακούλα και αφέθηκε εκεί μια εβδομάδα, ώστε να απομακρυνθεί η υγρασία. Κρίθηκε απαραίτητο πριν η σκόνη χρησιμοποιηθεί για την μόλυνση να γίνει επιβεβαίωση της συγκέντρωσης των χλαμυδοσπορίων του μύκητα, μέσω μιας σειράς δεκαδικών αραιώσεων και ελέγχου της ανάπτυξης του μύκητα σε τριβλία με PDA. Τέλος ,πάλι με τη χρήση του τύπου $C_1V_1=C_2V_2$, αναμίχτηκε η σκόνη επίπασης του παθογόνου με χώμα, με τελικό σκοπό το μόλυσμα, το οποίο θα προστίθεται στο φυτό, να έχει τελική συγκέντρωση χλαμυδοσπορίων 10^3 .

2.1.3. Παρασκευή αιωρήματος του βακτηρίου K165

Η μεταφορά του K165 έγινε από τους -80°C , όπου διατηρούνταν σε υδατικό διάλυμα 20% γλυκερόλης, σε τριβλία Petri, με θρεπτικό υλικό NAG, υπό ασηπτικές συνθήκες. Αποικίες του βακτηρίου από τα τριβλία Petri, στα οποία διατηρούνταν η καλλιέργεια, μεταφέρθηκαν υπό ασηπτικές συνθήκες σε κωνική φιάλη που περιείχε 500ml NG. Η κωνική φιάλη τοποθετήθηκε σε περιστροφικό επωαστικό θάλαμο στους 28°C και στις 140r.p.m για 24 h. Έπειτα μετρήθηκε με φωτόμετρο η συγκέντρωση των βακτηριακών κυττάρων και βρέθηκε 10^8 cfu/ml. Ακολούθησε φυγοκέντρωση στις 8.000rpm για 10min των αποικιών που βρίσκονταν στο NG. Αφότου αφαιρέθηκε το υπερκείμενο υγρό καλλιέργειας, το ίζημα από τα βακτηριακά κύτταρα επαναιωρήθηκε σε κατάλληλη ποσότητα απιονισμένου νερού, ώστε να επιτευχθεί συγκέντρωση 10^8 , βάσει του τύπου $C_1V_1=C_2V_2$

2.1.4. Πείραμα Παθογένειας

Για να ελεγχθεί εάν και πόσο αποτελεσματικό είναι το βακτηριακό στέλεχος K-165 κατά του μύκητα *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* αρχικά έγινε ριζοπότισμα, με 10ml από το αιώρημα του βακτηρίου, σε φυτά πεπονιού στο στάδιο των τριών φύλλων. Ακολούθησε, στο στάδιο των τεσσάρων φύλλων, μεταφύτευση των φυτών και μόλυνση αυτών με τη σκόνη επίπασης, που περιείχε 10^4 χλαμυδοσπόρια του μύκητα, σε αναλογία 9 γλαστράκια χώμα προς 1 γλαστράκι σκόνη επίπασης(τελική συγκέντρωση χλαμυδοσπορίων στο χώμα 10^3). Στα φυτά που χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες δεν έγινε ριζοπότισμα με το βακτήριο, αλλά μόνο μόλυνση με το παραπάνω χώμα, που περιείχε τη σκόνη επίπασης ακριβώς στις ίδιες αναλογίες. Χρησιμοποιήθηκαν 40 φυτά, τα οποία χωρίστηκαν σε δύο ομάδες των 20. Τα φυτά έδωσαν τα πρώτα ευδιάκριτα συμπτώματα στις 20 μέρες μετά τη μόλυνση. Τα συμπτώματα καταγράφονταν κάθε 2 μέρες, έως τις 28 μέρες μετά τη μόλυνση. Το ποσοστό της ασθένειας σε κάθε μέτρηση αντιπροσώπευε το λόγο των φύλλων, που παρουσίαζαν τα κλασσικά συμπτώματα της ασθένειας,

προς τον συνολικό αριθμό των φύλλων του φυτού. Τέλος η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με τη δοκιμασία του t (t-Test) για $P \leq 0,05$.

2.2 Πείραμα 2^ο: Διερεύνηση της αποτελεσματικότητας διαφορετικών εφαρμογών του στελέχους K-165 εναντίον του *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis*

2.2.1 Προετοιμασία πειράματος

Το φυτικό υλικό και η παρασκευή των αιωρημάτων και της σκόνης επίπασης του βακτηρίου είναι, όπως περιγράφηκαν παραπάνω. Η ίδια ακριβώς διαδικασία ακολουθήθηκε και για την παρασκευή του μολύσματος.

2.2.2. Παρασκευή σκόνης επίπασης του βακτηρίου K-165.

Αποικίες του βακτηρίου από τα τριβλία Petri, στα οποία διατηρούνταν η καλλιέργεια, μεταφέρθηκαν υπό ασηπτικές συνθήκες σε κωνική φιάλη που περιείχε 100ml NG. Η κωνική φιάλη τοποθετήθηκε σε περιστροφικό επωαστικό θάλαμο στους 28°C και στις 140r.p.m για 24 h. Έπειτα μετρήθηκε με φωτόμετρο η συγκέντρωση των βακτηριακών κυττάρων. Ακολούθησε φυγοκέντρωση στις 8.000rpm για 10min των αποικιών που βρίσκονταν στο NG. Αφότου αφαιρέθηκε το υπερκείμενο υγρό καλλιέργειας, το ίζημα των βακτηριακών κυττάρων επαναιωρηματοποιήθηκε σε κατάλληλη ποσότητα απιονισμένου νερού, ώστε να επιτευχθεί συγκέντρωση 10^8 βακτηριακά κύτταρα/ml, βάσει του τύπου $C_1V_1=C_2V_2$.

Από το παραπάνω αιώρημα παραλήφθηκαν 5ml και το ομογενοποιήθηκαν σε ομογενοποιητή για λίγα δευτερόλεπτα με 5 ml 10% Gum Xanthan και απεσταγμένο νερό, μέχρι να προκύψει μια παχύρρευστη μάζα, η οποία στη συνέχεια προστέθηκε σε 50g σκόνης ταλκ και το μίγμα ανακατεύτηκε έως ότου γίνει ομοιόμορφο και λεπτόκοκκο. Έπειτα αφήθηκε να στεγνώσει για 5-6 μέρες και ακολούθως ελέγχθηκε η συγκέντρωση του βακτηρίου και εδώ με τη διαδικασία των δεκαδικών αραιώσεων.

2.2.5. Διερεύνηση της αποτελεσματικότητας των διαφορετικών εφαρμογών του K-165

Για να εξακριβωθεί αν ο τρόπος με τον οποίο εφαρμόζεται το βακτήριο στα φυτά έχει σημασία στην αποτελεσματικότητά του και αν ναι ποια μέθοδος είναι η πλέον αποτελεσματική

χρησιμοποιήθηκαν 75 φυτά, στα οποία προστέθηκε το βακτήριο με τέσσερις διαφορετικούς τρόπους. Τα φυτά χωρίστηκαν σε ομάδες των 15. Τα φυτά που χρησίμευσαν ως μάρτυρες είχαν μολυνθεί μόνο με το παθογόνο. Σε 15 φυτά έγινε ριζοπότισμα με 20 ml από το αιώρημα του βακτηρίου, στο στάδιο των τριών φύλλων. Στο ίδιο ακριβώς στάδιο σε 15 φυτά έγινε ριζοπότισμα με 10ml από το αιώρημα, γιατί σε αυτά θα ακολουθούσε επαναληπτικό ριζοπότισμα μια εβδομάδα μετά την μόλυνση με το παθογόνο. Στο στάδιο των τεσσάρων φύλλων κατά τη μεταφύτευση των φυτών πραγματοποιήθηκε και η μόλυνση τους με το παθογόνο, το οποίο είχε αναμιχθεί με το χώμα, όπως και στο πρώτο πείραμα στις ίδιες αναλογίες. Ταυτόχρονα σε 15 φυτά έγινε εφαρμογή του βακτηρίου με τη μορφή σκόνης επίπασης, συγκέντρωσης 7×10^7 cfu/ml, όπου το ριζικό σύστημα των φυτών αμέσως πριν τη μεταφύτευση καλύπτονταν εξολοκλήρου από τη σκόνη. Σε άλλα 15 φυτά γινόταν εμβάπτιση (root-dipping) του γυμνού ριζικού συστήματος σε αιώρημα του βακτηρίου για 20min. Η μέτρηση των συμπτωμάτων πραγματοποιήθηκε από τις 12 έως τις 24 μέρες μετά την μόλυνση, κάθε δύο μέρες και κάθε τέσσερις ανάμεσα στις δύο τελευταίες μετρήσεις. Το ποσοστό της ασθένειας και σε αυτό το πείραμα εκφράζει το λόγο των φύλλων, που παρουσίαζαν συμπτώματα της ασθένειας, προς τον συνολικό αριθμό των φύλλων του φυτού και έπειτα βρέθηκε η AUDPC (area under the disease progress curve, εμβαδόν κάτω από την καμπύλη προόδου της ασθένειας) και η σχετική AUDPC. Ο δείκτης της AUDPC υπολογίστηκε με βάση το εμβαδό της καμπύλης του ποσοστού της ασθένειας στο χρόνο, σύμφωνα με τη μέθοδο των Campbell και Madden (1990). Έπειτα υπολογίστηκαν οι τιμές της σχετικής AUDPC, που είναι ο εκατοστιαίος λόγος των πραγματικών τιμών της AUDPC προς αυτές, που θα είχε αν υπήρχε 100% προσβολή και μας δίνει μια εικόνα της έντασης της ασθένειας. Οι τιμές της σχετικής AUDPC επεξεργάστηκαν στατιστικά με τη μέθοδο ANOVA και ο διαχωρισμός των μέσων όρων έγινε με πολλαπλή δοκιμή κατά Tukey (Tukey's multiple range test).

2.3 Πείραμα 3^ο: Μελέτη της πληθυσμιακής πυκνότητας στη ριζόσφαιρα του στελέχους K-165, όταν εφαρμόζεται με διαφορετικές μεθόδους

2.3.1 Προετοιμασία πειράματος

Το φυτικό υλικό και η παρασκευή των αιωρημάτων και της σκόνης επίπασης του βακτηρίου είναι, όπως περιγράφηκαν παραπάνω. Η διαφορά είναι ότι εδώ χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος K165^{mf}, ώστε να είναι δυνατή η απομόνωση του από τους υπόλοιπους μικροοργανισμούς στη ριζόσφαιρα. Στο θρεπτικό υλικό, που αναπτύχθηκε το βακτήριο, όταν βγήκε από τους -80 °C, είχαν προστεθεί Rifampicin σε αναλογία 100μg/ml υλικού.

2.3.2 Εκτέλεση πειράματος

Για τη μελέτη της πληθυσμιακής πυκνότητας του στελέχους K-165, εφαρμόστηκε το βακτήριο σε φυτά πεπονιού με τέσσερις διαφορετικούς τρόπους. Χρησιμοποιήθηκαν 12 φυτά, στα οποία έγινε ριζοπότισμα σε δύο επαναληπτικές δόσεις, 12 φυτά, στα οποία το ριζοπότισμα έγινε μία φορά και 2 ομάδες των 9 φυτών, που έγινε εφαρμογή του βακτηρίου με εμβάπτιση και τη σκόνη επίπασης, αντίστοιχα. Η μόλυνση των φυτών έγινε ακριβώς με τον ίδιο τρόπο και στα ίδια χρονικά διαστήματα του Πειράματος 2, ώστε να υπάρξει μια συσχέτιση του πληθυσμού του βιολογικού παράγοντα με την αποτελεσματικότητα του κατά του *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis*.

Σε χρονικά διαστήματα των 7 ημερών γινόντουσαν οι μετρήσεις της πληθυσμιακής πυκνότητας του βακτηρίου. Οι μετρήσεις ξεκίνησαν 7 ημέρες μετά την εφαρμογή του βακτηρίου, για κάθε επέμβαση, ανάλογα με το πότε αυτή έγινε. Λαμβάνονταν τρία φυτά από κάθε εφαρμογή, από τα οποία κρατάγαμε μόνο τη μπάλα χόματος. Ο έλεγχος γινόταν με τη διαδικασία των αραιώσεων.

Από τη μπάλα χόματος των ριζών ζυγίζονταν 1g χόματος, το οποίο έπρεπε να είναι όσο γίνεται πιο αντιπροσωπευτικό και να περιέχει εξίσου χόμα και ριζικά τριχίδια. Το χόμα αυτό αναμιγνύονταν με 10ml ρυθμιστικού διαλύματος σε φιαλίδιο McCartney και ακολουθούσε πολύ καλή ανακίνηση με vortex και μεταφορά 1ml από το παραπάνω διάλυμα σε 9ml ρυθμιστικού διαλύματος σε φιαλίδιο McCartney και ανακίνηση. Η διαδικασία αυτή επαναλήφθηκε 3 ακόμα φορές (έως συγκέντρωση 10^{-5} cfu/ml), για όλες τις εφαρμογές πλην του ριζοποτίσματος, σε μία δόση, όπου επαναλήφθηκε 4 φορές (έως συγκέντρωση 10^{-6} cfu/ml). Στη συνέχεια 0,5ml

αιωρήματος από τα φιαλίδια συγκέντρωσης 10^{-3} και 10^{-5} , από τις εφαρμογές εμβάπτιση, σκόνη επίπασης και ριζοπότισμα σε δύο δόσεις, και 10^{-4} και 10^{-6} , για το ριζοπότισμα σε μία δόση, μεταφέρονταν σε τριβλία με NAG^{rif}. Τα τριβλία τοποθετούνταν στον επωαστικό θάλαμο στους 22 °C, για 3 μέρες. Όλες οι παραπάνω διαδικασίες έγιναν υπό ασηπτικές συνθήκες.

Έπειτα από δύο ημέρες μετρούνταν οι αποικίες του βακτηρίου σε κάθε τριβλίο και γινόνταν αναγωγή των αποικιών ανά g ριζόσφαιρας. Τέλος υπολογίστηκαν οι μέσοι όροι των δειγμάτων για κάθε εφαρμογή και κάθε χρονικό διάστημα και εκτιμήθηκε τόσο η πυκνότητα του πληθυσμού του βακτηρίου στη ρίζόσφαιρα, όσο και η πορεία του, για κάθε εφαρμογή.

2.4. Πείραμα 4^ο: Αξιολόγηση της ικανότητας του στελέχους K-165 να επάγει διασυστηματική (ISR) αντοχή σε φυτά πεπονιάς, μέσω διαφορετικών εφαρμογών

2.4.1 Προετοιμασία πειράματος

Το φυτικό υλικό και η παρασκευή των αιωρημάτων και της σκόνης επίπασης του στελέχους K-165 είναι ίδια με αυτά που περιγράφηκαν στο δεύτερο πείραμα. Στο πείραμα αυτό χρησιμοποιήθηκαν τα ίδια φυτά του πειράματος 3. Πριν πάρουμε το δείγμα χώματος από τη ριζόσφαιρα των φυτών, κρατάγαμε 5cm από το στέλεχος των φυτών, ξεκινώντας από τη βάση του φυτού. Τα στελέχη αυτά, αφού απομακρύνουμε το χώμα, τα αποθηκεύαμε στους -80°C. Έτσι για κάθε εφαρμογή είχαμε τρία φυτά, κάθε 7 ημέρες. Στο πείραμα αυτό χρησιμοποιήθηκαν και 3 φυτά ως μάρτυρες, στα οποία δεν είχε γίνει καμία εφαρμογή του βακτηρίου.

2.4.2. Σχεδιασμός των εκκινητών

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την Real-time PCR προήλθαν από μια εργασία του Shoresh *et al.* (2005) για το σήμα της διασυστηματικής αντοχής, σε φυτά αγγουριάς από την εφαρμογή του *Trichoderma asperellum*. Αν και οι εκκινητές είχαν σχεδιαστεί πάνω στις αλληλουχίες των γονιδίων του αγγουριού, δούλεψαν με μεγάλη αποδοτικότητα στο πεπόνι και η ενίσχυση τους με PCR έδωσε μόνο ένα προϊόν. Η αλληλουχία του γονιδίου *LOX* κωδικοποιεί μια 13 λιποξυγενάση, όπως αναφέρεται στην ίδια εργασία. Ως γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο *18S*, πάλι από την ίδια εργασία. Οι αλληλουχίες των εκκινητών, που χρησιμοποιήθηκαν είναι:

Lox1, forward 5'-AAGGTTTGCCTGTCCCAAGA-3'
reverse 5'-TGAGTACTGGATTAAGTCCAGCCAA-3'

Chit1, forward 5'-TGGTCACTGCAACCCTGACA-3'
reverse 5'-AGTGGCCTGGAATCCGACT-3'

Pal1, forward 5'-ATGGAGGCAACTTCCAAGGA-3'
reverse 5'-CCATGGCAATCTCAGCACCT-3';

18s, forward 5'-GTTGCTTTAAGGACTCCGCCA-3'
reverse 5'-AGGGGTACCTCCGCATAGCTAG-3'

2.4.3. Απομόνωση γονιδιακού DNA από τα φυτά πεπονιού.

Η απομόνωση γονιδιακού DNA από φυτά πεπονιού πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο των Dellaporta *et al.*, (1983). Αρχικά παραλήφθηκε το υπέργειο μέρος του φυτού, ξεκινώντας από τη βάση του και το οποίο καθαρίστηκε με απιονισμένο νερό προκειμένου να

απαλλαγεί από το χώμα. Στη συνέχεια κονιορτοποιήθηκε με χρήση υγρού αζώτου σε αποστειρωμένα ιγδία. Περίπου 80-100 mg κονιορτοποιημένου ιστού αναμίχθηκαν με 500 μl ρυθμιστικού διαλύματος απομόνωσης (50 mM EDTA pH 8, 500 mM NaCl, 10 mM β-mercaptoethanol) και 33μl SDS και επώαση στους 65°C για 20 λεπτά. Στη συνέχεια προστέθηκαν 160 μl ρυθμιστικού διαλύματος οξικού καλίου (pH 4.5) και μετά από ανάδευση τοποθετήθηκαν στο πάγο για 20 λεπτά. Ακολούθησε φυγοκέντρηση των δειγμάτων στις 10.000g για 10min στους 4 °C και μεταφορά της υπερκείμενης φάσης. Στη συνέχεια έγινε κατακρήμνιση των νουκλεϊκών οξέων με 0.5 όγκους ισοπροπανόλης και φυγοκέντρηση στις 10.000g για 15min. Το DNA παραλήφθηκε ως ίζημα, στο οποίο έγινε έκπλυση με διάλυμα αιθανόλης 70%, ώστε να απομακρυνθούν τυχόν άλατα. Ακολούθησε στέγνωμα του ιζήματος DNA για 5-10 min σε θερμοκρασία δωματίου και επαναιώρηση του σε 30μl αποστειρωμένου και απιονισμένου νερού.

2.4.4. Απομόνωση RNA από φυτά Πεπονιού

Η απομόνωση ολικού RNA από τα φυτά του πεπονιού πραγματοποιήθηκε με τη χρήση Trizol της εταιρείας Ambion (Αμερική) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Για τη διαδικασία αυτή, κόπηκαν περίπου 5cm από το υπέργειο μέρος κάθε φυτού στο επίπεδο του χώματος, καθαρίστηκαν με αποστειρωμένο απιονισμένο νερό και κονιορτοποιήθηκαν με χρήση υγρού αζώτου σε αποστειρωμένα ιγδία. 80-100 mg κονιορτοποιημένου φυτικού ιστού τοποθετήθηκαν σε πλαστικό σωλήνα 1.5 ml και αναμείχθηκαν με 1 ml Trizol. Για κάθε διαφορετική μέτρηση χρησιμοποιήθηκαν πέντε διαφορετικά στελέχη. Μετά από 5 min, ακολούθησε ανάμειξη με 200 μl χλωροφόρμιο, παραμονή για 3 min σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκέντρηση στις 12.000 rpm στους 4 °C για 15 min. Η υπερκείμενη φάση μεταφέρθηκε σε νέο σωλήνα 1.5 ml και ακολούθησε εκχύλιση με ίσο όγκο φαινόλη: χλωροφόρμιο (1:1, v:v). Μετά από ανάδευση, φυγοκέντρηση (για 15 min στις 12.000 rpm και 4 °C) και μεταφορά της υπερκείμενης φάσης, ακολούθησε κατακρήμνιση των νουκλεϊκών οξέων με προσθήκη 500μl ισοπροπανόλης, ανάμειξη και παραμονή για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου. Το ίζημα RNA παραλήφθηκε μετά από φυγοκέντρηση για 15min στις 12.000 rpm και 4 °C και απομάκρυνση των αλάτων με έκπλυση με διάλυμα αιθανόλης 70%. Ακολούθησε στέγνωμα του ιζήματος RNA για 5 – 10 min σε θερμοκρασία δωματίου και επαναιώρηση του σε 50μl υπερκάθαρο νερό, απαλλαγμένο από ριβοζονουκλεάσες (RNase free water). Το RNA φυλάχτηκε σε βαθιά κατάψυξη (-80 °C) για περαιτέρω χρήση.

2.4.5. Μέτρηση νουκλεϊκών οξέων

Η συγκέντρωση του RNA υπολογίστηκε σε Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer (Saveen Werner, Malmö, Sweden).

2.4.6. Αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής

Η αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής εφαρμόστηκε για τον καθορισμό του επιπέδου μεταγραφής των υπό μελέτη γονιδίων *LOX*, *PAL1* και *CHIT1* που πιθανόν να επάγονται από την προσθήκη του βιολογικού παράγοντα στη ριζόσφαιρα των φυτών του πεποنيού και του γονιδίου *18S* του φυτού *Cucumis sativus* που χρησιμοποιήθηκε σαν γονίδιο αναφοράς.

Για να αποτραπεί η οποιαδήποτε επιμόλυνση του δείγματος με DNA σε πρώτη φάση πραγματοποιείται χειρισμός του RNA με ένζυμο δεσοξυριβοζονουκλεάσης (DNase, Invitrogen) και επώαση στους 37 °C για 15 min. Έπειτα προστίθεται 1μl EDTA και επώαση των δειγμάτων στους 65°C για 10min, ώστε να τερματιστεί η δράση του ενζύμου.

Αντιδραστήρια	Όγκος
Ρυθμιστικό Διάλυμα DNase I	1 μl
DNase I (Invitrogen)	1 μl
EDTA (Invitrogen)	1 μl
Ολικό RNA	1000ng
α.α. H ₂ O	έως τα 10 μl

Για την αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο της Superscript II ή αντίστροφης μεταγραφάσης της εταιρείας Fermentas. Η σύνθεση cDNA πραγματοποιήθηκε σε δύο στάδια. Στο πρώτο στάδιο έγινε αποδιάταξη ποσότητας 0,1-5μg ολικού RNA (ποσότητα που αντιστοιχούσε σε 10μl δείγματος) με 1μl εκκινητή oligo-dT και προσθήκη 1,5μl νερού (HPLC grade) σε τελικό όγκο 12,5μl στους 65 °C για 5 min και ακολούθως η αντίδραση τοποθετήθηκε σε πάγο. Κατά το δεύτερο στάδιο προστέθηκαν τα παρακάτω αντιδραστήρια μετά από σύντομη φυγοκέντρηση:

Αντιδραστήρια	Όγκος
Ρυθμιστικό διάλυμα αντίστροφης μεταγραφάσης	4μl
Αναστολέας RNase (Fermentas)	0,5μl
DNTPs (10mM)	2μl
Αντίστροφη Μεταγραφάση Superscript II H ⁺ (Fermentas)	1μl
Τελικός όγκος αντίδρασης	20 μl

Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο 20 μl και επώαστηκε για 50 min στους 42 °C. Ακολούθησε απενεργοποίηση του ενζύμου στους 75 °C για 15 min. Για την ενίσχυση με PCR του μεταγραφήματος του υπό μελέτη γονιδίου πραγματοποιήθηκε αντίδραση σε 1 μl από την αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής χρησιμοποιώντας εκκινητές που είχαν σχεδιαστεί στις κωδικές περιοχές των υπό μελέτη γονιδίων (Sambrook et al., 1989).

Η έκφραση των γονιδίων υπολογίστηκε από το λόγο των μέσων όρων της έκφρασης του εκάστοτε γονιδίου προς την αντίστοιχη του μάρτυρα, όπου η έκφραση ισούται με $2^{-\Delta CT}$, $\Delta CT = CT_{\text{gene}} - CT_{\text{ref gene}}$ (CT, threshold cycle).

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1. Πείραμα 1^ο: Μελέτη της αποτελεσματικότητας του βακτηρίου *Paenibacillus alvei* (στέλεχος K165) ως βιολογικού παράγοντα εναντίον του μύκητα *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*.

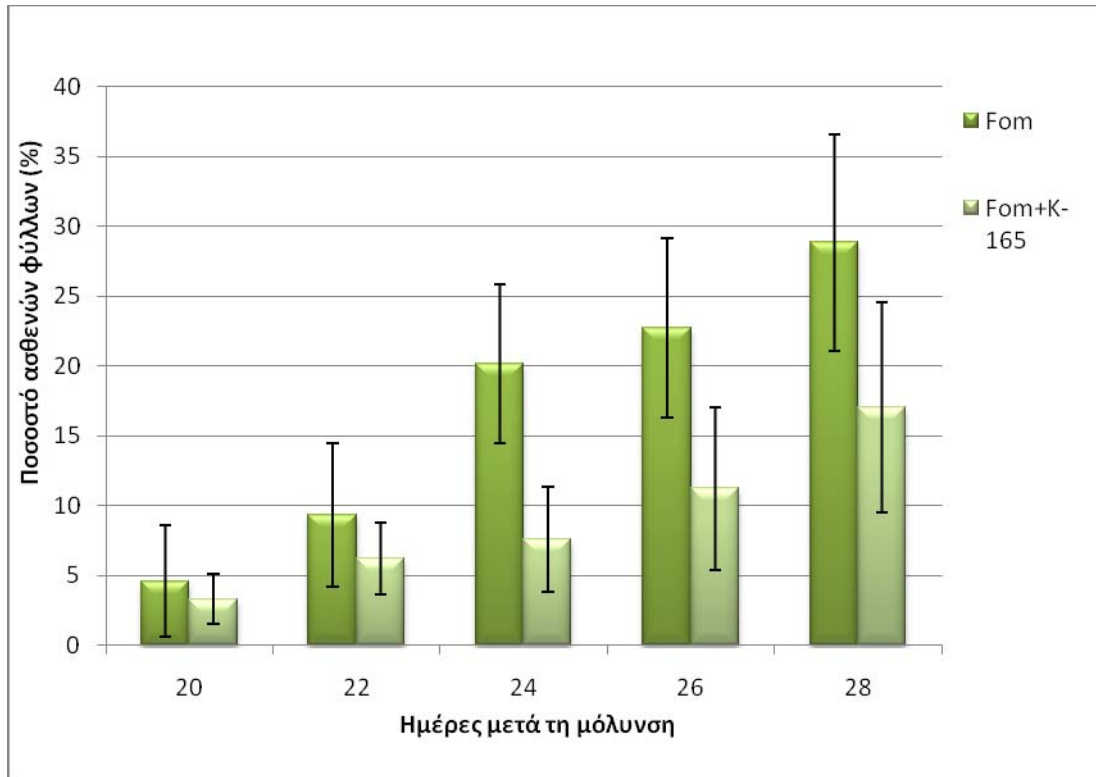
Στο πείραμα αυτό αξιολογήθηκε η αποτελεσματικότητα του βακτηρίου *Paenibacillus alvei*, στέλεχος K-165, ως βιολογικού παράγοντα εναντίον του μύκητα *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis*. Πραγματοποιήθηκαν δοκιμές παθογένειας ανάμεσα σε φυτά που είχαν μολυνθεί με το μύκητα και είχε εφαρμοστεί και το βακτήριο και σε φυτά-μάρτυρες, που είχαν μολυνθεί με το μύκητα μόνο, όπως περιγράφηκε στην παράγραφο 2.1.4.

Τα πρώτα συμπτώματα καταγράφηκαν στις 20 μέρες μετά τη μόλυνση με το παθογόνο, κυρίως ως χλωρώσεις και μαράνσεις. Τα συμπτώματα καταγράφονταν ανά δύο μέρες, έως τις 28 μέρες μετά τη μόλυνση. Στις μετρήσεις καταγράφονταν και ο συνολικός αριθμός των φύλλων του φυτού και η ασθένεια εκφράστηκε ως ποσοστό ασθενών φύλλων προς το σύνολο των φύλλων.

Στο *Γράφημα 1* η ασθένεια εμφανίζεται εντονότερη στα φυτά, που δεν είχε εφαρμοστεί το βακτήριο. Στα φυτά που είχε εφαρμοστεί το βακτήριο η ασθένεια παρουσιάζει πιο αργή εξέλιξη. Σε κάθε μέτρηση τα φυτά που είχαν ριζοποτιστεί με το στέλεχος K-165 φαίνεται ότι έχουν λιγότερο έντονα συμπτώματα (μικρότερος αριθμός ασθενών φύλλων στο σύνολο). Μέχρι τις 24 μέρες μετά τη μόλυνση η εφαρμογή του βακτηρίου δείχνει να μειώνει σημαντικά το ποσοστό της ασθένειας σε σχέση με το μάρτυρα, όμως στο τέλος δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά με τον μάρτυρα, όπως έδειξε η δοκιμασία του t (t-Test) για $P \leq 0,05$.

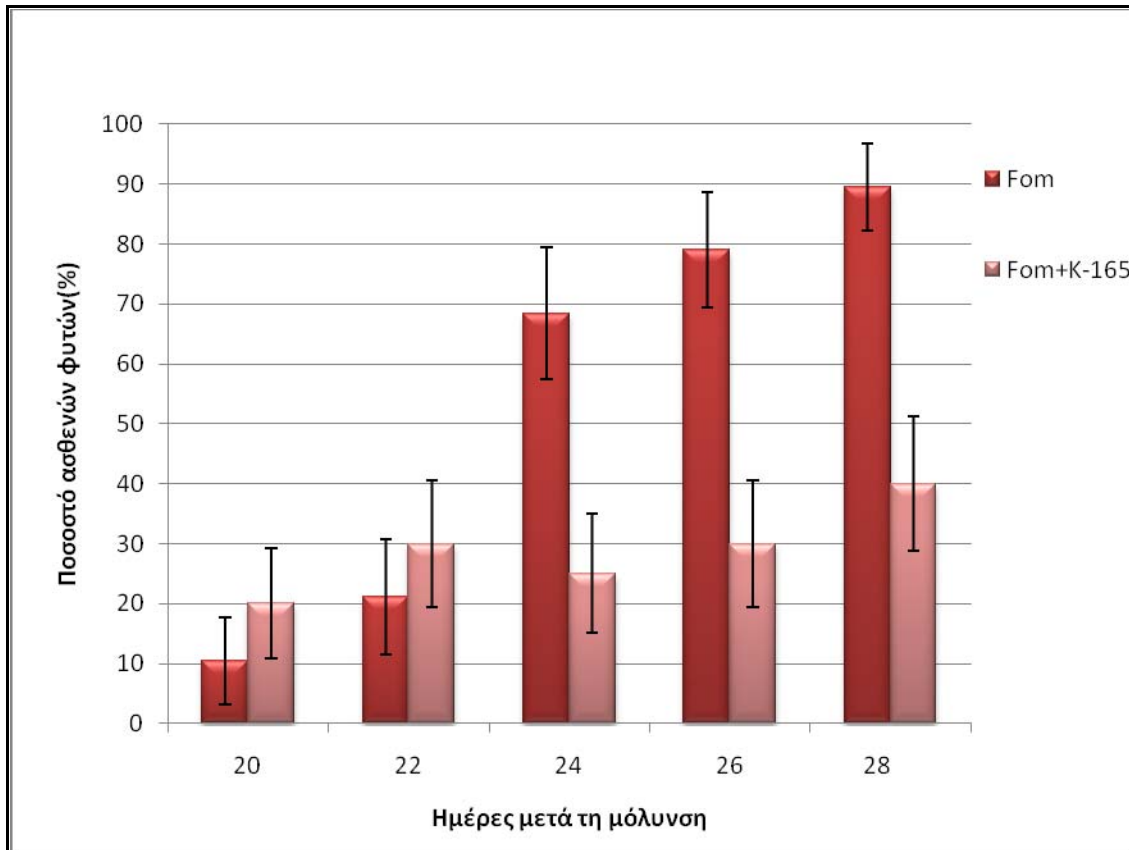
Στο *Γράφημα 2* εκφράζεται το ποσοστό των ασθενών φυτών προς τον συνολικό αριθμό των φυτών κάθε επέμβασης. Στο γράφημα αυτό δεν μπορεί να εκτιμηθεί η ένταση της ασθένειας, αφού και ένα φύλλο να εμφανίζει συμπτώματα και περισσότερα καταγράφονται το ίδιο. Αυτό που γίνεται εμφανές είναι ότι στα φυτά του μάρτυρα έχουμε μια συνεχή αύξηση στην εμφάνιση της ασθένειας, μέχρι τις 28dpr, όπου σχεδόν το 100% των φυτών έχει προσβληθεί. Αντίθετα, στα φυτά που έχει εφαρμοστεί το στέλεχος K-165, οι νέες μολύνσεις με την πάροδο του χρόνου είναι λίγες. Το ποσοστό των προσβεβλημένων φυτών στις 20dpr είναι 20% και καταλήγει 40% στις 28dpr. Στις πρώτες μετρήσεις τα προσβεβλημένα φυτά, που έχει εφαρμοστεί το βακτήριο, είναι περισσότερα, όμως στο τέλος τα φυτά του μάρτυρα είναι περισσότερα.

Ο συσχετισμός των δύο γραφημάτων καθιστά εμφανές ότι τα φύλλα, που παρουσιάζουν συμπτώματα της ασθένειας, έχουν πιο ομοιόμορφη κατανομή στα φυτά του μάρτυρα, σε αντίθεση με αυτά, στα οποία έχει εφαρμοστεί ο βιολογικός παράγοντας, όπου λιγότερα φυτά έχουν περισσότερα φύλλα με συμπτώματα.



Γράφημα 1: Αξιολόγηση του στελέχους K-165 εναντίον του *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis*.

Παρατηρείται μειωμένο ποσοστό ασθενών φύλλων στα φυτά που έχει εφαρμοστεί το βακτήριο σε σχέση με το μάρτυρα. Η ασθένεια αν και εμφανίζεται λιγότερο σοβαρή στα φυτά που έχει εφαρμοστεί το K-165, δεν καταλήγει σε στατιστικά σημαντική διαφορά, σύμφωνα με τη δοκιμασία του t (t-Test) για $P \leq 0,05$.



Γράφημα 2: Αξιολόγηση του στελέχους K-165 εναντίον του *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis*, με βάση το ποσοστό των ασθενών φυτών. Τα προσβεβλημένα φυτά, που έχει εφαρμοστεί το βακτήριο σε σχέση με τα φυτά του μάρτυρα, αυξάνονται με πολύ μικρότερο ρυθμό στη μονάδα του χρόνου και στις 28dπi η διαφορά στο ποσοστό ασθενών φυτών μεταξύ των δύο επεμβάσεων είναι μεγάλη. Η ασθένεια παρουσιάζει μικρότερη συχνότητα εμφάνισης στα φυτά, όταν προστεθεί ο βιολογικός παράγοντας K-165.

3.2. Πείραμα 2^ο: Διερεύνηση της αποτελεσματικότητας διαφορετικών εφαρμογών του στελέχους K-165 εναντίον του *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis*

Στο πείραμα αυτό έγινε μια διερεύνηση της αποτελεσματικότητας των διαφόρων μεθόδων, με τις οποίες μπορεί να εφαρμοστεί ο βιολογικός παράγοντας στο φυτό, ώστε να επιτευχθεί η μέγιστη δυνατή αποτελεσματικότητα. Οι διάφορες επεμβάσεις διέφεραν, επίσης, ως προς τον χρόνο στον οποίο πραγματοποιήθηκαν σε σχέση με τη μόλυνση με το παθογόνο, ώστε να υποδειχθεί αν ο χρόνος έχει σημασία και αν ναι πότε είναι η καταλληλότερη χρονική στιγμή να γίνει η εφαρμογή του συγκεκριμένου βακτηρίου στα φυτά πεπονιού.

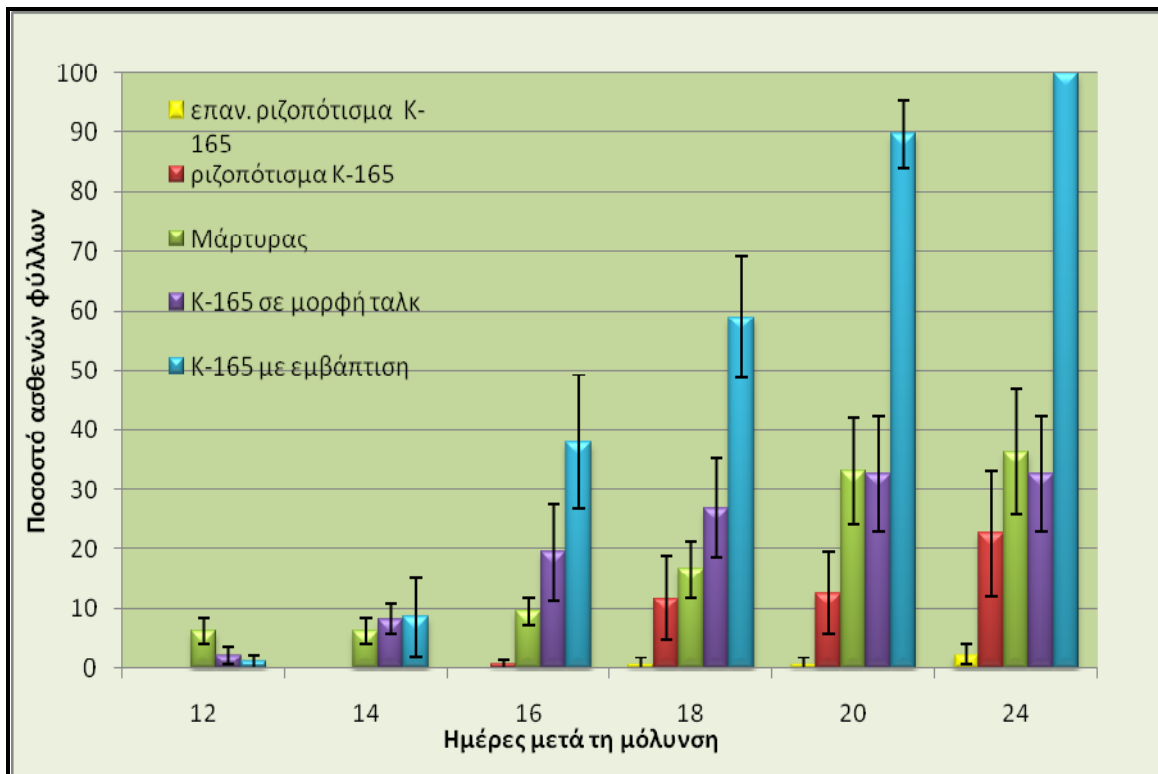
Οι επεμβάσεις, όπως ειπώθηκε και στο κεφάλαιο 2.2., ήταν ριζοπότισμα πριν τη μόλυνση, ριζοπότισμα πριν τη μόλυνση και επανάληψη του μια εβδομάδα μετά, σκόνη επίπασης (ταλκ) και εμβάπτιση. Η διερεύνηση της καλύτερης επέμβασης έγινε με δοκιμές παθογένειας ανάμεσα στις επεμβάσεις και μια σειρά φυτών, που χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες και στα οποία δεν είχε γίνει εφαρμογή του βακτηρίου.

Οι μετρήσεις σε αυτό το πείραμα ξεκίνησαν 12 μέρες μετά την μόλυνση με το παθογόνο, γιατί τότε έγιναν εμφανή τα πρώτα συμπτώματα και έφτασαν ως τις 24dpi. Η καταγραφή γινόταν κάθε δύο μέρες μέχρι τις 20 dpi, ενώ μετά μεσολάβησαν τέσσερις μέρες ως την τελευταία καταγραφή, δεδομένου ότι η ασθένεια εξελίσσονταν πιο αργά.

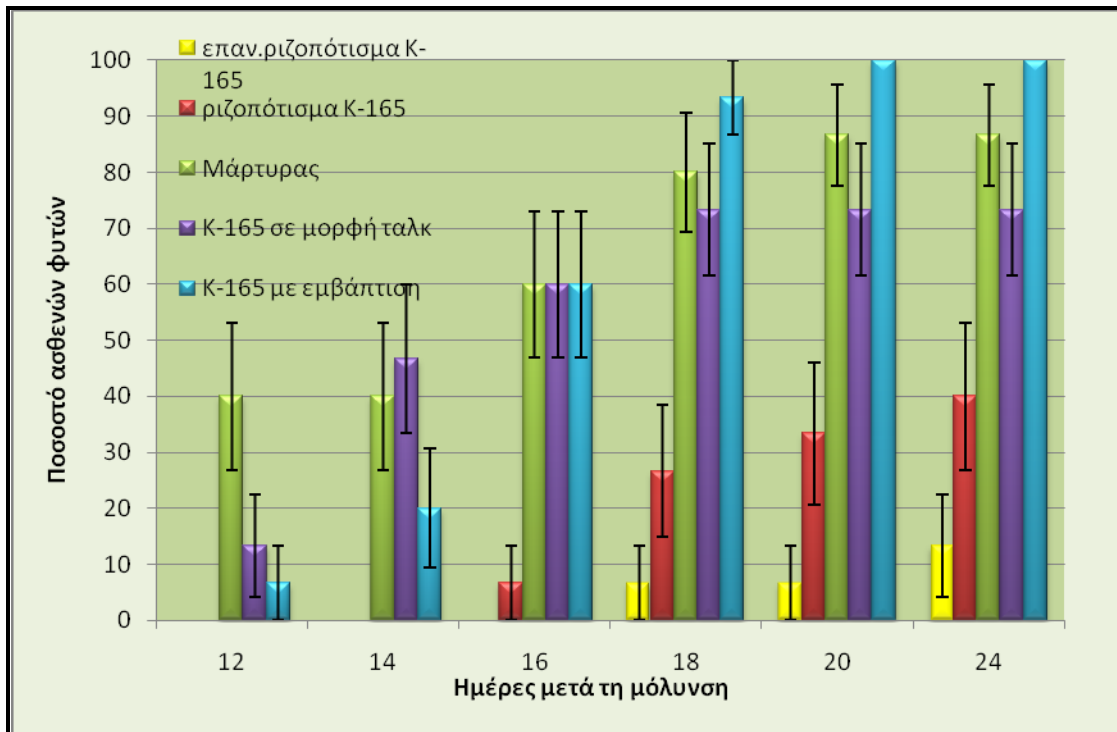
Στο *Γράφημα 3* εμφανίζεται το ποσοστό των φύλλων που παρουσίαζαν συμπτώματα της ασθένειας προς τον συνολικό αριθμό φύλλων του φυτού. Η σύγκριση των επεμβάσεων γίνεται με βάση το ποσοστό των προσβεβλημένων φύλλων σε σχέση με αυτό του μάρτυρα. Τα πρώτα φυτά που δίνουν συμπτώματα είναι του μάρτυρα και των επεμβάσεων ταλκ και εμβάπτιση. Τα φυτά που έχει γίνει ένα ριζοπότισμα δίνουν τα πρώτα συμπτώματα στις 16dpi, ενώ αυτά στα οποία έχει επαναληφθεί το ριζοπότισμα στις 18dpi. Όσο αφορά την εξέλιξη της ασθένειας για κάθε επέμβαση βλέπουμε ότι στα φυτά που έχει γίνει εμβάπτιση, μέχρι τις 14dpi έχουν παρόμοιο αριθμό συμπτωμάτων με το μάρτυρα, όμως από τις 16dpi και μέχρι το τέλος η διαφορά συνεχώς αυξάνεται καταλήγοντας σε ένα ποσοστό 100% προσβολής την τελευταία μέρα, ενώ το αντίστοιχο ποσοστό του μάρτυρα είναι περίπου 40%. Τα φυτά που το K-165 έχει εφαρμοστεί με τη μορφή σκόνης επίπασης, πέρα της πρώτης μέτρησης, σε όλες τις άλλες δίνουν παρόμοια συμπτώματα με τον μάρτυρα, όπως και το ριζοπότισμα σε μία δόση. Αν και τα φυτά αυτής της

επέμβασης καθυστερούν σε σχέση με τον μάρτυρα να δώσουν συμπτώματα στις 24hpi το ποσοστό των ασθενών φύλλων είναι ελάχιστα μικρότερο από αυτό του μάρτυρα. Η τελευταία επέμβαση αφορά το ριζοπότισμα σε δύο δόσεις, μια πριν τη μόλυνση και μια μετά. Η επέμβαση αυτή δίνει τελευταία από όλες τα πρώτα συμπτώματα, στις 18hpi, και η εξέλιξη της ασθένειας στο χρόνο είναι πάρα πολύ μικρή, ενώ το ποσοστό των ασθενών φύλλων σε σχέση με του μάρτυρα την τελευταία μέρα είναι σημαντικά μικρότερο. Σε μια σύγκριση ανάμεσα στις επεμβάσεις, την τελευταία μέρα, φαίνεται ότι η εμφάνιση είχε καθολική προσβολή, το ταλκ και η εμφάνιση παρόμοια με του μάρτυρα προσβολή, μικρότερη σημαντικά της εμφάνισης, ενώ ανάμεσα τους το ριζοπότισμα έχει μικρότερο, αλλά όχι σημαντικά, ποσοστό προσβεβλημένων φύλλων. Τέλος το ριζοπότισμα με επαναλαμβανόμενη δόση έχει πολύ μικρό ποσοστό προσβεβλημένων φύλλων, σημαντικά μικρότερο των υπόλοιπων τριών επεμβάσεων.

Στο *Γράφημα 4* παρουσιάζεται ο αριθμός των ασθενών φυτών κάθε εφαρμογής του βακτηρίου, καθώς και του μάρτυρα. Η χρονική στιγμή που εμφανίζονται τα πρώτα ασθενή φυτά σε κάθε επέμβαση είναι ίδια με του παραπάνω γραφήματος. Η εφαρμογή του βακτηρίου με εμφάνιση, όπως ήταν αναμενόμενο, την τελευταία μέρα φτάνει σε ποσοστό προσβολής 100%, όμως δεν έχει πια τη μεγάλη διαφορά ποσοστού με το μάρτυρα, όπως στο προηγούμενο γράφημα. Η μεγάλη διαφορά ανάμεσα στις επεμβάσεις και σε σχέση με τον μάρτυρα, όταν η ασθένεια εκφράζεται ως ποσοστό ασθενών φυτών και όχι φύλλων παρατηρείται στις επεμβάσεις του ριζοποτίσματος και του ταλκ. Το ταλκ εξακολουθεί να δίνει παρόμοια ποσοστά με αυτά του μάρτυρα, όμως όχι και το ριζοπότισμα, το οποίο πλέον έχει σημαντική διαφορά και από τον μάρτυρα και από το ταλκ. Όπως και στο προηγούμενο πείραμα, φαίνεται ότι η κατανομή των φύλλων με συμπτώματα της ασθένειας δεν είναι ομοιόμορφη ανάμεσα στα φυτά, στην εφαρμογή με ριζοπότισμα. Τέλος το ριζοπότισμα, με επαναληπτική δόση, παραμένει η εφαρμογή με το μικρότερο ποσοστό ασθένειας τόσο σε σχέση με τον μάρτυρα όσο και με τις υπόλοιπες εφαρμογές. Όπως και να εκφράζεται αυτή.

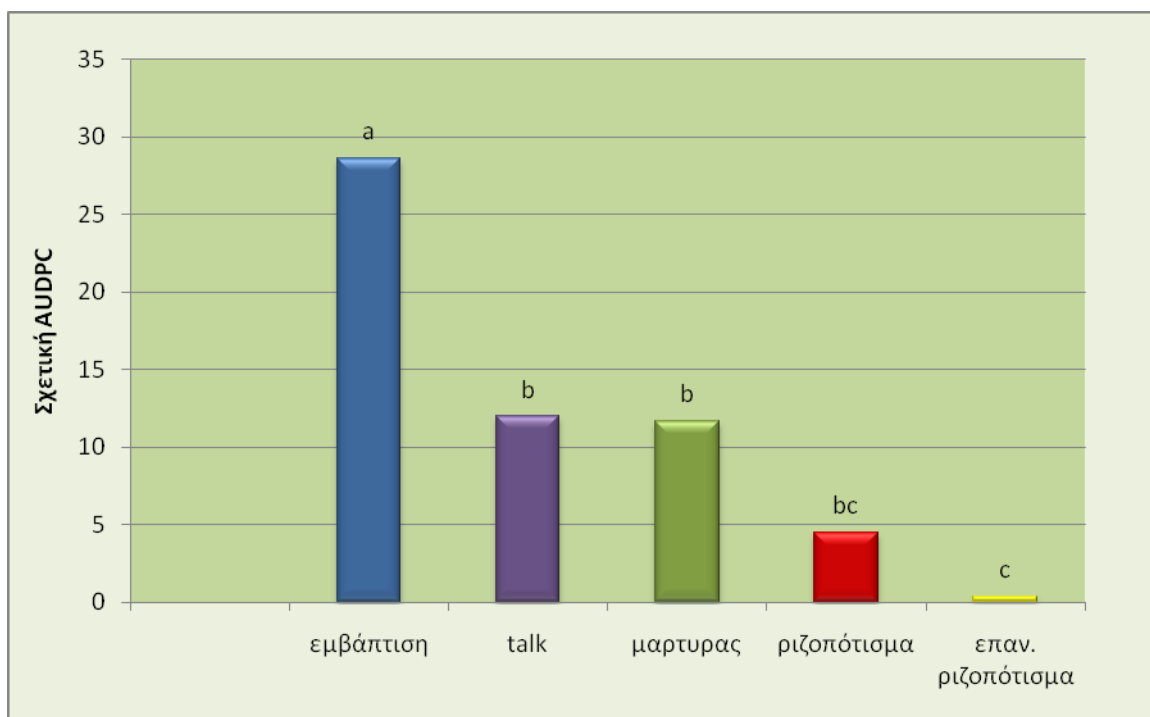


Γράφημα 3: Αξιολόγηση των διαφόρων εφαρμογών του στελέχους K-165 εναντίον του *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis*. Παρατηρείται το μειωμένο ποσοστό φύλλων με συμπτώματα της ασθένειας στα φυτά που έχει εφαρμοστεί το βακτήριο με ριζοπότισμα, το οποίο επαναλήφθηκε μετά τη μόλυνση, σε σχέση με το μάρτυρα, το παρόμοιο ποσοστό ασθενών φύλλων μεταξύ μάρτυρα, ριζοποτίσματος και τάλκ, καθώς και η καθολική προσβολή των φυτών, που έγινε εμβάπτιση. Η ασθένεια παρουσιάζει μειωμένη σοβαρότητα σε σχέση με το μάρτυρα στα φυτά που έχει γίνει επαναληπτικό ριζοπότισμα και το ίδιο σοβαρή σε αυτά που έχει γίνει ένα ριζοπότισμα ή επίπαση με ταλκ. Ιδιαίτερα σοβαρή είναι η ασθένεια όταν η εφαρμογή γίνεται με εμβάπτιση.



Γράφημα 4: Αξιολόγηση των διαφόρων εφαρμογών του στελέχους K-165 εναντίον του *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis*, ως ποσοστό ασθενών φυτών. Παρατηρείται ο μειωμένος αριθμός ασθενών φυτών στα φυτά που έχει εφαρμοστεί το βακτήριο με ριζοπότισμα, το οποίο επαναλήφθηκε μετά τη μόλυνση, σε σχέση με το μάρτυρα και τις υπόλοιπες εφαρμογές, το παρόμοιο ποσοστό μεταξύ μάρτυρα και τάλκ, το μικρότερο ποσοστό του ριζοποτίσματος σε σχέση με τον μάρτυρα, το τάλκ και την εμβάπτιση, καθώς και η καθολική προσβολή των φυτών, που έγινε εμβάπτιση. Η συχνότητα εμφάνισης της ασθένειας είναι πολύ μικρή στα φυτά, με επαναλαμβανόμενο ριζοπότισμα, σε σχέση με το μάρτυρα, όπως μικρότερη είναι και στην περίπτωση του ενός ριζοποτίσματος. Στις 24ήρι τα φυτά, που εφαρμόστηκε το βακτήριο είτε με εμβάπτιση είτε με τάλκ έχουν παρόμοια με του μάρτυρα συχνότητα εμφάνισης της ασθένειας.

Στο *Γράφημα 5* έχει υπολογιστεί η σχετική AUDPC, ώστε να δοθεί μια εικόνα του ποσού της ασθένειας, για κάθε διαφορετική εφαρμογή του βιολογικού παράγοντα. Οι τιμές της σχετικής AUDPC επεξεργάστηκαν στατιστικά με τη μέθοδο ANOVA και ο διαχωρισμός των μέσων όρων έγινε με πολλαπλή δοκιμή κατά Tukey (Tukey's multiple range test). Στο γράφημα η στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των εφαρμογών παρουσιάζεται με διαφορετικό γράμμα. Φαίνεται ότι το ταλκ και το ριζοπότισμα δεν διαφέρουν από το μάρτυρα, ενώ αντίθετα διαφορετικές παρουσιάζονται οι εφαρμογές της εμβάπτισης και του ριζοποτίσματος με επαναληπτική δόση. Δεδομένου ότι η σχετική AUDPC μας δίνει μια εικόνα για την ένταση της ασθένειας, είναι προφανές πως η ασθένεια εμφανίζεται με πολύ μεγάλη ένταση, μεγαλύτερη του μάρτυρα, όταν το K-165 εφαρμόζεται με εμβάπτιση. Αντίθετα, το ριζοπότισμα με επαναληπτική δόση μειώνει πολύ την ένταση της ασθένειας και σε σχέση με τον μάρτυρα και σε σχέση με όλες τις άλλες επεμβάσεις.



Γράφημα 5: Παρουσιάζεται η σχετική AUDPC για τις διάφορες επεμβάσεις και τον μάρτυρα. Στις τιμές έχει γίνει στατιστική επεξεργασία με τη μέθοδο ANOVA και ο διαχωρισμός των μέσων όρων έγινε με πολλαπλή δοκιμή κατά Tukey. Οι διαφορετικές επεμβάσεις παρουσιάζονται με διαφορετικό γράμμα. Η ένταση της ασθένειας είναι σημαντικά μεγαλύτερη στην εφαρμογή του K-165 σε σχέση με το μάρτυρα και σημαντικά μικρότερη στο ριζοπότισμα με επαναληπτική δόση. Οι εφαρμογές του ενός ριζοποτίσματος και του ταλκ παρουσιάζουν παρόμοια με του μάρτυρα ένταση της ασθένειας.

Φωτογραφίες από τις επεμβάσεις του βακτηρίου στο θερμοκήπιο

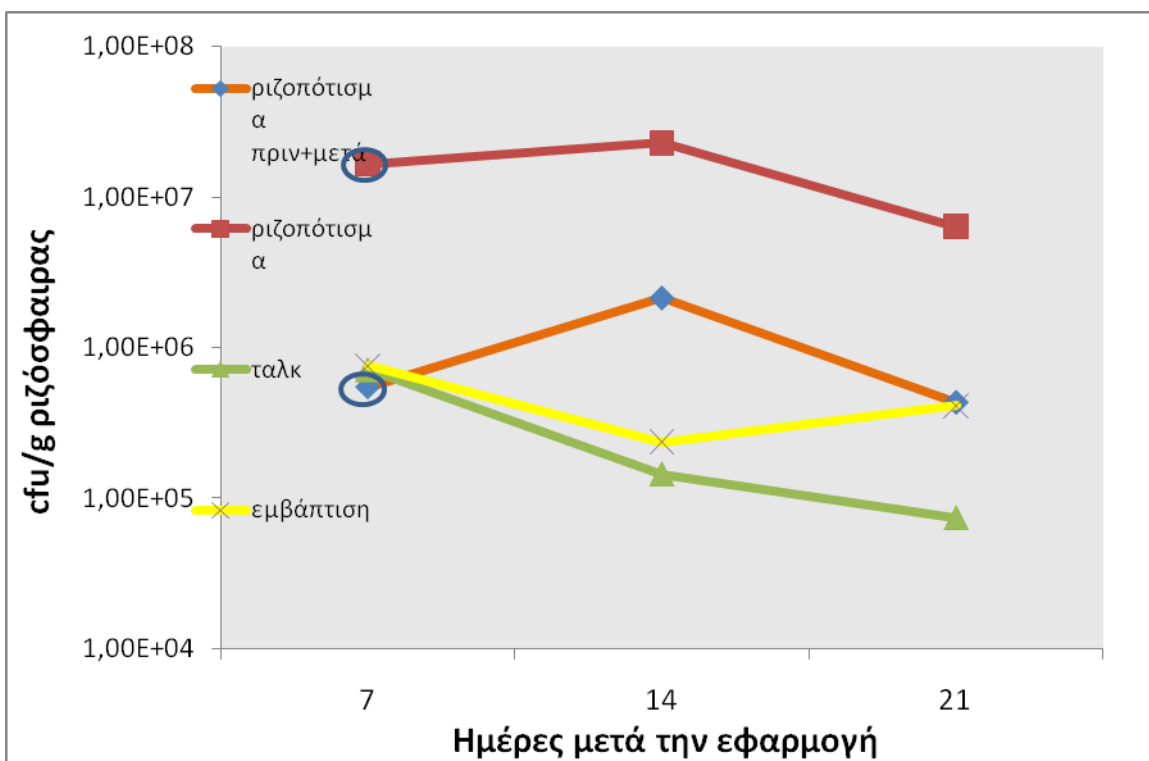


Εικ. 4,5: Από αριστερά→δεξιά οι επεμβάσεις: μάρτυρας, ταλκ, εμβάπτιση, ριζοπότισμα, ριζοπότισμα με επαναληπτική δόση. Είναι εμφανής η καλύτερη κατάσταση των φυτών, στα οποία έχει γίνει ριζοπότισμα, τόσο σε σχέση με τον μάρτυρα, όσο και με τις εφαρμογές του ταλκ και της εμβάπτισης.

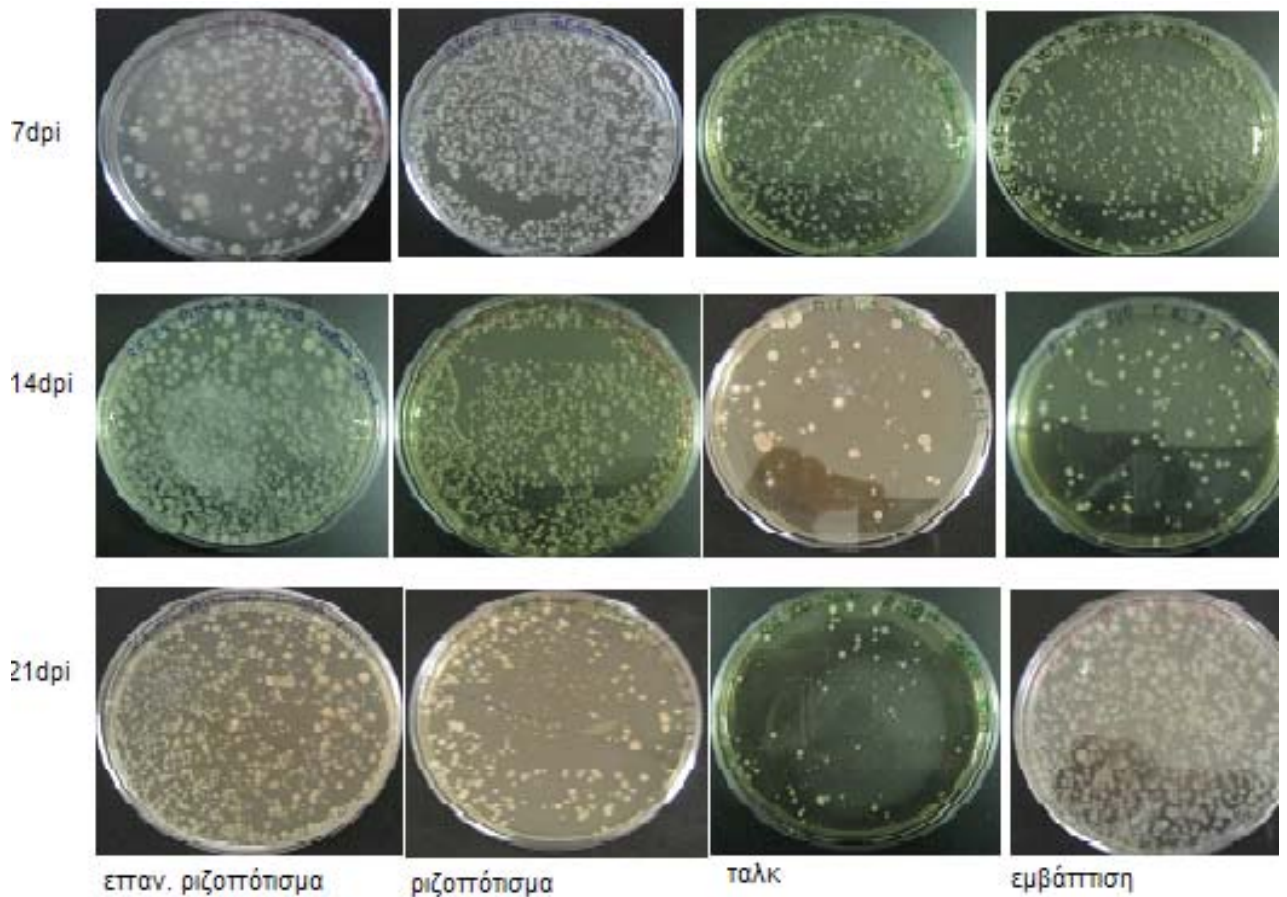
3.3 Πείραμα 3^ο: Μελέτη της πληθυσμιακής πυκνότητας στη ριζόσφαιρα του στελέχους K-165, όταν εφαρμόζεται με διαφορετικές μεθόδους

Το πείραμα αυτό σχεδιάστηκε με σκοπό να μελετηθεί η πυκνότητα του πληθυσμού του στελέχους K-165 στη ριζόσφαιρα των φυτών πεπονιού. Μας ενδιέφερε τόσο το ίδιο το μέγεθος του πληθυσμού, όσο και το αν και κατά πόσο αυτό διέφερε ανάμεσα στις επεμβάσεις. Οι μετρήσεις γινόντουσαν κάθε 7 μέρες ξεκινώντας από την πρώτη μέρα εφαρμογής του βακτηρίου, για κάθε επέμβαση. Αυτό σημαίνει πως το σημείο 7 δεν αντιπροσωπεύει ημερολογιακά την ίδια μέρα για κάθε επέμβαση, αφού και τα δύο ριζοποτίσματα έγιναν μια εβδομάδα νωρίτερα, ώστε να υπάρχει συσχέτιση με τα παραπάνω πειράματα.

Στο *Γράφημα 6* δίνεται η γραμμή της τάσης που ακολούθησε ο πληθυσμός του βιολογικού παράγοντα στη ρίζα για κάθε επέμβαση. Βλέπουμε ότι ο αρχικός πληθυσμός του βακτηρίου στην επέμβαση με το ριζοπότισμα είναι αρκετά υψηλότερος από των υπολοίπων, που κυμαίνονται στο ίδιο περίπου επίπεδο, όμως το βακτήριο στο μονό ριζοπότισμα εφαρμόστηκε σε διπλάσια ποσότητα από αυτή του επαναλαμβανόμενου ριζοποτίσματος. Πρέπει να τονιστεί πως στις 7dpi για τα ριζοποτίσματα είναι ο πληθυσμός του K-165, όταν γίνεται η μόλυνση με το παθογόνο, ενώ για την εμβάπτιση και το ταλκ είναι μια εβδομάδα μετά τη μόλυνση (γίνονται ταυτόχρονα.). Στο σημείο 21dpi για το επαναληπτικό ριζοπότισμα είναι η μέτρηση μία εβδομάδα μετά τη δεύτερη εφαρμογή. Είναι εμφανές ότι σε κανένα σημείο οι πληθυσμοί των υπολοίπων επεμβάσεων δεν έχουν μεγαλύτερη πυκνότητα πληθυσμού από αυτή του ενός ριζοποτίσματος. Το επαναλαμβανόμενο ριζοπότισμα, που είχε τα καλύτερα αποτελέσματα όσο αφορά την αντιμετώπιση της ασθένειας, έχει παρόμοια πυκνότητα πληθυσμού με το ταλκ και την εμβάπτιση.



Γράφημα 6: Παρουσίαση της γραμμής τάσης της πληθυσμιακής πυκνότητας του K-165 στη ριζόσφαιρα των φυτών, για κάθε διαφορετική εφαρμογή. Η επέμβαση με τη μεγαλύτερη πυκνότητα πληθυσμού είναι του ριζοποτίσματος, ενώ σε καμία εφαρμογή δεν υπάρχει σταθερή συμπεριφορά του βακτηρίου. Τη στιγμή της μόλυνσης μόνο τα δύο ριζοποτίσματα έχουν πληθυσμό του βακτηρίου, με το απλό ριζοπότισμα να έχει πολύ μεγαλύτερο του επαναλαμβανόμενου. Η πληθυσμιακή πυκνότητα των εφαρμογών επαναλαμβανόμενο ριζοπότισμα, ταλκ και εμβάπτιση είναι παρόμοια. Στις 21dpi για το επαναλαμβανόμενο ριζοπότισμα είναι η πρώτη μέτρηση μετά τη δεύτερη εφαρμογή του βακτηρίου.

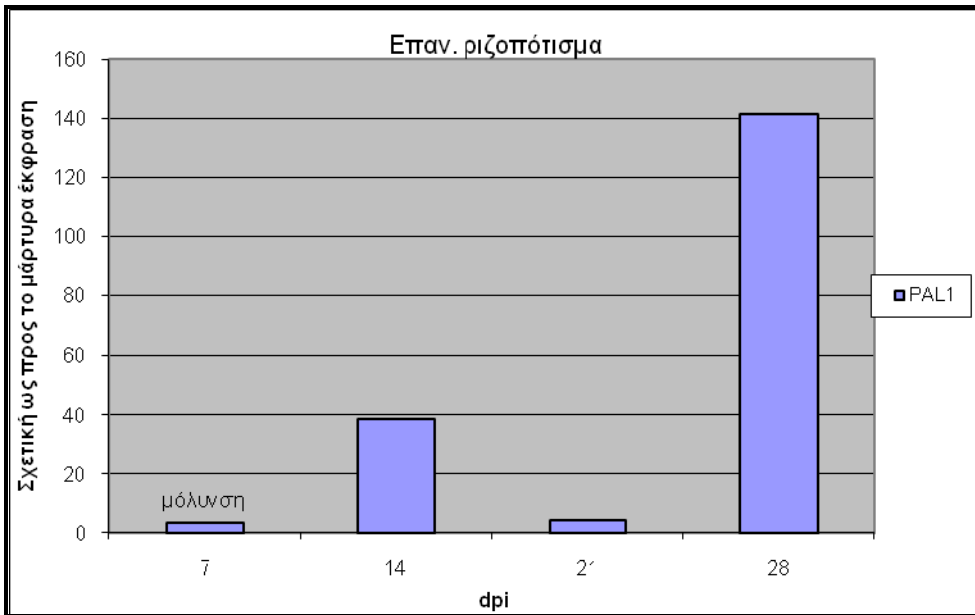


Εικ. 6: Οι αποικίες του βακτηρίου σε τριβλία με NAG, δύο μέρες μετά τη διασπορά 0,5ml αιωρήματος του βακτηρίου από τη ριζόσφαιρα φυτών πεπονιού συγκέντρωσης 10^{-3} και 10^{-4} (για το μονό ριζοπότισμα), για κάθε μια επέμβαση ανά 7 μέρες, οπότε και γίνονται οι μετρήσεις της πληθυσμιακής πυκνότητας του K-165, μέσω της διαδικασίας των αραιώσεων.. Παρατηρείται η μείωση των αποικιών του βακτηρίου στα τριβλία σε όλες τις επεμβάσεις στο χρόνο, με εξαίρεση την εμφάπτιση από 14 σε 21dpi και τα ριζοπότισματα από τις 7 στις 14dpi. Η μεγαλύτερη πυκνότητα παρατηρείται στο ριζοπότισμα στις 7dpi.

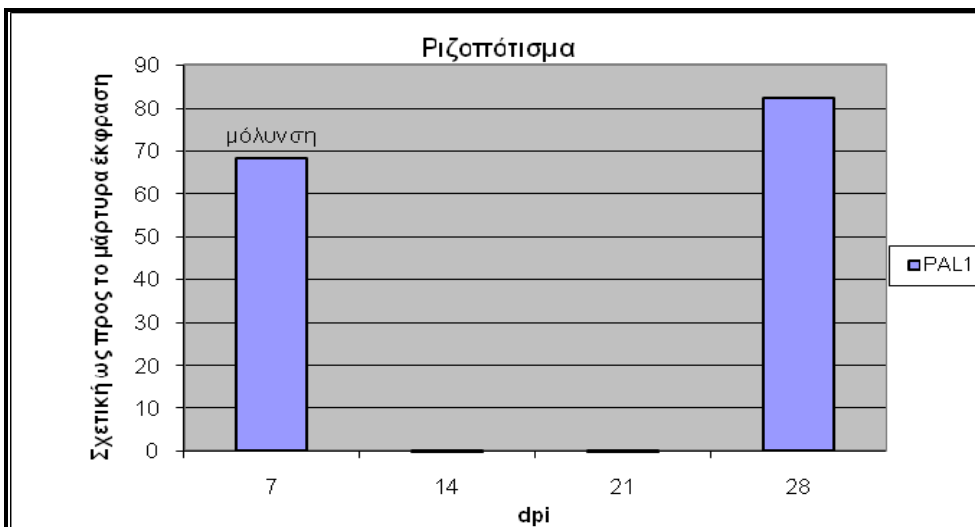
3.4. Πείραμα 4^ο: Αξιολόγηση της ικανότητας του στελέχους K-165 να επάγει διασυστηματική (ISR) ανοχή σε φυτά πεπονιας, μέσω διαφορετικών εφαρμογών

Σκοπός του πειράματος ήταν να δούμε αν υπάρχει πιθανότητα το στέλεχος K-165, δρώντας ως βιολογικός παράγοντας, να επάγει ανθεκτικότητα στα φυτά πεπονιας. Επίσης συνεχίσαμε να μελετάμε τις όποιες διαφορές μπορεί να έχουν οι εφαρμογές του βακτηρίου, με τους τέσσερις διαφορετικούς τρόπους που επιλέχθηκαν στα πειράματα 2 και 3. Τα δύο γονίδια που κοιτάξαμε αν και πόσο εκφράζονται είναι τα PAL1 και CHIT1. Τα φυτά και οι ημερομηνίες είναι ίδια με το πείραμα 3. Επίσης, μελετήθηκε και η έκφραση του γονιδίου LOX, από το οποίο δεν πήραμε έκφραση σε καμία επέμβαση.

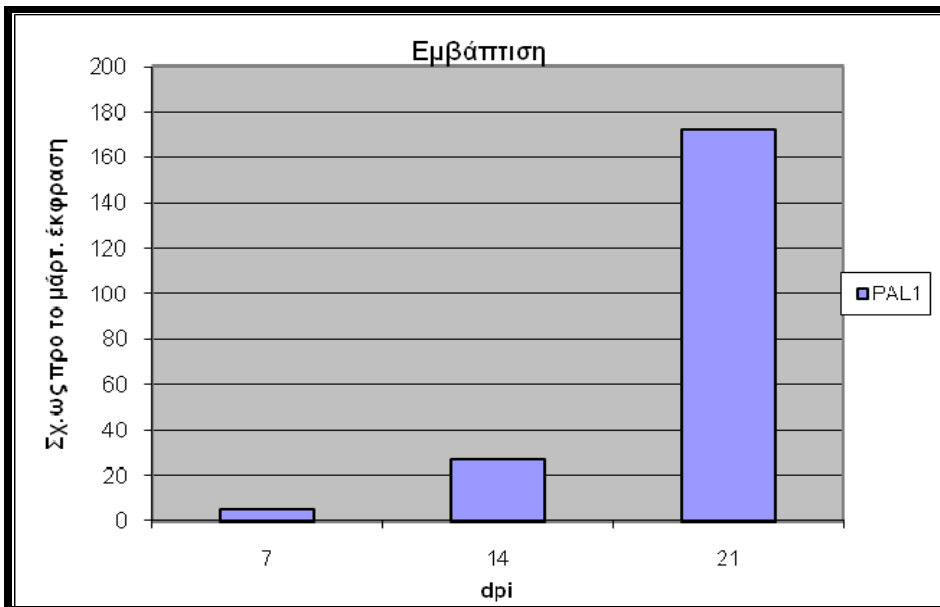
Από όλα τα γραφήματα γίνεται φανερό πως έχουμε έκφραση και των δύο γονιδίων από την εφαρμογή του βακτηρίου στα φυτά. Η έκφραση αυτή, όμως, αν και είναι συνεχής καθ' όλο το διάστημα των μετρήσεων παρουσιάζει πολύ μεγάλες αυξομειώσεις. Από τα *Γραφήματα 7,8,11 και 12* φαίνεται πως τη στιγμή της μόλυνσης υπάρχει μεγάλη διαφορά ως προς την έκφραση και των δύο γονιδίων. Η έκφραση και των δύο στο ριζοπότισμα με επαναληπτική δόση είναι πολύ χαμηλότερη από την αντίστοιχη του ριζοποτίσματος με μία μόνο εφαρμογή και αυξάνει μετά από μια εβδομάδα. Στο ριζοπότισμα, όμως, με δύο δόσεις η έκφραση του γονιδίου δεν μηδενίζεται ποτέ, ενώ σε αυτό με μία δόση έχουμε σχεδόν μηδενική έκφραση στο ενδιάμεσο διάστημα. Το ταλκ επάγει σημαντικά την έκφραση και των δύο γονιδίων, όπως φαίνεται στα *Γραφήματα 9 και 13*, αλλά αυτό συμβαίνει μια εβδομάδα μετά την μόλυνση με το παθογόνο και την επόμενη εβδομάδα πέφτει σε πολύ χαμηλά επίπεδα, για να ανέβει στο τέλος της μόλυνσης. Προβληματική εμφανίζεται η έκφραση και των δύο γονιδίων στην εφαρμογή με εμβάπτιση, όπου και στα δύο γονίδια παρατηρείται αυξημένη έκφραση 21 μέρες από την προσθήκη του K-165 (*Γραφήματα 10 και 14*). Η έκφραση του γονιδίου PAL1 είναι εξαιρετικά αυξημένη και για τις τέσσερις εφαρμογές στο τέλος της μόλυνσης. Με το γονίδιο της CHIT1 δεν συμβαίνει το ίδιο, αφού στην επέμβαση του ριζοποτίσματος πριν την μόλυνση, η έκφραση του γονιδίου είναι σε πολύ χαμηλά επίπεδα, ειδικά σε σχέση με την έκφραση του στην αρχή της μόλυνσης.



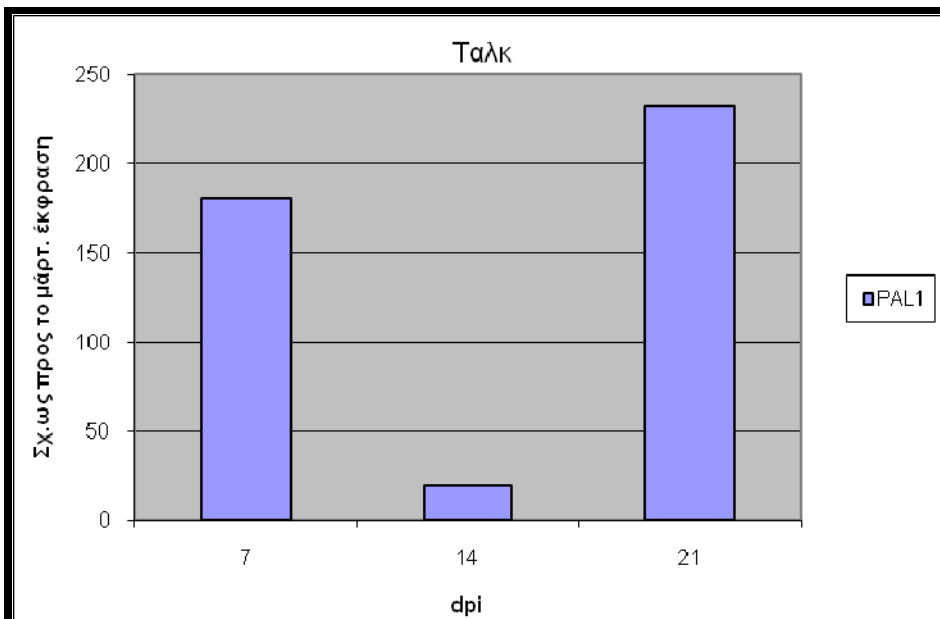
Γράφημα 7: Έκφραση του γονιδίου PAL στην επέμβαση του ριζοποτίσματος με επαναληπτική δόση. Για κάθε μέτρηση πάρθηκε δείγμα από τρία φυτά. Η έκφραση του γονιδίου είναι μικρή τη στιγμή της μόλυνσης, μια εβδομάδα μετά την εφαρμογή του βακτηρίου, και αυξάνεται μια εβδομάδα μετά τη μόλυνση και κατά πολύ στο τέλος της μόλυνσης ξανά.



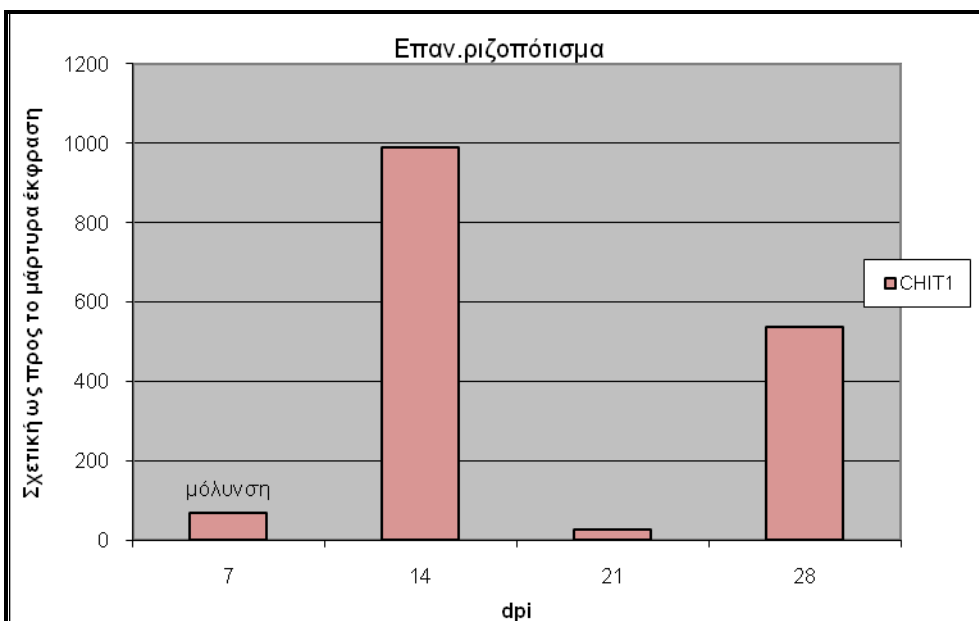
Γράφημα 8: Έκφραση του γονιδίου PAL στην επέμβαση του ριζοποτίσματος χωρίς επαναληπτική δόση. Η έκφραση του γονιδίου επάγεται ιδιαίτερα στη αρχή και το τέλος της μόλυνσης και σχεδόν μηδενίζεται στο ενδιάμεσο διάστημα.



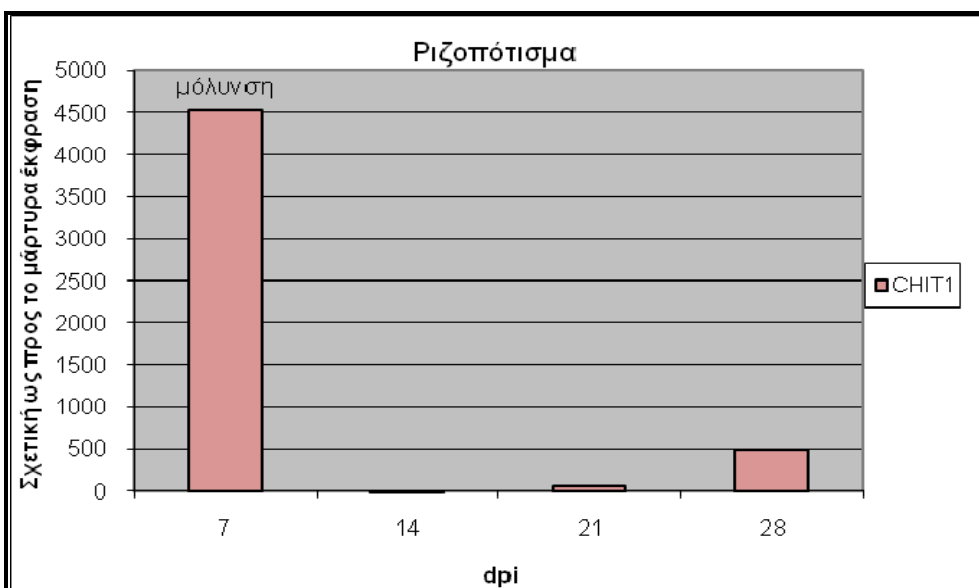
Γράφημα 9: Έκφραση του γονιδίου PAL στην εφαρμογή του βακτηρίου με εμβάπτιση. Παρατηρείται και εδώ έκφραση του γονιδίου, όμως είναι πολύ χαμηλή στην αρχή της μόλυνσης και αυξάνει ιδιαίτερα στο τέλος.



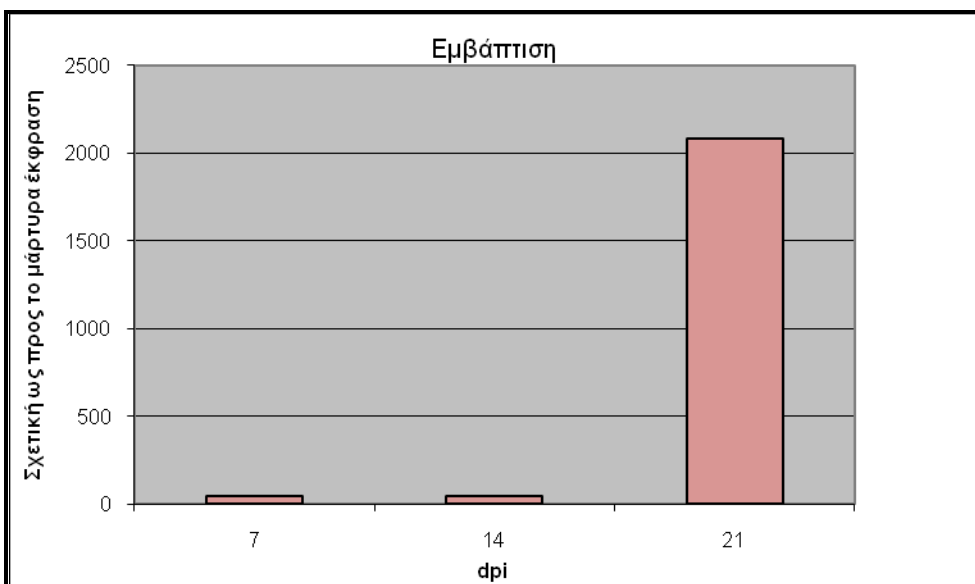
Γράφημα 10: Έκφραση του γονιδίου PAL στην εφαρμογή του βακτηρίου με τη μορφή ταλκ. Η έκφραση του γονιδίου είναι πολύ υψηλή στην αρχή και το τέλος της μόλυνσης, χωρίς να μηδενίζεται σε κάποιο σημείο.



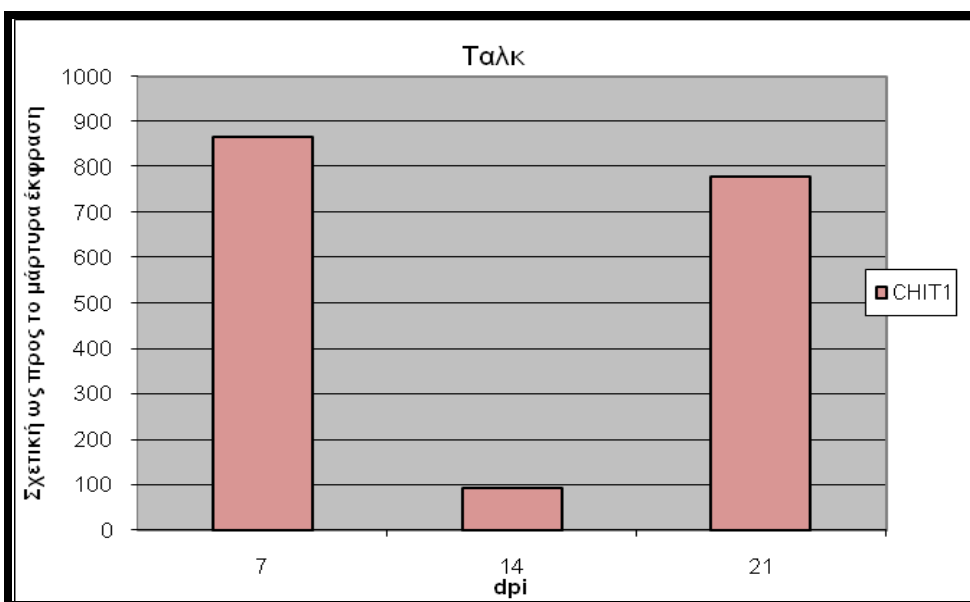
Γράφημα 11: Έκφραση του γονιδίου CHIT1 στην επέμβαση του ριζοποτίσματος με επαναληπτική δόση. Η έκφραση του γονιδίου είναι μικρή τη στιγμή της μόλυνσης, με την υψηλότερη τιμή της να παρουσιάζεται 14 ημέρες μετά την εφαρμογή του βακτηρίου. Η τιμή είναι υψηλή και στο τέλος της μόλυνσης.



Γράφημα 12: Έκφραση του γονιδίου CHIT1 στην επέμβαση του ριζοποτίσματος χωρίς επαναληπτική δόση. Η έκφραση του γονιδίου είναι υψηλή μόνο στην αρχή της εφαρμογής. Έπειτα μηδενίζεται και αυξάνει ελάχιστα στο τέλος.



Γράφημα 13: Έκφραση του γονιδίου CHIT1 στην εφαρμογή του βακτηρίου με εμβάπτιση. Έκφραση του γονιδίου έχουμε μόνο 21 μέρες μετά την εφαρμογή, αφού πρακτικά είναι ελάχιστη της προηγούμενες μέρες.



Γράφημα 14: Έκφραση του γονιδίου CHIT1 στην εφαρμογή του βακτηρίου με τη μορφή ταλκ. Η έκφραση του γονιδίου δεν μηδενίζεται σε κανένα σημείο και είναι υψηλή τόσο στην αρχή όσο και στο τέλος των μετρήσεων.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ- ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Οι μύκητες του γένους *Fusarium oxysporum* είναι εδαφογενή παθογόνα, που προκαλούν αδρομυκώσεις και έχουν παγκόσμια εξάπλωση. Κάθε χρόνο οι καταστροφές που προκαλούν στα καλλιεργούμενα φυτά είναι σημαντικές, από άποψης απωλειών παραγωγής και οικονομικών. Το είδος περιλαμβάνει περίπου 120 ειδικές μορφές και είναι ικανό να προσβάλλει τα περισσότερα από τα καλλιεργούμενα φυτά. Μέχρι πριν όχι πολύ καιρό η χημική απολύμανση, αν και όχι ιδιαίτερα αποτελεσματική, αποτελούσε την κύρια μέθοδο αντιμετώπισης τους. Όμως πλέον τα περισσότερα από τα χημικά απολυμαντικά έχουν καταργηθεί και η γενική απαίτηση είναι για μειωμένη χρήση χημικών στη γεωργία. Έτσι πέρα από τις καλλιεργητικές πρακτικές, που βοηθούν στη μείωση της ασθένειας, η έρευνα για την αντιμετώπιση τους έχει στραφεί στην εύρεση αποτελεσματικών μικροοργανισμών (μύκητες, βακτήρια κυρίως) στον ανταγωνισμό με τα παθογόνα αυτά. Συνεχώς εξετάζονται νέοι μικροοργανισμοί, με προοπτικές να αξιοποιηθούν ως βιολογικοί παράγοντες. Μελετώνται οι αλληλεπιδράσεις με το φυτό, με το παθογόνο και οι ικανότητες στο να προστατεύσουν το πρώτο και να ανταγωνιστούν επιτυχώς το δεύτερο.

Ο μύκητας *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* προκαλεί την αδροφουζαρίωση της πεπονιάς και είναι υπεύθυνος για μεγάλες απώλειες στις περιοχές που κυρίως καλλιεργείται (Katan, 1996). Ο μύκητας πέρα από την ικανότητα όλων των φουζαρίων να επιβιώνουν για μεγάλα χρονικά διαστήματα στο έδαφος, με τη μορφή γλαμυδοσπορίων, έχει την ικανότητα να αποικίζει αποτελεσματικά τις ρίζες φυτών μη ξενιστών (Gordon *et al.*, 1989), καθιστώντας πρακτικές, όπως η αμειψισπορά αναποτελεσματικές. Πολλοί βιολογικοί παράγοντες έχουν μελετηθεί, μόνοι τους, σε συνδυασμό με άλλους βιολογικούς παράγοντες ή καλλιεργητικές τεχνικές, και συνεχώς μελετούνται νέοι.

Η αντιμετώπιση των παθογόνων με άλλους μικροοργανισμούς έχει πλεονεκτήματα, μειονεκτήματα και συγκεκριμένες απαιτήσεις. Ένα από τα πιο κρίσιμα σημεία είναι ότι για να είναι αποτελεσματική οποιαδήποτε αλληλεπίδραση βιολογικού παράγοντα- παθογόνου, πρέπει ο βιολογικός παράγοντας να αποικίσει και να εγκατασταθεί επιτυχώς στη ριζόσφαιρα (Weller 1988; Raaijmakers *et al.* 1995). Από την άλλη ένα από τα πιο βασικά μειονεκτήματα της χρήσης μικροοργανισμών εναντίον παθογόνων είναι η έλλειψη συνέπειας ως προς την αποτελεσματικότητά τους. Αυτές οι δύο παράμετροι καθιστούν αναγκαίο, για να επωφεληθούμε τα μέγιστα από αυτό τον ανταγωνισμό, να γνωρίζουμε τη φύση των αλληλεπιδράσεων, τις καλύτερες για το βιολογικό παράγοντα συνθήκες, τον καλύτερο χρόνο και τρόπο για να εφαρμοστεί. Οι βιολογικοί παράγοντες είναι, όπως αναφέρθηκε ήδη, ζωντανοί οργανισμοί και

είναι λάθος το να απαιτείται από ζωντανούς οργανισμούς να είναι παντού, πάντα και κάτω από όποιες συνθήκες το ίδιο αποτελεσματικοί.

Τα παραπάνω στοιχεία είναι και αυτά ακριβώς που απασχόλησαν αυτή την μελέτη, όσο αφορά το βακτήριο *Paenibacillus alvei* και συγκεκριμένα το στελέχος K-165. Εξετάστηκε η αποτελεσματικότητα του εναντίον του μύκητα *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis*, η καλύτερη μέθοδος εφαρμογής στα φυτά πεπονιάς, αλλά και η χρονική στιγμή που πρέπει να γίνει αυτή η εφαρμογή, ώστε να επιτευχθεί η μέγιστη προστασία. Ακόμα μελετήθηκε η πυκνότητα του βακτηρίου στη ρίζα και κατά πόσο επηρεάζει την αλληλεπίδραση του με το παθογόνο. Τέλος ως προς τη φύση των αλληλεπιδράσεων διερευνήθηκε η ικανότητα του στελέχους να επάγει τους αμυντικούς μηχανισμούς του φυτού.

Οι δοκιμές παθογένειας μεταξύ του παθογόνου και του στελέχους έδειξαν ότι το βακτήριο μπορεί να είναι αποτελεσματικό εναντίον της αδροφουζαρίωσης της πεπονιάς. Το στελέχος έχει ήδη αποδειχθεί αποτελεσματικό ενάντια στην βερτισιλλίωση της μελιτζάνας και της πατάτας (Tjamos, 2004;2005). Σε μολύνσεις που έγιναν με γλαμυδοσπόρια του μύκητα και ριζοπότισμα του βακτηρίου σε φυτά πεπονιού, όταν εκφράζονταν η ένταση της ασθένειας, με βάση το ποσοστό ασθενών φύλλων τα αποτελέσματα έδειχναν μείωση των συμπτωμάτων, αλλά όχι στατιστικά σημαντική, όμως όταν εκφράζονταν η συχνότητα εμφάνισης της ασθένειας η μείωση ήταν αρκετά πιο σημαντική. Τα φυτά που το βακτήριο είχε αποτύχει να προστατεύσει έδειχναν πιο έντονα συμπτώματα από του μάρτυρα. Υπάρχει η άποψη ότι η άμυνα των φυτών ειδικά αν πρόκειται για επαγωγή αμυντικών μηχανισμών ‘κοστίζει’ στα φυτά, σε θρεπτικά συστατικά, στην ανάπτυξη και γενικά δείχνουν μειωμένη υγεία (ανασκόπηση Heil & Baldwin, 2002).

Σημασία στην αποτελεσματικότητα ενός βιολογικού παράγοντα έχουν ο τρόπος με τον οποίο θα εισαχθεί στη ριζόσφαιρα των φυτών και ο χρόνος σε σχέση με το παθογόνο. Σε αυτή την κατεύθυνση εξετάστηκαν τέσσερις διαφορετικές μέθοδοι εφαρμογής του K-165 στα φυτά πεπονιού, που διέφεραν και χρονικά ως προς τη μόλυνση με το παθογόνο. Από τα πειράματα που έγιναν προέκυψε σαφής ανωτερότητα του ριζοποτίσματος μια εβδομάδα πριν τη μόλυνση με το φουζάριο και επανάληψη του μια εβδομάδα μετά. Η εφαρμογή της εμβάπτισης αύξησε σημαντικά το ποσό της ασθένειας, όπως φάνηκε από τη σχετική AUDPC, ενώ η εφαρμογή με τη μορφή ταλκ ήταν στα ίδια επίπεδα με το μάρτυρα. Το κοινό και των δύο επεμβάσεων είναι ότι γίνονται ταυτόχρονα με τη μόλυνση, κατά τη μεταφύτευση, σε ένα ριζικό σύστημα που σίγουρα έχει τραυματιστεί. Ο συνδυασμός πηγών και όχι καλής εγκατάστασης του βιολογικού παράγοντα πριν το παθογόνο, ίσως ευθύνεται για την αποτυχία αυτών των δύο επεμβάσεων.

Διαφορά παρατηρήθηκε, όμως, και ανάμεσα στο ριζοπότισμα σε δύο και σε μία δόση. Το ριζοπότισμα σε μια δόση δε διέφερε σημαντικά από τον μάρτυρα, στη σοβαρότητα και το ποσό της αθένειας, σε αντίθεση με το ριζοπότισμα σε δύο δόσεις, που είχε στατιστικά σημαντική διαφορά από το μάρτυρα. Για πολλούς βιολογικούς παράγοντες έχει αναφερθεί ότι η επανάληψη των επεμβάσεων είναι πιο αποτελεσματική από την εφαρμογή μόνο μία φορά (Lo et al., 1997; Ng et al., 1997; De Cal & Melgarejo, 2001). Επειδή το βακτήριο παράγει αντιβίωση είναι πιθανό η δεύτερη δόση να καθιστά το βακτήριο ικανό να δράσει σε μεγαλύτερο βάθος χρόνου εναντίον των γλαυδοσποριών του φυτού, που δεν βλάστησαν αμέσως, αφού οι δευτερογενείς μεταβολίτες δεν έχουν μεγάλη κινητικότητα και διάρκεια ζωής στο έδαφος.

Όταν μετρήθηκε η πληθυσμιακή πυκνότητα του στελέχους τη ριζόσφαιρα η μόνη επέμβαση με αυξημένη πληθυσμιακή πυκνότητα ήταν το ριζοπότισμα με μια δόση. Των υπολοίπων τριών επεμβάσεων η πυκνότητα ήταν περίπου ίδια και δεν έπεσε κάτω από τις 10^5 αποικίες βακτηρίου/g ριζόσφαιρας. Φαίνεται λοιπόν πως η πληθυσμιακή πυκνότητα δεν επηρεάζεται από την επέμβαση, αφού πέρα από το ριζοπότισμα με μια δόση, που είχε έτσι κι αλλιώς υψηλότερο πληθυσμό κατά την εφαρμογή, η πορεία αυτού του πληθυσμού είναι παρόμοια στη ριζόσφαιρα. Από το γεγονός επίσης ότι η καλύτερη επέμβαση ήταν το ριζοπότισμα σε δύο δόσεις ο πληθυσμός δεν φαίνεται να παίζει ρόλο στην αποτελεσματικότητα του K-165, εναντίον της αδροφουζαρίωσης της πεπονιάς.

Τέλος, όσο αφορά τη φύση των αλληλεπιδράσεων του K-165 με το φυτό και τον τρόπο, που προστατεύει το φυτό εξετάστηκε η περίπτωση της επαγωγής διασυστηματικής αντοχής στα φυτά πεπονιού, ως ριζοβακτήριο που επάγει την ανάπτυξη των φυτών. Το στέλεχος έχει βρεθεί να επάγει αντοχή σε φυτά *Arabidopsis thaliana* (Tjamos, 2005), όμως η μορφή αυτή της αλληλεπίδρασης έχει μεγάλη εξειδίκευση μεταξύ φυτού-βακτηρίου. Εξετάστηκε η έκφραση δύο γονιδίων που είναι σημαντικά στην άμυνα των φυτών, τα PAL1 και CHIT1 (Hammond-Kosack & Jones 1996). Βρέθηκε ότι έχουμε έκφραση αυτών των γονιδίων από την επαγωγή του βακτηρίου και με τις τέσσερις επεμβάσεις. Αν προσπαθήσουμε να συσχετίσουμε την αποτελεσματικότητα των επεμβάσεων με την έκφραση των γονιδίων καταλήγουμε πάλι στο συμπέρασμα πως το βακτήριο πρέπει να εισαχθεί πριν το παθογόνο στη ριζόσφαιρα. Η επαγωγή των αμυντικών μηχανισμών από τα ριζοβακτήρια έχει βρεθεί ότι δεν είναι άμεση, αλλά υπάρχει ένα διάστημα μέχρι την έκφραση των γονιδίων (Heil, 2002). Συγκεκριμένα με την εμβάπτιση η έκφραση των γονιδίων είναι αυξημένη στις 21 μέρες μετά την εφαρμογή. Επίσης, κάτι άλλο που παρατηρείται είναι ότι στο ριζοπότισμα με δύο δόσεις η έκφραση του γονιδίου PAL είναι συνεχής, έστω και σε μικρές ποσότητες, ενώ του ριζοποτίσματος με μια δόση, ενδιάμεσα

μηδενίζεται. Η συνεχής έκφραση του PAL γονιδίου έχει συσχετιστεί με την ανθεκτικότητα των φυτών σε παθογόνα (Maher *et al.*, 1994; Cui *et al.*, 1996). Τέλος ο συνδυασμός έκφρασης των γονιδίων PAL και CHIT1, με την απουσία έκφρασης του γονιδίου LOX, πιθανολογεί ότι η επαγωγή ανθεκτικότητας σε φυτά πεπονιού από το K-165 εξαρτάται από τη συγκέντρωση του σαλικυλικού οξέος. Το ίδιο έχει αναφερθεί για το βακτήριο στην αδρομύκωση της *Arabidopsis thaliana* από το *Verticillium dahliae* (Tjamos *et al.*, 2005).

Τα συμπεράσματα που εξάχθηκαν από αυτή την έρευνα και αφορούν την αποτελεσματικότητα του στελέχους K-165 στην αντιμετώπιση της αδροφυζαρίωσης της πεπονιάς, μιας δύσκολης και καταστροφικής ασθένειας, είναι κατ' αρχήν ότι το στέλεχος φαίνεται να είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικό, κάτω από προϋποθέσεις. Όταν εφαρμόστηκε στα φυτά με τη μορφή ριζοποτίσματος πριν και μετά τη μόλυνση επετεύχθη πολύ μεγάλη προστασία των φυτών, τα οποία δεν έδειξαν απλά λιγότερα συμπτώματα, αλλά δεν προσβλήθηκαν καθόλου από το παθογόνο. Σημασία για το βακτήριο φαίνεται να έχει ο χρόνος στον οποίο εφαρμόζεται και όχι η πυκνότητα του πληθυσμού, που εφαρμόζεται. Το βακτήριο απαιτείται να προυπαρχει του παθογόνου στη ριζόσφαιρα. Όλα τα παραπάνω στοιχεία υποδεικνύουν ότι πρόκειται για ένα καλό βιολογικό παράγοντα, όταν εφαρμόζεται με συγκεκριμένο τρόπο, σε εργαστηριακές συνθήκες. Κανένας βιολογικός παράγοντας, όμως, δεν μπορεί να θεωρηθεί αυτομάτως ότι θα εμφανίσει την ίδια συμπεριφορά σε ένα τόσο ανταγωνιστικό περιβάλλον, όπως ο αγρός.

Σε σχέση με την επαγωγή της ανθεκτικότητας στα φυτά η έκφραση των γονιδίων PAL και CHIT σίγουρα υποδεικνύει ότι πρέπει να υπάρχει κάποια ευαισθητοποίηση. Η ISR, όμως, είναι ένα πολύ σύνθετο φαινόμενο, όσο αφορά το σήμα ενεργοποίησης της, τα γονίδια που επάγονται και τις συνθήκες κάτω από τις οποίες διεγείρεται. Το πείραμα αυτό αφορούσε τρία μόνο γονίδια και δεν είχε την έκταση που απαιτείται για να πούμε με σιγουριά ότι έχουμε ISR.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Adams PB and Fravel DR** (1993). Dynamics of *Sporidesmium*, a naturally occurring fungal mycoparasite. In: Lumsden RD and Vaughn JL (eds.) *Pest Management: Biologically based Technologies* (pp. 189–195). American Chemical Society, Washington, DC.
- Adesina MF, Lembke A, Costa R, Speksnijder A, Smalla K**, (2007) Screening of bacterial isolates from various European soils for in vitro antagonistic activity towards *Rhizoctonia solani* and *Fusarium oxysporum*: sitedependent composition and diversity revealed. *Soil Biol Biochem* 39:2818–2828
- Agrios GN** (2005) *Plant pathology*, 5th edn. Elsevier, New York
- Agrios, G.N.**, (1997). *Plant Pathology*, Fourth ed. Academic Press, San Diego.
- Alabouvette C, Olivain C, Steinberg C** (2006) Biological control of plant diseases: the European situation. *Eur J Plant Pathol* 114:329–341
- Arnault I, Mondy N, Diwo S, Auger J** (2004). Soil behaviour of sulfur natural fumigants used as methyl bromide substitutes. *Int J Environ Anal Chem* 84:75–82
- Assigbetse KB, Fernandez D, Dubois MP, Geiger JP**, (1994). Differentiation of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* races on cotton by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. *Phytopathology* **84**: 622–626.
- Bailey KL, Lazarovits G** (2003). Suppressing soil-borne diseases with residue management and organic amendments. *Soil Tillage Res* 72:169–180
- Baker KF and Snyder WC** (1965). *Ecology of Soil-borne Plant Pathogens, Prelude to Biological Control*, University of California Press, Berkeley, Los Angeles, 571.
- Bakker PAHM, Van Peer R and Schippers B** (1991). Suppression of soil-borne plant pathogens by fluorescent pseudomonads: mechanisms and prospects. In: *Beemster ABR*,
- Bakker, P. A. H. M., Ran, L. X., Pieterse, C. M. J., & Van Loon, L. C.** (2003). Understanding the involvement of rhizobacteria-mediated induction of systemic resistance in biocontrol of plant diseases. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 25, 5–9.
- Barbieri, P., & Galli, E.** (1993). Effect on wheat root development of inoculation with an *Azospirillum brasilense* mutant with altered indole-3-acetic acid production. *Research in Microbiology*, 144, 69–75.
- Beckman CH**, (1987). *The Nature of Wilt Diseases of Plants*. The American Phytopathological Society, St. Paul, MN, U.S.A.
- Biles CL and Martyn RD** (1989). Local and systemic resistance induced in watermelons by formae speciales of *Fusarium oxysporum*. *Phytopathology* 79: 856–860.
- Bishop CD, Cooper RM**, (1983). An ultrastructural study of root invasion in three vascular wilt diseases. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **22**, 15–27.
- Bishop CD, Cooper RM**, (1983). An ultrastructural study of vascular colonization in three vascular wilt diseases I. Colonization of susceptible cultivars. *Physiol. Plant Pathol.* **23**, 323–343.

- Blok WJ, Lamers JG, Termorhuizen AJ and Bollen AJ** (2000). Control of soilborne plant pathogens by incorporating fresh organic amendments followed by tarping. *Phytopathology* 30: 253–259.
- Bollen GJ** (1985). Lethal temperatures of soil fungi. In: Parker CA, Rovira AD, Moore KJ and Wong PTW (eds.) *Ecology and Management of Soilborne Plant Pathogens* (pp. 191–193) Elsevier Applied Science Publishers, Barking, UK.
- Bollen GJ** (1985). The fate of plant pathogens during composting of crop residues. In: Gasser JKR (ed.) *Composting of Agricultural and Other Wastes* (pp. 282–290) Elsevier Applied Science Publishers, Barking, UK.
- Booth C**, (1971). *The genus Fusarium*. Kew, UK: Commonwealth. Mycological Institute.
- Bouhot D** (1997). A two-level bioassay for the study of soil sickness. Its application to the study of celeriac root necrosis. *Annales de Phytopathologie* 11: 95–109.
- Bouhot, D**, (1981). Some aspects of the pathogenic potential in formae specialis and races of *Fusarium oxysporum* on Cucurbitaceae. *Fusarium: Diseases, Biology and Taxonomy*. P.E. Nelson, T.A. Toussoun and R.J. Cook, eds. Pennsylvania State University Press: 318-326.
- Cartieaux, F., Thibaud, M. C., Zimmerli, L., Lessard, P., Sarrobert, C., David, P., Gerbaud, A., Robaglia, C., Somerville, S., & Nussaume, L.** (2003). Transcriptome analysis of Arabidopsis colonized by a plant-growth promoting rhizobacterium reveals a general effect on disease resistance.
- Chen, C., Belanger, R.R., Benhamou, N., Paulitz, T.C.**, (1999). Role of salicylic acid in systemic resistance induced by *Pseudomonas* spp. against *Pythium aphanidermatum* in cucumber roots. *Eur. J. Plant Pathol.* 105, 477–486.
- Chet I and Baker R** (1981). Isolation and biocontrol potential of *Trichoderma harzianum* from soil naturally suppressive to *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology* 71: 286–290.
- Cook R and Baker KF** (1983). *The Nature and Practice of Biological Control of Plant Pathogens*, American Phytopathological Society, St Paul, Minnesota, 539.
- Cotxarrera L, Trillas-Gay MI, Steinberg C and Alabouvette C** (2002). Use of sewage sludge compost and *Trichoderma asperellum* isolates to suppress *Fusarium* wilt of tomato. *Soil Biology and Biochemistry* 34: 467–476.
- Coventry E, Fayolle L, Aime' S, Alabouvette C, Noble R and Whipps J** (2004). Eradication of plant pathogens and pests from composting wastes and their use in disease suppression. *IOBC/wprs Bulletin* 27: 265–270.
- De Cal A., Szejnberg A., P. Sabuquillo, Melgarejo P.**, (2009). Management *Fusarium* wilt on melon and watermelon by *Penicillium oxalicum*. *Biological Control* 51: 480–486
- De Cal, A., Melgarejo, P.**, (2001). Repeated applications of *Penicillium oxalicum* prolongs biocontrol of *Fusarium* wilt of tomato plants. *European Journal of Plant Pathology* 107, 805–811.
- De Meyer G, Audenaert K, Höfte M** (1999). *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2-induced systemic resistance in tobacco depends on in planta salicylic acid accumulation but is not associated with PR1a expression. *Eur J Plant Pathol* 105:513–517

Dellaporta SL, Wood J, Hicks JB, (1983). A plant DNA minipreparation, version 2. *Plant Molecular Biology Reporter* 1, 19-21.

DeVay JE, (1989). Selection, characterization, pathogenicity and virulence of pectinase –deficient mutants of *Verticillium albo-atrum* In, *Tjamos E.C., and Beckman C.H. Eds., Vascular wilt diseases of plants. Springer-Verlag, Berlin, p197 – 217*

Di Pietro A, Garcia-Maceira FI, Huertas-Gonzalez MD, Ruiz-Roldan MC, Caracuel Z, Barbieri AS, Roncero MIG, (1998). Endopolygalacturonase PG1 in different formae speciales of *Fusarium oxysporum*. *Applied and Environmental Microbiology* 64:1967–71.

Di Pietro A, Garcia-Maceira FI, Meglecz E, Roncero MIG, (2001). A MAP kinase of the vascular wilt fungus *Fusarium oxysporum* is essential for root penetration and pathogenesis. *Molecular Microbiology* 39:1140–52.

Di Pietro A, Huertas-Gonzalez MD, Gutierrez-Corona JF, Martinez- Cadena G, Meglecz E, Roncero MIG, (2001). Molecular characterization of a subtilase from the vascular wilt fungus *Fusarium oxysporum*. *Molecular Plant–Microbe Interactions* 14:653–62.

Di Pietro A, Roncero MIG, (1996). Endopolygalacturonase from *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*: purification, characterization, and production during infection of tomato plants. *Phytopathology* 86:1324–30.

Di Pietro A, Roncero MIG, (1998). Cloning, expression, and role in pathogenicity of *pg1* encoding the major extracellular endopolygalacturonase of the vascular wilt pathogen *Fusarium oxysporum*.

Diallinas, G., and Kanellis, A. K. (1994). A phenylalanine ammonia-lyase gene from melon fruit: cDNA cloning, sequence and expression in response to development and wounding. *Plant Mol. Biol.* 26:473-479.

Djonović S, Pozo MJ, Kenerley CM (2006). *Tvbgn3* a b-16- glucanase from the biocontrol fungus *Trichoderma virens* is involved in mycoparasitism and control of *Pythium ultimum*. *Appl Environ Microbiol* 72:7661–7670

Dobbelaere, S., Vanderleyden, J., & Okon, Y. (2003). Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 22, 107–149.

Dulout A, Lucas P, Sarniguet A, Dore T (1997). Effects of wheat volunteers and blackgrass in set-aside following a winter wheat crop on soil infectivity and soil conduciveness to take-all. *Plant Soil* 197:149–155

Erhart E, Burian K, Hartl W, Stich K (1999). Suppression of *Pythium ultimum* by biowaste composts in relation to compost microbial biomass activity and content of phenolic compounds. *J Phytopathol* 147:299–305

Fokkema NJ (1996). Biological control on aerial plant surfaces. Food and Fertilizer Technology Center for the ASPAC Region Book Series 42: 41–48.

Frankenberger, W. T., & Arshad, M. (1995). *Phytohormones in soils—microbial production and function.* New York: Marcel Dekker.

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

- Fuchs J-G, Moëgne-Loccoz Y, Défago G** (1997). Nonpathogenic *Fusarium oxysporum* strain Fo47 induces resistance to *Fusarium* wilt in tomato. *Plant Dis* 81:492–496
- Gallo L, Siverio F, Rodriguez-Perez AM** (2007). Thermal sensitivity of *Phytophthora cinnamomi* and long-term effectiveness of soil solarisation to control avocado root rot. *Ann Appl Biol* 150:65–73
- Garrett SD**, (1970). *Pathogenic root-infection fungi*. London, UK: Cambridge University Press.
- Glick, B. R.** (2005). Modulation of plant ethylene levels by the bacterial enzyme ACC deaminase. *FEMS Microbiology Letters*, 251, 1–7.
- Gomez-Gomez E, Isabel M, Roncero G, Di Pietro A, Hera C**, (2001). Molecular characterization of a novel endo-beta-1,4-xylanase gene from the vascular wilt fungus *Fusarium oxysporum*. *Current Genetics* 40:268–75.
- Gomez-Gomez E, Ruiz-Roldan MC, Roncero MIG, Di Pietro A, Hera C**, (2002). Role in pathogenesis of two endo-beta-1,4-xylanase genes from the vascular wilt fungus *Fusarium oxysporum*. *Fungal Genetics and Biology* 35:213–22.
- Gómez-Gómez, L. & Boller**, (2000). T. FLS2: an LRR receptor like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in *Arabidopsis*. *Mol. Cell* 5, 1003–1011.
- Gordon TR, Martyn RD**, (1997). The evolutionary biology of *Fusarium oxysporum*. *Annual Review of Phytopathology* 35:111–28.
- Gordon, T. R., Okamoto, D., and Jacobson, D. J.** (1989). Colonization of muskmelon and nonsusceptible crops by *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* and other species of *Fusarium*. *Phytopathology* 79:4095-1100.
- Guillemaut C** (2003). Identification et étude de l'écologie de *Rhizoctonia solani*, responsable de la maladie de pourriture brune de la betterave sucrière. PhD Thesis Université Claude Bernard Lyon. 90 p.
- Hammond-Kosack, K. E., & Jones, J. D. G.** (1996). Resistance gene-dependent plant defense responses. *The Plant Cell*, 8, 1773–1791.
- Harman GE, Howell CR, Viterbo A, Chet I and Lorito M** (2004). *Trichoderma* species – opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews Microbiology* 2: 43–56.
- Harman GE, Petzoldt R, Comis A, Chen J** (2004). Interactions between *Trichoderma harzianum* strain T22 and maize inbred line Mo17 and effects of these interactions on diseases caused by *Pythium ultimum* and *Colletotrichum graminicola*. *Phytopathol* 94:147–153
- Harman, G. E., Howell, C. R., Viterbo, A., Chet, I., and Lorito, M.,** (2004). *Trichoderma* species— Opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Rev.* 44:43-56.
- Hause, B., & Fester, T.** (2005). Molecular and cell biology of arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Planta*, 221, 184–196.
- Hoitink HAJ** (1980). Composted bark, a lightweight growth medium with fungicidal properties. *Plant Disease* 66: 142–147.
- Hoitink HAJ and Boehm MJ** (1999). Biocontrol within the context of soil microbial communities: a substrate-dependent phenomenon. *Annual Review of Phytopathology* 37: 427–446.

Jacobson D.J., and Gordon T.R., (1988). Vegetative compatibility and self-incompatibility within *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*. *Phytopathology* 78: 668-672.

Jones EE, Mead A and Whipps JM (2004). Effect of inoculums type and timing of application of *Coniothyrium minitans* on *Sclerotinia sclerotiorum*: control of sclerotinia disease in glasshouse lettuce. *Plant Pathology* 53: 611–620.

Jones JDG, Dangl JL, (2006). The plant immune system. *Nature* **444**, 323-329.

Katan J (1996). Soil solarization: integrated control aspects. In: Hal R (ed) Principles and practice of managing soilborne plant pathogens. APS, St Paul, MN, pp 250–278

Keel C, Schnider U, Maurhofer M, Voisard C, Laville J, Burger U, Wirthner P, Haas D, Défago G (1992). Suppression of root diseases by *Pseudomonas fluorescens* CHA0: importance of the bacterial secondary metabolite 2,4-diacetylphloroglucinol. *Mol Plant–Microb Interact* 5:4–13

Kirkegaard JA, SarwarMand Matthiessen JN (1998). Assessing the biofumigation potential of crucifers. *Acta Horticulturae* 459: 105–111.

Kistler HC, (1997). Genetic diversity in the plant-pathogenic fungus *Fusarium oxysporum*. *Phytopathology* 87:474–9

Kistler HC, Alabouvette C, Baayen RP, Bentley S, Brayford D, Coddington A, Correll J, Daboussi M-J, Elias K, Fernandez D, Gordon TR, Katan T, Kim HG, Leslie JF, Martyn RD, Migheli Q, Moore NY, O'Donnell K, Ploetz RC, Rutherford MA, Summerell B, Waalwijk C, Woo S, (1998). Systematic numbering of vegetative compatibility groups in the plant pathogenic fungus *Fusarium oxysporum*. *Phytopathology* **88**: 30–32.

Kistler HC, Benny U., (1988). Genetic transformation of the fungal plant wilt pathogen *Fusarium oxysporum*. *Current Genetics* 13:145–9.

Kloepper JW, Tuzun S, Liu L and Wei G (1993). Plant growthpromoting rhizobacteria as inducers of systemic disease resistance. In: Lumsden RD and Vaugh JL (eds.) Pest Management: Biologically based technologies (pp. 156–165) American chemical Society, Washington, USA.

Kloepper, J. W., Ryu, C.-M., & Zhang, S. A. (2004). Induced systemic resistance and promotion of growth by *Bacillus* spp. *Phytopathology*, 94, 1259–1266.

Kroon BA, Scheffer RJ and Elgersma DM (1992). Induced resistance in tomato plants against fusarium wilt involved by *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi*. *Netherlands Journal of Plant Pathology* 97: 401–408.

Kuc J (1987). Plant immunization and its applicability for disease control. In: Chet I (ed.) Innovative Approaches to Plant Disease Control (pp. 255–274) John Wiley and Sons, New York.

Lairini K, Perez-Espinosa A, Ruiz-Rubio M, (1997). Tomatinase induction in formae speciales of *Fusarium oxysporum* non-pathogenic of tomato plants. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 50:37–52.

Lairini K, Ruiz-Rubio M, (1998). Detoxification of alpha-tomatine by *Fusarium solani*. *Mycological Research* 102:1375–80.

Lamers J, Wanten P, Blok W (2004). Biological soil disinfestation: a safe and effective approach for controlling soilborne pests and diseases. *Agroindustria* 3:289–291

Larkin RP and Fravel DR (1999). Mechanisms of action and dose-response relationships governing biological control of Fusarium wilt of tomato by nonpathogenic Fusarium spp. *Phytopathology* 89: 1152–1161.

Lawrence L and Matthiessen J (2004). Biofumigation-using Brassica rotations to manage soil-borne pests and diseases. *Outlooks on Pest Management* 15: 42–43.

Lemanceau P and Alabouvette C (1991). Biological control of Fusarium diseases by fluorescent *Pseudomonas* and nonpathogenic Fusarium. *Crop Protection* 10: 279–286.

Lemanceau P and Alabouvette C (1993). Suppression of Fusarium-wilts by fluorescent pseudomonads: mechanisms and applications. *Biocontrol Science and Technology* 3: 219–234.

Lo, C.T., Nelson, E.B., Harman, G.E., (1997). Improved biocontrol efficacy of *Trichoderma harzianum* 1295-22 for foliar phases of turf diseases by use of spray applications. *Plant Disease* 81, 1132–1138.

Lockwood JL (1977) Fungistasis in soils. *Biological Review* 52: 1–43.

Loper JE and Henkels MD (1997). Availability of iron to *Pseudomonas fluorescens* in rhizosphere and bulk soil evaluated with an ice nucleation reporter gene. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 99–105.

Loper JE and Lindow SE (1993). Roles of competition and antibiosis in suppression of plant diseases by bacterial biological control agents. In: Lumsden D and Vaughn JL (eds.) *Pest Management: Biologically Based Technologies* (pp. 144–155) American Chemical Society, Washington DC. 340

Lopez-Escudero FJ and Blanco-Lopez MA (2001). Effect of a single or double soil solarization to control *Verticillium* wilt in established olive orchards in Spain. *Plant Disease* 85: 489–496.

Lumsden RD, Lewis J.A. and Millner PD (1983). Effect of composted sewage sludge on several soilborne pathogens and diseases. *Phytopathology* 73: 1543–1548.

Mandeel Q and Baker R (1991). Mechanisms involved in biological control of Fusarium wilt of cucumber with strains of nonpathogenic *Fusarium oxysporum*. *Phytopathology* 81: 462–469.

Martinez, C., Blanc, F., Le Claire, E., Besnard, O., Nicole, M., and Baccou, J. C., (2001). Salicylic acid and ethylene pathways are differentially activated in melon cotyledons by active or heat-denatured cellulase from *Trichoderma longibrachiatum*. *Plant Physiol.* 127:334-344.

Martin-Udiroz, M., M. P. Madrid, and M. I. G. Roncero, (2004). Role of chitin synthase genes in *Fusarium oxysporum*. *Microbiology* 150: 3175-3187. (*oxysporum*)

Maurhofer, M., Hase, C., Meuwly, P., M_etraux, J.P., D_efago, G., (1994). Induction of systemic resistance of tobacco to tobacco necrosis virus by the root-colonizing *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0: influence of the *gacA* gene and of pyoverdine production. *Phytopathology* 84, 139–146.

Mazzola M (1999). Transformation of soil microbial community structure and *Rhizoctonia* suppressive potential in response to apple roots. *Phytopathol* 89:920–927 358 *Plant Soil* (2009) 321:341–361

Meziane, H., Van der Sluis, I., Van Loon, L. C., Ho" fte, M., & Bakker, P. A. H. M. (2005). Determinants of *Pseudomonas putida* WCS358 involved in inducing systemic resistance in plants. *Molecular Plant Pathology*, 6, 177–185.

- Milgroom MG and Cortesi P** (2004). Biological control of chestnut blight with hypovirulence: a critical analysis. *Annual Review of Phytopathology* 42: 331–638.
- Nelson PE, Toussoun TA, Marasas WFO**, (1983). *Fusarium species. An illustrated manual for identification*. University Park, PA, USA: The Pennsylvania State University Press.
- Ng, K.K., MacDonald, L., Punja, Z.K.**, (1997). Biological control of rose powdery mildew with the antagonist yeast *Tilletiopsis pallescens*. *Hortscience* 32, 262–266.
- Nicholson RL, Hammerschmidt R** (1992) Phenolic compounds and their role in disease resistance. *Annu Rev*
- Nicot PC, Decognet V, Fruit L, Bardin M and Trottin Y** (2002). Combined effect of microclimate and dose of application on the efficacy of biocontrol agents for the protection of
- O'Donnell K, Cigelnik E**, (1997). Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 7: 103–116.
- O'Donnell K, Kistler HC, Tacke BK, Casper HH**, (2000). Gene genealogies reveal global phylogeographic structure and reproductive isolation among lineages of *Fusarium graminearum*, the fungus causing wheat scab. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 97: 7905–7910.
- Olivain C, Humbert C, Nahalkova J, Fatehi J, L'Haridon F and Alabouvette C** (2006). Colonization of tomato roots by pathogenic and non-pathogenic *Fusarium oxysporum* together
- Olivain C, Steinberg C and Alabouvette C** (1995). Evidence of induced resistance in tomato inoculated by nonpathogenic strains of *Fusarium oxysporum*. In: Manka M (ed.) *Environmental*
- Olivain C, Trouvelot S, Binet M-N, Cordier C, Pugin A and Alabouvette C** (2003). Colonization of flax roots and early physiological responses of flax cells inoculated with pathogenic
- Ospina-Giraldo M. D., Mullins E., and Kang S.**, (2003). Loss of function of the *Fusarium oxysporum* *SNF1* gene reduces virulence on cabbage and *Arabidopsis*. *Current Genetics*, 44: 49 – 57.
- Oyarzum PJ, Gerlagh M and Zadoks JC** (1998). Factors associated with soil receptivity to some fungal root rot pathogens of peas. *Applied Soil Ecology* 10: 151–169.
- Park, K. S., & Kloepper, J. W.** (2000). Activation of PR-1a promoter by rhizobacteria which induce systemic resistance in tobacco against *Pseudomonas syringae* pv.
- Parniske, M., Fischer, H.-M., Hennecke, H., & Werner, D.** (1991). Accumulation of the phytoalexin glyceollin I in soybean nodules infected by a Bradyrhizobium japonicum nifA mutant. *Zeitschrift für Naturforschung*, 46, 318–320.
- Pegg GF**, (1981). Biochemistry and physiology of pathogenesis. In *Mace, M.E., Bell, A.A., Beckman, C.H. Eds., Fungal Wilt Diseases of Plants. Academic Press, New York, p. 193 – 253.*
- Pegg GF**, (1989). Pathogenesis in vascular diseases of plants. In *Tjamos, E.C., and Beckman, C.H. Eds., Vascular wilt diseases of plants. Springer-Verlag, Berlin, p51 – 94.*
- Phillips, D. A., Fox, T. C., King, M. D., Bhuvaneswari, T. V., & Teuber, L. R.** (2004). Microbial products trigger amino acid exudation from plant roots. *Plant Physiology*, 136, 2887–2894.

- Pieterse CMJ, van Wees SCM, Hoffland E, van Pelt JA, van Loon LC**, (1996). Systemic resistance in *Arabidopsis* induced by biocontrol bacteria is independent of salicylic acid accumulation and pathogenesis-related gene expression. *Plant Cell* **8**, 1225-1237.
- Pieterse, C.M.J., van Wees, S.C.M., van Pelt, J.A., Knoester, M., Laan, R., Gerrits, H., Weisbeek, P.J., van Loon, L.C.**, (1998). A novel signaling pathway controlling induced systemic resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **10**, 1571–1580.
- Puhalla JE**, (1985). Classification of strains of *Fusarium oxysporum* on the basis of vegetative compatibility. *Canadian Journal of Botany* **63**:179–83.
- Puhalla JE**, (1985). Classification of strains of *Fusarium oxysporum* on the basis
- Raaijmakers JM, Weller DM** (1998). Natural plant protection by 2,4-diacetylphloroglucinol-producing *Pseudomonas* spp. in take-all decline soils. *Mol Plant–Microb Interact* **11**:144–152
- Raaijmakers, J. M., Leeman, M., Van Oorschot, M. P. M., Van der Sluis, I., Schippers, B., & Bakker, P. A. H. M.** (1995). Dose-response relationships in biological control of fusarium wilt of radish by *Pseudomonas* spp. *Phytopathology*, **85**, 1075–1081.
- Remotti, P. C., and H. J. M. Loffler**, (1996). The involvement of fusaric acid in the bulb rot of gladiolus. *Journal of Phytopathology* **144**: 405-411. (*oxysporum*)
- Rezzonico F, Binder C, Défago G, Moënne-Loccoz Y** (2005). The type III secretion system of biocontrol *Pseudomonas fluorescens* KD targets the phytopathogenic Chromista *Pythium ultimum* and promotes cucumber protection. *Mol Plant–Microb Interact* **18**:991–1001
- Rodriguez-Gálvez, E and Mendgen, K**, (1995). The infection process of *Fusarium oxysporum* in cotton root tips. *Protoplasma*, **189**, 61–72
- Rogers LM, Kim YK, Guo W, Gonzalez-Candelas L, Li D, Kolattukudy PE**, (2000). Requirement for either a host- or pectin-induced pectate lyase for infection of *Pisum sativum* by *Nectria hematococca*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **97**: 9813–8
- Roget DK, Neate SM and Rovira AD** (1996). Effect of sowing point design and tillage practice on the incidence of *Rhizoctonia* root rot, take-all and cereal cyst nematode in wheat and barley. *Australian Journal of Experimental Agriculture* **36**: 683–693.
- Ryu, C.-M., Hu, C.-H., Reddy, M. S., and Kloepper, J. W.** (2003). Different signaling pathways of induced resistance by rhizobacteria in *Arabidopsis thaliana* against two pathovars of *Pseudomonas syringae*. *New Phytol.* **160**:413-420.
- Salzer, P., Bonanomi, A., Beyer, K., Vogeli-Lange, R., Aeschbacher, R. A., Lange, J., Wiemken, A., Kim, D., Cook, D. R., and Boller, T.**, (2000). Differential expression of eight chitinase genes in *Medicago truncatula* roots during mycorrhiza formation, nodulation, and pathogen infection. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **13**:763-777.
- Samac, D. A., and Shah, D. M.**, (1991). Developmental and pathogen induced activation of the *Arabidopsis* acidic chitinase promoter. *Plant Cell* **3**:1063-1072.

- Schisler DA, Slininger PJ, Hanson LE and Loria R.** (2000). Potato cultivar, pathogen isolate and antagonist cultivation medium influence the efficacy and ranking of bacterial antagonists of *Fusarium* dry rot. *Biocontrol Science and Technology* 10: 267–279.
- Shoresh, M., Yedidia, I., and Chet, I.** (2005). Involvement of jasmonic acid/ethylene signaling pathway in the systemic resistance induced in cucumber by *Trichoderma asperellum* T203. *Phytopathology* 95:76-84.
- Shuhegger, R., Ihring, A., Gantner, S., Bahnweg, G., Knappe, C., Vogg, G., Hutzler, P., Schmid, M., Van Breusegem, F., Eberl, L., Hartmann, A., & Langebartels, C.** (2006). Induction of systemic resistance in tomato by N-acyl-L-homoserine lactone-producing rhizosphere bacteria. *Plant, Cell and Environment*, 29, 909–918.
- Snyder, W. C., and H. N. Hansen,** (1940). The species concept in *Fusarium*. *American Journal of Botany* 27: 64-67. (8, 9, *redolens, solani*)
- Snyder, W. C., and H. N. Hansen,** (1941). The species concept in *Fusarium* with reference to section *Martiella*. *American Journal of Botany* 28: 738-742. (8)
- Snyder, W. C., and H. N. Hansen,** (1945). The species concept in *Fusarium* with reference to *Discolor* and other sections. *American Journal of Botany* 32: 657-666. (8)
- Snyder, W. C., and H. N. Hansen,** (1954). Variation and speciation in the genus *Fusarium*. *Annals of the New York Academy of Sciences* 60: 16-23. (8, 9)
- Stanghellini ME, Kim DH, Waugh MM, Ferrin DM, Alcantara T, Rasmussen SL** (2004). Infection and colonization of melon roots by *Monosporascus cannonballus* in two cropping season in Arizona and California. *Plant Pathol* 53:54–57
- Steinberg C, Edel V, Gautheron N, Abadie C, Vallaes T, Alabouvette C,** (1997). Phenotypic characterization of natural populations of *Fusarium oxysporum* in relation to genotypic characterization. *FEMS Microbiology Ecology* 24: 73–85.
- Sticher, L., Mauch-Mani, B., & Me´traux, J.-P.** (1997). Systemic acquired resistance. *Annual Review of Phytopathology*, 35, 235–270.
- Suárez-Estella F., Vargas-García M.C., López M.J., Capel C., Moreno J.,** (2006). Antagonistic activity of bacteria and fungi from horticultural compost against *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*. *Crop Protection* 26: 46-53.
- Suárez-Estella F., Vargas-García M.C., López M.J., Moreno J.,** (2004). Survival of *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* on plant waste. *Crop Protection* 23: 127-133.
- Tilston EL, Pitt D and Groenhof AC** (2002). Composted recycled organic matter suppresses soil-borne diseases of field crops. *New Phytologist* 154: 731–740.
- Tjamos C. Eleftherios, Tsitsigiannis I. Dimitrios, Tjamos E. Sotirios, Antoniou P. Polymnia and Katinakis Panayiotis,** (2004). Selection and Screening of Endorhizosphere Bacteria from Solarized Soils as Biocontrol Agents Against *Verticillium dahliae* of Solanaceous Hosts. *European Journal of Plant Pathology* 110: 35-44.
- Tjamos SE, Flemetakis E, Paplomatas EJ, Katinakis P,** (2005). Induction of resistance to *Verticillium dahliae* in *Arabidopsis thaliana* by biocontrol agent K-165 and pathogenesis-related proteins gene expression. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 18, 555-561.

- van Loon LC, Rep M, Pieterse CM**, (2006). Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annu Rev Phytopathol* **44**, 135–162.
- van Loon LC, Van Strein EA**, (1999). The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **55**, 85-97.
- Van Loon, L. C., & Bakker, P. A. H. M.** (2003). Signalling in rhizobacteria-plant interactions. In H. De Kroon & E. J.
- Van Loon, L. C., & Bakker, P. A. H. M.** (2005). Induced systemic resistance as a mechanism of disease suppression by rhizobacteria. In Z. A. Siddiqui (Ed.), *PGPR: Biocontrol and biofertilization* (pp. 39–66). Dordrecht, The Netherlands: Springer Science.
- Van Loon, L. C., & Bakker, P. A. H. M.** (2006). Root-associated bacteria inducing systemic resistance. In S. S. Gnanamanickam (Ed.), *Plant-associated bacteria* (pp. 269–316). Dordrecht, The Netherlands: Springer.
- van Loon, L.C., Bakker, P.A.H.M., Pieterse, C.M.J.**, (1998). Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* **36**, 453–483.
- van Peer, R., Niemann, G.J., Schippers, B.**, (1991). Induced resistance and phytoalexin accumulation in biological control of Fusarium wilt of carnation by *Pseudomonas* sp. strain WCS417r. *Phytopathology* **81**, 728–734.
- Verhagen, B. W. M., Glazebrook, J., Zhu, T., Chang, H. S., Van Loon, L. C., & Pieterse, C. M. J.** (2004). The transcriptome of rhizobacteria-induced systemic resistance in *Arabidopsis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **17**, 895–908.
- Vessey, J. K.** (2003). Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil*, **255**, 571–586.
- Visker, M. H. P. W., Keizer, L. C. P., Budding, D. J., Van Loon, L. C., Colon, L. T., & Struik, P. C.** (2003). Leaf position prevails over plant age in reflecting resistance to late blight in potato. *Phytopathology*, **93**, 666–674.
- Voisard C, Keel C, Haas D, Défago G** (1989). Cyanide production by *Pseudomonas fluorescens* helps suppress black root of tobacco under gnotobiotic conditions. *EMBO J* **8**:351–358
- Wang, C., Knill, E., Glick, B. R., & De´fago, G.** (2000). Effect of transferring 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) deaminase genes into *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0 and its *gacA* derivative CHA96 on their growth-promoting and disease-suppressive capacities.
- Wang, Y., Ohara, Y., Nakayashiki, H., Tosa, Y., & Mayama, S.** (2005). Microarray analysis of the gene expression profile induced by the endophytic plant growth-promoting rhizobacteria,
- Wei, G., Kloepper, J. W., & Tuzun, S.** (1991). Induction of systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum orbiculare* by select strains of plant growth-promoting rhizobacteria. *Phytopathology*, **81**, 1508–1512.
- Weller DM and Thomashow LS** (1993). Microbial metabolites with biological activity. In: Lumsden D and Vaugh JL (eds.) *Pest Management: Biologically Based Technologies* (pp. 173– 180) American Chemical Society, Washington, USA.

- Weller DM, Raaijmakers JM, McSpadden Gardener BB, Thomashow LS** (2002). Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens. *Ann Rev Phytopathol* 40:309–348
- Widmer TL, Mitkowski NA, Abawi GS** (2002). Soil organic matter and management of plant-parasitic nematodes. *J Nematol* 34:289–295
- Windels CE**, (1992). Fusarium. In: Singleton LL, Mihail JD, Rush CM, eds. *Methods for research on soilborne phytopathogenic fungi*. St Paul, MN, USA: American Phytopathological Society, 115–128.
- Wollenweber, H. W, and O. A. Reinking**, (1935). *Die Fusarien, ihre Beschreibung, Schadwirkung und Bekämpfung*. Verlag Paul Parey, Berlin, Germany. (F, 8, 9, *acuminatum, chlamydosporum, compactum, culmorum, decemcellulare, dimerum, equiseti, lactis, lateritium, longipes, merismoides, nygamai, phyllophilum, poae, sambucinum, scirpi, semitectum, sporotrichioides, subglutinans, udum, venenatum*)
- Woo SL, Scala F, Ruocco M, Lorito M** (2006). The molecular biology of the interactions between *Trichoderma* spp. phytopathogenic fungi and plants. *Phytopathol* 96:181– 185
- Wosten HA, Schuren FH, Wessels JG**, (1994). Interfacial self-assembly of a hydrophobin into an amphipathic protein membrane mediates fungal attachment to hydrophobic surfaces. *The EMBO Journal* 13: 5848–54.
- Zhang S, Moyne A-L, Reddy MS, Kloepper JW**, (2002). The role of salicylic acid in induced systemic resistance elicited by plant growth-promoting rhizobacteria against blue mold of tobacco. *Biological Control* 25: 288–296.
- Zipfel, C., Robatzek, S., Navarro, L., Oakeley, E. J., Jones, J. D. G., Felix, G., & Boller, T.** (2004). Bacterial disease resistance in *Arabidopsis* through flagellin perception. *Nature*, 428, 764–767.
- Παναγόπουλος Χ.Γ.**, (1995). Ασθένειες κηπευτικών καλλιεργειών Β' έκδοση. Εκδόσεις Σταμούλης p. 67-73, 257-260.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι

Πείραμα 1^ο

Πίνακας 1 Μετρήσεις ποσοστού ασθενών φύλλων (πείραμα 1)

fusarium	20dpi	22dpi	24dpi	26dpi	28dpi
1	0	0	16.66667	16.66667	16.66667
2	0	0	12.5	12.5	12.5
3	0	25	37.5	37.5	55
4	0	0	0	11	11
5	0	0	14.28571	14.28571	14.28571
6	0	0	10	10	10
7	0	0	12.5	12.5	22
8	0	0	0	0	8.3
9	0	0	0	0	0
10	0	25	71.42857	85	100
11	0	0	11.11111	11.11111	11.11111
12	0	0	20	20	27
13	0	0	0	10	10
14	0	0	12.5	12.5	12.5
15	12.5	37.5	50	50	100
16	0	0	0	0	9
17	75	90	85.71429	100	100
18	0	0	0	0	0
19	0	0	28.57143	28.57143	28.57143
average	4.605263	9.342105	20.1462	22.71763	28.83868
standard error	3.965601	5.157753	5.680094	6.383669	7.76883
fusarium+k_165					
1	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	7.69
4	0	0	0	0	0
5	11	18	0	0	0
7	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	26.66
10	0	0	0	0	0
11	33	30	44.44444	44.44444	70
12	10	30	50	50	100
13	0	0	0	0	0
14	0	0	0	0	0
15	0	30	40	100	100
16	0	0	0	0	0

17	9	10	10	10	10
18	0	0	0	0	0
19	0	0	0	9	9
20	0	0	0	0	0
average	3.315789	6.210526	7.602339	11.23392	17.01842
standard error	1.812078	2.577228	3.755438	5.835355	7.518124

Πίνακας 2 Μετρήσεις ποσοστού ασθενών φυτών (πείραμα 1)

	20dpi	22dpi	24dpi	26dpi	28dpi
fusarium					
1	0	0	1	1	1.00
2	0	0	1	1	1.00
3	0	1	1	1	1.00
4	0	0	0	1	1.00
5	0	0	1	1	1.00
6	0	0	1	1	1.00
7	0	0	1	1	1.00
8	0	0	0	0	1.00
9	0	0	0	0	0.00
10	0	1	1	1	1.00
11	0	0	1	1	1.00
12	0	0	1	1	1.00
13	0	0	0	1	1.00
14	0	0	1	1	1.00
15	1	1	1	1	1.00
16	0	0	0	0	1.00
17	1	1	1	1	1.00
18	0	0	0	0	0.00
19	0	0	1	1	1.00
average	10.52632	21.05263	68.42105	78.94737	89.47368
standard error	7.233519	9.609168	10.95614	9.609168	7.233519
fusarium+k_165	20dpi	22dpi	24dpi	26dpi	28dpi
1	0	0	0	0	0.00
2	0	0	0	0	0.00
3	0	0	0	0	1.00
4	0	0	0	0	0.00
5	1	1	0	0	0.00
6	0	1	1	1	1.00
7	0	0	0	0	0.00
8	0	0	0	0	0.00
9	0	0	0	0	1.00
10	0	0	0	0	0.00
11	1	1	1	1	1.00
12	1	1	1	1	1.00
13	0	0	0	0	0.00

14	0	0	0	0	0.00
15	0	1	1	1	1.00
16	0	0	0	0	0.00
17	1	1	1	1	1.00
18	0	0	0	0	0.00
19	0	0	0	1	1.00
20	0	0	0	0	0.00
average	20	30	25	30	40
standard error	9.176629	10.51315	9.933993	10.51315	11.23903

Πείραμα 2°

Πίνακας 3 Μετρήσεις ποσοστού ασθενών φύλλων(πείραμα 2)

	12dpi	14dpi	16dpi	18dpi	20dpi	24dpi	AUDPC	REL_AUDPC
μαρτυρας								
1	14.28	14.28	28.5	75	88	100	799.52	33.3133333
2	0	0	14.28	28.5	87.5	100	548.06	22.8358333
3	16	16	16	12.5	88	100	665	27.7083333
4	0	0	0	0	14.28	14.28	71.4	2.975
5	12.5	12.5	12.5	12.5	87.5	100	625	26.0416667
6	16	16	16	12.5	25	25	326	13.5833333
7	22	22	22	22	22	22	396	16.5
8	0	0	0	22	22	22	154	6.41666667
9	0	0	0	22	22	22	154	6.41666667
10	0	0	11	11	10	10	94	3.91666667
11	12.5	12.5	12.5	10	10	10	207.5	8.64583333
12	0	0	0	11	10	10	72	3
13	0	0	11	11	11	11	99	4.125
14	0	0	0	0	0	0	0	0
15	0	0	0	0	0	0	0	0
average	6.2187	6.2187	9.585	16.67	33.15	36.42	280.77	11.6985556
se	2.1071	2.1071	2.379	4.708	9.002	10.42	80.985	3.37438096
ταλκ								
1	0	0	0	25	25	25	175	7.29166667
2	0	25	25	40	100	100	680	28.3333333
3	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	14.28	14.28	14.28	99.96	4.165
5	0	0	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0	0	0
7	0	12.5	12.5	20	20	20	190	7.91666667
8	0	14.28	14.28	12.5	12.5	12.5	144.62	6.02583333
9	0	0	12.5	12.5	12.5	12.5	112.5	4.6875
10	0	16	12.5	25	50	50	357	14.875

11	16	12.5	88	100	100	100	1013	42.2083333
12	0	14.28	14.28	42.8	42.8	42.8	356.72	14.8633333
13	16	28.5	100	100	100	100	1069	44.5416667
14	0	0	0	0	0	0	0	0
15	0	0	12.5	12.5	12.5	12.5	112.5	4.6875
average	2.1333	8.204	19.44	26.97	32.64	32.64	287.35	11.9730556
se	1.4536	2.5857	8.087	8.407	9.771	9.771	97.191	4.04964079
εμβάπτιση								
1	0	0	0	16	100	100	532	22.1666667
2	0	0	0	42.8	100	100	585.6	24.4
3	0	0	0	20	40	100	360	15
4	0	0	20	42.8	42.8	100	454	18.9166667
5	0	0	50	100	100	100	800	33.3333333
6	0	0	0	37.5	100	100	575	23.9583333
7	0	0	0	100	100	100	700	29.1666667
8	0	0	100	100	100	100	900	37.5
9	0	0	0	0	100	100	500	20.8333333
10	16	100	100	100	100	100	1212	50.5
11	0	0	14.28	14.28	100	100	557.12	23.2133333
12	0	0	12.5	25	62.5	100	462.5	19.2708333
13	0	14.28	100	100	100	100	928.56	38.69
14	0	0	86	86	100	100	844	35.1666667
15	0	14.28	87.5	100	100	100	903.56	37.6483333
average	1.0667	8.5707	38.02	58.96	89.69	100	687.62	28.6509444
se	1.0667	6.6569	11.26	10.19	5.641	0	80.608	3.35865692
ριζοπότισμα								
1	0	0	0	78	78	100	590	24.5833333
2	0	0	0	78	78	100	590	24.5833333
3	0	0	0	0	0	100	200	8.33333333
4	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	12.5	20	77.5	3.22916667
7	0	0	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0	0	0
9	0	0	0	11	11	11	77	3.20833333
10	0	0	0	0	0	0	0	0
11	0	0	10	9	9	9	83	3.45833333
12	0	0	0	0	0	0	0	0
13	0	0	0	0	0	0	0	0
14	0	0	0	0	0	0	0	0
15	0	0	0	0	0	0	0	0
average	0	0	0.667	11.73	12.57	22.67	107.83	4.49305556
se	0	0	0.667	7.005	6.955	10.44	57.091	2.3787843
επαν. ριζοπότισμα								
1	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0

3	0	0	0	12.5	12.5	25	112.5	4.6875
4	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	10	20	0.83333333
8	0	0	0	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0	0	0
11	0	0	0	0	0	0	0	0
12	0	0	0	0	0	0	0	0
13	0	0	0	0	0	0	0	0
14	0	0	0	0	0	0	0	0
15	0	0	0	0	0	0	0	0
average	0	0	0	0.833	0.833	2.333	8.8333	0.36805556
se	0	0	0	0.833	0.833	1.75	7.6672	0.31946806

Πίνακας 4 Μετρήσεις ποσοστού ασθενών φυτών (πείραμα2)

	12dpi	14dpi	16dpi	18dpi	20dpi	24dpi
μάρτυρας						
1	1	1	1	1	1	1
2	0	0	1	1	1	1
3	1	1	1	1	1	1
4	0	0	0	0	1	1
5	1	1	1	1	1	1
6	1	1	1	1	1	1
7	1	1	1	1	1	1
8	0	0	0	1	1	1
9	0	0	0	1	1	1
10	0	0	1	1	1	1
11	1	1	1	1	1	1
12	0	0	0	1	1	1
13	0	0	1	1	1	1
14	0	0	0	0	0	0
15	0	0	0	0	0	0
average	40	40	60	80	86.66667	86.66667
se	13.09307	13.09307	13.09307	10.69045	9.085135	9.085135
ταλκ						
1	0	0	0	1	1	1
2	0	1	1	1	1	1
3	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	1	1	1
5	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0
7	0	1	1	1	1	1
8	0	1	1	1	1	1

9	0	0	1	1	1	1
10	0	1	1	1	1	1
11	1	1	1	1	1	1
12	0	1	1	1	1	1
13	1	1	1	1	1	1
14	0	0	0	0	0	0
15	0	0	1	1	1	1
average	13.33333	46.66667	60	73.33333	73.33333	73.33333
se	9.085135	13.33333	13.09307	11.81874	11.81874	11.81874
εμβαπτιση						
1	0	0	0	1	1	1
2	0	0	0	1	1	1
3	0	0	0	1	1	1
4	0	0	1	1	1	1
5	0	0	1	1	1	1
6	0	0	0	1	1	1
7	0	0	0	1	1	1
8	0	0	1	1	1	1
9	0	0	0	0	1	1
10	1	1	1	1	1	1
11	0	0	1	1	1	1
12	0	0	1	1	1	1
13	0	1	1	1	1	1
14	0	0	1	1	1	1
15	0	1	1	1	1	1
average	6.666667	20	60	93.33333	100	100
se	6.666667	10.69045	13.09307	6.666667	0	0
ριζοπότημα						
1	0	0	0	1	1	1
2	0	0	0	1	1	1
3	0	0	0	0	0	1
4	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	1	1
7	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0
9	0	0	0	1	1	1
10	0	0	0	0	0	0
11	0	0	1	1	1	1
12	0	0	0	0	0	0
13	0	0	0	0	0	0
14	0	0	0	0	0	0
15	0	0	0	0	0	0
average	0	0	6.666667	26.66667	33.33333	40
se	0	0	6.666667	11.81874	12.59882	13.09307
επαν. ριζοπότημα						

1	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	1	1	1
4	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	1
8	0	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0
11	0	0	0	0	0	0
12	0	0	0	0	0	0
13	0	0	0	0	0	0
14	0	0	0	0	0	0
15	0	0	0	0	0	0
average	0	0	0	6.666667	6.666667	13.333333
se	0	0	0	6.666667	6.666667	9.085135

Πείραμα 3^ο

Πίνακας 5 Μετρήσεις Πειράματος Πληθυσμιακής Πυκνότητας

Επέμβαση	dpi	Μετρήσεις		
ριζοπότισμα πριν+μετά	7	9.20E+05		
	7	5.60E+05		
	7	1.60E+05		
	average	5.47E+05		
		E-03	E-05	
	14	9.20E+05	6.80E+06	
	14	9.20E+05	4.00E+06	
	14	2.00E+04	2.00E+05	
	average	6.20E+05	3.67E+06	2.14E+06
		E-03	E-05	
	21	4.56E+05	2.00E+05	
	21	4.88E+05	2.00E+05	
	21	6.40E+05	6.00E+05	
	average	5.28E+05	3.33E+05	4.31E+05
		E-03	E-05	
	28	1.60E+06	2.00E+06	
	28	1.98E+06	4.00E+06	
	28	1.74E+06	3.60E+06	
	average	1.77E+06	3.20E+06	2.49E+06

ριζοπότισμα	7	9.90E+06		
	7	2.00E+07		
	7	2.00E+07		
	average	1.66E+07		
		E-04	E-06	
	14	1.60E+07	1.20E+07	
	14	2.16E+07	3.80E+07	
	14	1.76E+07	3.20E+07	
	average	1.84E+07	2.73E+07	2.29E+07
		E-04	E-06	
	21	3.76E+06	2.00E+06	
	21	6.20E+06	4.00E+06	
	21	4.24E+06	1.80E+07	
	average	4.73E+06	8.00E+06	6.37E+06
		E-04	E-06	
	28	1.04E+06	2.00E+06	
	28	5.40E+05	2.00E+06	
	28	5.00E+05	0.00E+00	
	average	6.93E+05	1.33E+06	1.01E+06
ταλκ		E-03	E-05	
	7	2.76E+05	4.00E+05	
	7	7.36E+05	1.80E+06	
	7	2.80E+05	8.00E+05	
	average	4.31E+05	1.00E+06	7.15E+05
		E-03	E-05	
	14	1.66E+05	2.00E+05	
	14	1.40E+05	0.00E+00	
	14	1.62E+05	2.00E+05	
	average	1.56E+05	1.33E+05	1.45E+05
		E-03	E-05	
	21	6.00E+04	0.00E+00	
	21	1.30E+05	2.00E+05	
	21	5.40E+04	0.00E+00	
	average	8.13E+04	6.67E+04	7.40E+04
εμβάπτιση		E-03	E-05	
	7	8.32E+05	1.80E+06	
	7	5.60E+05	6.00E+05	

	7	1.50E+05	6.00E+05	
	average	5.14E+05	1.00E+06	7.57E+05
		E-03	E-05	
	14	6.00E+03	0.00E+00	
	14	6.00E+04	4.00E+05	
	14	1.46E+05	8.00E+05	
	average	7.07E+04	4.00E+05	2.35E+05
		E-03	E-05	
	21	2.18E+05	4.00E+05	
	21	7.60E+05	8.00E+05	
	21	9.00E+04	2.00E+05	
	average	3.56E+05	4.67E+05	4.11E+05

Πείραμα 4°

Πίνακας 6 Τιμές έκφρασης γονιδίου PAL

PAL	
επέμβαση	σχετική ως προς το μάρτυρα έκφραση
ριζοπ 7π+μ	3.286426387
ριζοπ 7π	68.04586034
ριζοπ 14π+μ	38.63424362
ριζοπ 14π	0.000867376
εμβ 7	5.386063751
ταлк 7	180.5878716
ριζοп 21π+μ	4.239748249
ριζοп 21π+μ	10.81423456
ριζοп 21π	0.105466714
ριζοп 21π	9.545757251
εμβ 14	27.2854805
ταлк 14	19.07985896
ριζοп 28π+μ	141.4193106
ριζοп 28π	82.42337904
εμβ 21	172.1387938
ταлк 21	231.7479798

Πίνακας 7 Τιμές έκφρασης γονιδίου CHIT

CHIT	
επέμβαση	σχετική ως προς το μάρτυρα έκφραση
ριζοп 7π+μ	69.2218
ριζοп 7π	4525.96
ριζοп 14π+μ	990.494
ριζοп 14π	0.201208
εμβ 7	47.30166
ταлк 7	866.5096
ριζοп 21π+μ	25.99208
ριζοп 21π+μ	0
ριζοп 21π	0
ριζοп 21π	69.55103
εμβ 14	43.66749
ταлк 14	94.04234
ριζοп 28π+μ	535.7531
ριζοп 28π	498.107
εμβ 21	2079.075
ταлк 21	780.7388

