

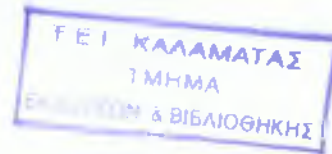
ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ  
ΚΑΛΑΜΑΤΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ Π.Σ.Ε.

Επισχετική δράση ενός μη παθογόνου στελέχους  
*Fusarium* sp. Ενάντια στον φυτοπαθογόνο μύκητα  
εδάφους *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis lycopersici*  
(FORL)

Πτυχιακή εργασία της σπουδάστριάς  
Ευαγγελίας Παυλή

Καλαμάτα, 2005

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ  
ΚΑΛΑΜΑΤΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ Π.Σ.Ε.



Επισχετική δράση ενός μη παθογόνου στελέχους  
*Fusarium* sp. Ενώπιον στον φυτοπαθογόνο μύκητα  
εδάφους *Fusarium oxysporum* f.sp.*radicis lycopersici*  
(FORL)

Πτυχιακή εργασία της σπουδάστριας  
Ευαγγελίας Παυλή

Επιβλέπων καθηγητής: ΗΛΙΟΠΟΥΛΟΣ ΑΝΑΣΤΑΣΙΟΣ

Καλαμάτα, 2005

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	σελ.4
<b>ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b>	
1.1. ΓΕΝΙΚΑ .....	σελ.6
1.2. Η ΕΠΙΣΤΗΜΗ ΤΗΣ ΦΥΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ .....	σελ.7
1.3. ΟΙ ΜΥΚΗΤΕΣ ΩΣ ΦΥΤΟΠΑΘΟΓΟΝΑ.....	σελ.9
1.3.1. Εδαφικοί φυτοπαθογόνοι μύκητες .....	σελ.10
1.3.2. Ο μύκητας.....	σελ.11
1.3.3.Ταξινόμηση σε φυσιολογικές φυλές ( <i>formae speciales</i> ) .....	σελ.11
1.3.4. Εξάπλωση της ασθένειας.....	σελ.13
1.4. ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ .....	σελ.14
1.4.1. Χημική αντιμετώπιση.....	σελ.14
1.4.2. Καλλιεργητικά μέτρα.....	σελ.15
1.4.3. Ανθεκτικά φυτά .....	σελ.16
1.4.4. Βιολογικός έλεγχος.....	σελ.16
1.5. ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ.....	σελ.18
1.5.1 Παραγωγή αντιβιοτικών ουσιών .....	σελ.19
1.5.2. Τροφικός ανταγωνισμός.....	σελ.20
1.5.3 Παρασιτισμός –υδρολυτικά ένζυμα .....	σελ.21
1.5.4.Επίκτητη αντοχή.....	σελ.22
1.6. Η ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΤΗΣ ΤΟΜΑΤΑΣ.....	σελ.23
1.6.1. Βοτανικά χαρακτηριστικά .....	σελ.23
1.6.2. Μορφολογικά χαρακτηριστικά .....	σελ.23
<b>ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</b>	
2.1. ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΥΛΙΚΑ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΤΩΝ ΜΥΚΗΤΩΝ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ.....	σελ.26

2.2. Ο ΠΑΘΟΓΟΝΟΣ ΜΥΚΗΤΑΣ <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>radicis lycopersici</i> , ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΔΙΑΤΗΡΗΣΗΣ ΚΑΙ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ .....	σελ.26
2.3. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΤΟΥ ΜΗ ΠΑΘΟΓΟΝΟΥ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ <i>Fusarium sp.</i> .....	σελ.27
2.4. ΦΥΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΧΕΙΡΙΣΜΟΙ ΠΡΙΝ ΤΗ ΣΠΟΡΑ .....	σελ.27
2.5. ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΓΛΑΣΤΡΩΝ.....	σελ.27
2.6. ΘΡΕΠΤΙΚΟ ΔΙΑΛΥΜΑ ΦΥΤΩΝ.....	σελ.28
2.7. ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΑΥΤΟΧΡΟΝΗΣ ΜΟΛΥΝΣΗΣ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ ΤΟΜΑΤΑΣ ΜΕ ΣΤΕΛΕΧΗ ΤΟΥ ΠΑΘΟΓΟΝΟΥ ΜΥΚΗΤΑ <i>F.oxysporum</i> f.sp. <i>radicis lycopersici</i> (FORL) ΚΑΙ ΤΟΥ ΜΗ ΠΑΘΟΓΟΝΟΥ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ <i>Fusarium sp.</i> .....	σελ.29
2.8.ΠΑΡΑΛΑΒΗ ΕΞΑΝΤΛΗΜΕΝΟΥ ΘΡΕΠΤΙΚΟΥ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΟΣ (Ε.Θ.Υ.) ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΤΟΥ ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΥ ΣΤΑ ΠΑΘΟΓΟΝΑ ΜΥΚΗΤΑ <i>Fussarium sp.</i> .....	σελ.30
2.9.ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΟΥ ΕΞΑΝΤΛΗΜΕΝΟΥ ΘΡΕΠΤΙΚΟΥ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΟΣ ΤΟΥ <i>Fusarium spp.</i> ΑΝΑ ΤΑΚΤΑ ΧΡΟΝΙΚΑ ΔΙΑΣΤΗΜΑΤΑ ΣΕ ΦΥΤΑ ΤΟΜΑΤΑΣ, ΤΑ ΟΠΟΙΑ ΜΟΛΥΝΘΗΚΑΝ ΜΕ ΤΟΝ ΜΥΚΗΤΑ <i>F.oxysporum</i> f.sp. <i>radicis lycopersici</i> (FORL).....	σελ.30

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ- ΣΥΖΗΤΗΣΗ

3.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	σελ.33
3.2.ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΕΝΔΟΦΥΤΙΚΟΥ ΜΗ ΠΑΘΟΓΟΝΟΥ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ <i>Fusarium sp.</i> ΝΑ ΠΡΟΣΤΑΤΕΥΕΙ ΦΥΤΑ ΝΤΟΜΑΤΑΣ ΈΝΑΝΤΙ ΤΟΥ <i>F.oxysporum</i> f.sp. <i>radicis lycopersici</i> ΣΕ ΤΑΥΤΟΧΡΟΝΗ ΜΟΛΥΝΣΗ .....	σελ.34
3.3. ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΕΞΑΝΤΛΗΜΕΝΟΥ ΘΡΕΠΤΙΚΟΥ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΟΣ (ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΟΥ pH ΣΕ ΟΥΔΕΤΕΡΕΣ ΤΙΜΕΣ) ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ <i>Fusarium sp.</i> ΣΕ ΦΥΤΑ ΝΤΟΜΑΤΑΣ ΤΑ ΟΠΟΙΑ ΕΙΧΑΝ ΜΟΛΥΝΘΕΙ ΜΕ ΤΟ ΜΥΚΗΤΑ <i>F.oxysporum</i> f.sp. <i>radicis lycopersici</i> .....	σελ.38

<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b> .....	σελ.40
---------------------------	--------

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η πτυχιακή αυτή εργασία πραγματοποιήθηκε στο Ινστιτούτο Περιβαλλοντικής Βιοτεχνολογίας Καλαμάτας κατά τη διάρκεια της πρακτικής μου άσκησης.

Ευχαριστώ τον Διευθυντή του Ινστιτούτου Δρ. Γεώργιο Ι. Ζερβάκη για την διάθεση των εργαστηριακών χώρων και του εξοπλισμού.

Ευχαριστώ ιδιαίτερα τον γεωπόνο Δρ. Καβρουλάκη Νεκτάριο ο οποίος επέβλεψε την πτυχιακή μου εργασία, τόσο κατά την διεξαγωγή των πειραμάτων όσο και κατά τη διόρθωσή της. Επίσης, ευχαριστώ τη βιολόγο Δρ. Παπαδοπούλου Καλλιόπη για τις γνώσεις που μου μετέδωσε κατά την διάρκεια των πειραμάτων καθώς και για τις συμβουλές της στη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους καθηγητές μου για τις γνώσεις που μου μετέδωσαν όλα τα χρόνια της φοίτησής μου στο Τ.Ε.Ι. Καλαμάτας.

Καλαμάτα Απρίλιος 2005  
Ευαγγελία Παυλή

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο μύκητας *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis lycopersici* (FORL) είναι παθογόνο εδάφους το οποίο εγκαθίσταται στα αγγεία του ξύλου με αποτέλεσμα να προκαλεί καταστρεπτικές ασθένειες στα φυτά και πολύ σοβαρές ζημιές κυρίως στη θερμοκηπιακή τομάτα. Τις τελευταίες δεκαετίες έχει δοθεί ιδιαίτερη έμφαση από πολλές ερευνητικές εργασίες στην ανταγωνιστική δράση ορισμένων μικροοργανισμών (κυρίως μυκήτων και βακτηρίων) εναντίον άλλων με αποτέλεσμα τον περιορισμό δράσης των ασθενειών που προκαλούν.

Σκοπός αυτής της εργασίας ήταν να διερευνηθεί η δράση ενός μη παθογόνου στελέχους του γένους *Fusarium* sp ενάντια στον φυτοπαθογόνο μύκητα εδάφους *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis lycopersici*.(FORL). Το στέλεχος αυτό του μύκητα *Fusarium* sp. που χρησιμοποιήθηκε στη παρούσα μελέτη έχει απομονωθεί στο Ινστιτούτο Περιβαλλοντικής Βιοτεχνολογίας Καλαμάτας.

Για τον σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκε::

Α) ταυτόχρονος εμβολιασμός φυτών τομάτας με στελέχη του παθογόνου μύκητα *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis lycopersici* (FORL) και του μη παθογόνου στελέχους *Fusarium* sp. Στο πείραμα αυτό δοκιμάστηκαν διάφορες συγκεντρώσεις κονιδίων του ανταγωνιστή μύκητα στο υπόστρωμα ανάπτυξης των φυτών.

Β) Εφαρμογή εξαντλημένου θρεπτικού υποστρώματος (Ε.Θ.Υ.) του μη παθογόνου στελέχους *Fusarium* sp. ανά τακτά χρονικά διαστήματα σε φυτά τομάτας, τα οποία είχαν μολυνθεί με τον παθογόνο μύκητα *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis lycopersici* (FORL). Στο πείραμα αυτό είχε προηγηθεί διόρθωση του pH του Ε.Θ.Υ. σε ουδέτερες τιμές.

Από τα πειράματα προέκυψαν τα εξής συμπεράσματα:

Ο ανταγωνιστής μύκητας *Fusarium* sp. προστάτευσε τα φυτά τομάτας από το παθογόνο *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis lycopersici* κατά την ταυτόχρονη μόλυνση όταν η συγκέντρωση κονιδίων του ήταν  $10^6$ κονίδια/cm<sup>3</sup> τύρφης. Η προσθήκη εξαντλημένου θρεπτικού υποστρώματος καλλιεργειών ενδοφυτικού *Fusarium* sp. δεν φαίνεται να έχει επίδραση στην εξάπλωση της ασθένειας που προκαλεί το FORL.

## **ΕΙΣΑΓΩΓΗ**



## 1.1. ΓΕΝΙΚΑ

Τουλάχιστον πέντε εκατομμύρια διαφορετικά είδη ζώντων οργανισμών μοιράζονται τη βιόσφαιρά μας (τη ζώνη του αέρα, της ξηράς και του νερού στην επιφάνεια της γης, την οποία καταλαμβάνουν οι ζώντες οργανισμοί). Κυρίαρχη θέση στη βιόσφαιρα κατέχει ο άνθρωπος, η ζωή και επιβίωση του οποίου ελέγχεται και εξαρτάται από πλήθος άλλων φυσικών παραγόντων που αποτελούν στο σύνολό τους αυτό που ονομάζουμε «περιβάλλον».

Ένας από τους σημαντικότερους συντελεστές του περιβάλλοντος είναι χωρίς αμφιβολία τα φυτά. Τα φυτά είναι ανώτεροι οργανισμοί, οι οποίοι μετατρέπουν την ηλιακή ενέργεια σε χημική και μηχανική ενέργεια, καθιστώντας τα έτσι σημαντικούς παραγωγούς οργανικών ουσιών στη φύση, οι οποίες άμεσα ή έμμεσα γίνονται προσιτές στους ετερότροφους οργανισμούς. Το έδαφος είναι το πρωταρχικό θρεπτικό υπόστρωμα για τα φυτά. Τα εδάφη πρέπει να παρέχουν στα φυτά, όχι μόνο φυσική στήριξη, αλλά επαρκή και συνεχή εφοδιασμό με ανόργανα θρεπτικά συστατικά, καθώς επίσης επαρκείς ποσότητες νερού και ένα κατάλληλο αερόβιο περιβάλλον για τα ριζικά συστήματα. Η θερμοκρασία και ο φωτισμός παίζουν σημαντικό ρόλο στη ζωή των φυτών. Τα φυτά όμως, όπως όλοι οι οργανισμοί ασθενούν.

Αλλά: «Αφού δεν γνωρίζουμε αν τα φυτά αισθάνονται πόνο ή αδιαθεσία και αφού (έστω κι αν αυτό συμβαίνει) τα φυτά δεν μιλούν ούτε με άλλο τρόπο επικοινωνούν μαζί μας, είναι δύσκολο να καθορίσουμε ακριβώς πότε ένα φυτό ασθενεί!» (Agrios, 1997).

Μιλάμε για ασθένεια, όταν οι επιπτώσεις εκφραστούν σαν ένα σύστημα νοσηρών χαρακτηρισμών, σαν ορισμένες «ανωμαλίες» μορφής ή συμπεριφοράς, που είναι μάλλον εύκολο να τις αναγνωρίσουμε. Οι νοσηροί χαρακτήρες, με τους οποίους εκδηλώνονται οι ασθένειες, διακρίνονται σε τρεις κατηγορίες:

- α) Συμπτώματα, δηλαδή αλλοιώσεις μορφολογικές, ιστολογικές ή κυτταρολογικές του φυτού, που τις διακρίνουμε μακροσκοπικά ή μικροσκοπικά και που δεν τις συναντάμε στα υγιή φυτά.
- β) Σημεία, δηλαδή σχηματισμούς ξένους προς το φυτό, που κατά κανόνα οφείλονται αποκλειστικά στο παθογόνο και



γ) Φυσιοπαθολογικούς χαρακτήρες, όπως η μεταδοτικότητα, η συντόμευση της ζωής του φυτού, οι ορρολογικές αντιδράσεις κ.λπ.

Τα αίτια των ασθενειών των φυτών (παθογόνα) είναι είτε ζωντανοί οργανισμοί, δηλαδή φανερόγαμα παράσιτα, μύκητες, βακτήρια, μυκοπλάσματα, ρικέτσιες, πρωτόζωα, είτε ιοί (ή ινοειδή) είτε δυσμενείς για το φυτό συνθήκες του περιβάλλοντος (αβιοτικά παθογόνα) (Γεωργόπουλος, 1984).

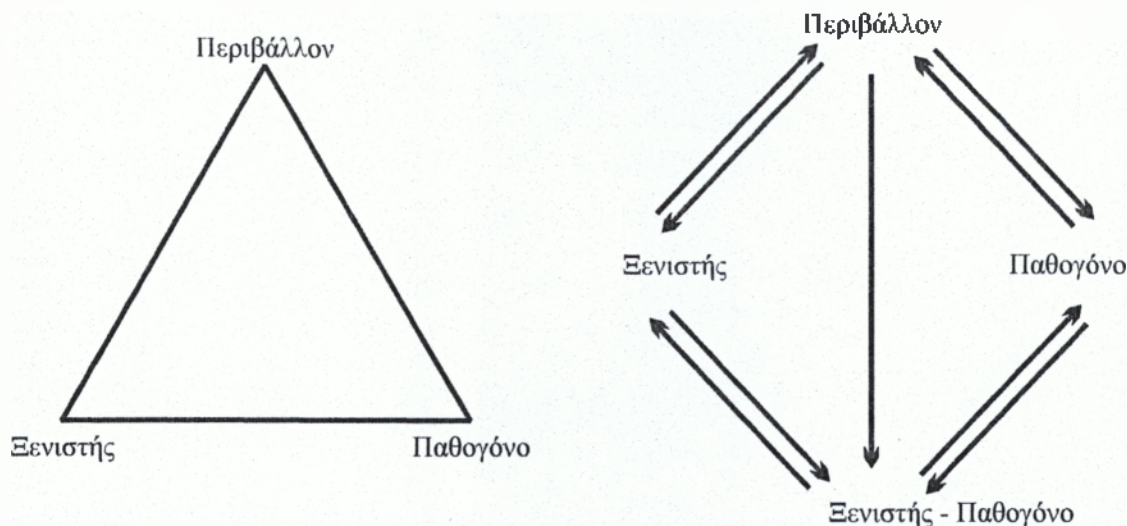
Η μείωση των ζημιών από τις ασθένειες των φυτών είναι μείζονος σημασίας, όπως εξίσου είναι και η αποφυγή απωλειών μεγάλων ποσοτήτων προϊόντων για την τοπική και εθνική οικονομία. Ακόμα και στις γεωργικά πολύ προηγμένες χώρες οι ζημιές από τις ασθένειες είναι τεράστιες και ζημιώνουν την παραγωγή, αχρηστεύουν το φυτικό κεφάλαιο και το καθιστούν ακατάλληλο.

Η διατήρηση των φυτών σε καλή παραγωγική κατάσταση, αφορά τον κάθε άνθρωπο που θέλει επάρκεια και καλή ποιότητα φυτικών προϊόντων, αλλά και την επιβίωσή του πάνω στον πλανήτη (Lucas, 1998).

## 1.2. Η ΕΠΙΣΤΗΜΗ ΤΗΣ ΦΥΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ

Φυτοπαθολογία είναι η επιστήμη, που ασχολείται με τις ασθένειες των φυτών και αναζητεί τρόπους καταπολέμησής τους. Η φυτοπαθολογία μελετά: α) τα αίτια των ασθενειών (παθογόνα), β) την αντίδραση του φυτού και τους μηχανισμούς αλληλεπιδράσεως φυτού και παθογόνου, γ) την επίδραση των παραγόντων του περιβάλλοντος και δ) τις φυσικές, χημικές, βιολογικές κ.α. μεθόδους, που μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε, για να καταπολεμήσουμε τις ασθένειες των φυτών ή να μειώσουμε τις ζημιές που προκαλούν.

Η ύπαρξη ευαίσθητων φυτών και η αφθονία μολύσματος ενός ισχυρού παθογόνου, δεν είναι αρκετή για να ξεκινήσει και να εξαπλωθεί η ασθένεια. Χρειάζονται και κατάλληλες συνθήκες περιβάλλοντος. Έτσι όπως δείχνει το τρίγωνο της ασθένειας (σχ. 1) (disease triangle), τρεις είναι οι σημαντικοί παράγοντες για την εξάπλωση μιας ασθένειας.



**Σχ. 1: Αλληλεπίδραση Ξενιστή – Παθογόνου (Lucas, 1998)**

Κάθε πλευρά του τριγώνου σημαίνει αλληλεπίδραση μεταξύ δύο παραγόντων. Είναι φανερό ότι τα φυτά π.χ. δεν επηρεάζονται μόνο από το περιβάλλον, αλλά και το επηρεάζουν κ.ο.κ.

Για να αναπτυχθεί μια ασθένεια σε ανησυχητικό ή και καταστρεπτικό για τη γεωργία βαθμό πρέπει:

- α. Ο ξενιστής να είναι γονοτυπικά ευαίσθητος (ο φαινότυπος, φυσικά, επηρεάζεται), να βρίσκεται σε κατάλληλη κατάσταση βλαστήσεως και σε πυκνότητα πληθυσμού στο χώρο και στο χρόνο.
- β. Το παθογόνο να έχει υψηλή γονοτυπική παθογόνο δύναμη και ικανότητα για παραγωγή μεγάλου αριθμού μολυσμάτων, ώστε μερικά τουλάχιστον να αποκαταστήσουν την επαφή με την εστία μόλυνσεως στον κατάλληλο χρόνο.
- γ. Το περιβάλλον να αυξάνει την ευαισθησία του ξενιστή, να μειώνει το χρόνο αναπαραγωγής του παθογόνου, να εξασφαλίζει μεταφορά των μολυσμάτων, μακρά διατήρηση των μολυσμάτων αυτών, αλλά γρήγορη βλάστηση και μόλυνση (περιλαμβάνονται, βέβαια, και βιοτικοί παράγοντες του περιβάλλοντος).

Προκύπτει από τα παραπάνω ότι, αν θέλουμε να μειώσουμε την εξάπλωση μιας ασθένειας και την καταστρεπτικότητά της, πρέπει να επηρεάσουμε ένα ή περισσότερους από τους τρεις παράγοντες: να μειώσουμε την παθογόνο δύναμη του παθογόνου, να αυξήσουμε την αντοχή του ξενιστή, ή να κάνουμε δυσμενές για την

ασθένεια το περιβάλλον, π.χ. με αλλαγή στις καλλιεργητικές μεθόδους ή με προσθήκη ουσιών, που είναι τοξικές για το παθογόνο.

### 1.3. ΟΙ ΜΥΚΗΤΕΣ ΩΣ ΦΥΤΟΠΑΘΟΓΟΝΑ

Οι μύκητες αποτελούν μια πολύ παλιά ομάδα μικροοργανισμών, που υπάρχουν στη γη πάνω από δύο εκατομμύρια χρόνια, όπως δείχνουν απολιθώματα φυτών.

Σύμφωνα με τα βασικά μορφολογικά και φυσιολογικά χαρακτηριστικά τους, οι μύκητες:

- είναι ευκαρυωτικοί οργανισμοί.
- στερούνται χλωροφύλλης (είναι ετερότροφοι).
- τα κύτταρά τους περιβάλλονται από κυτταρικό τοίχωμα, το οποίο συνίσταται από χιτίνη ή κυτταρίνη ή και από τις δύο.
- το σώμα τους είναι νηματοειδές διακλαδιζόμενο ή αμοιβαδοειδές.
- αναπαράγονται κατά κανόνα με αγενή ή εγγενή σπόρια.
- ζουν σε ποικιλία υποστρωμάτων και συνθηκών ως παράσιτα ή σαπρόφυτα (Ηλιόπουλος, 2000).

Στους μύκητες ανήκει το σημαντικότερο και πολυπληθέστερο άθροισμα φυτοπαθογόνων μικροοργανισμών. Έχουν περιγραφεί 100.000 είδη που κατατάσσονται σε 2.500 περίπου γένη. Τα περισσότερα ζουν σαπροφυτικά στο έδαφος και αλλού, ενώ άλλα είναι παράσιτα κυρίως των φυτών και μερικά του ανθρώπου και των ζώων. Περισσότερα από 8.000 είδη μυκήτων έχουν προσδιοριστεί ως φυτοπαθογόνα. Σχεδόν όλα τα φυτά προσβάλλονται από μερικά είδη μυκήτων. Ορισμένοι φυτοπαθογόνοι μύκητες μπορούν να προσβάλλουν πολλά είδη φυτών, ενώ άλλοι μόνο λίγα είδη. Μερικοί προσβάλλουν μόνο ένα είδος φυτού. Ως σαπρόφυτα, οι μύκητες συμβάλλουν μαζί με τα βακτήρια και άλλους μικροοργανισμούς στη χουμοποίηση και διατήρηση της γονιμότητας του εδάφους. Σχεδόν όλοι οι μύκητες έχουν την ικανότητα αποσύνθεσης πολύπλοκων οργανικών ουσιών, τις οποίες χρησιμοποιούν ως πηγές ενέργειας. Ενώ άλλοι παρασιτούν ανώτερα φυτά με την ατελή μορφή τους *Fusicladium dendriticum* (Φουζικλάδιο μηλιάς) και ζουν

σαπροφυτικά με την τέλεια μορφή τους *Venturia inaequalis* ως Ασχομύκητας (Chrispeels and Sadava, 1994).

Μερικά είδη φυτοπαθογόνων μυκήτων παράγουν τοξικές για τα ζώα και τον άνθρωπο ουσίες, καλούμενες μυκοτοξίνες. Για παράδειγμα, αποθηκευμένοι σπόροι σιτηρών ή ξηρών καρπών υπό συνθήκες αυξημένης υγρασίας μπορεί να προσβληθούν από το μύκητα *Aspergillus flavidus*, ο οποίος παράγει την τοξική ουσία αφλατοξίνη.

### 1.3.1. Εδαφικοί φυτοπαθογόνοι μύκητες

Μερικά φυτοπαθογόνα είδη μυκήτων ζουν και αναπαράγονται εντός του εδάφους, προσβάλλοντας κυρίως υπόγεια τμήματα φυτών. Οι μύκητες αυτοί ονομάζονται γενικά «μύκητες εδάφους» και επιβιώνουν υπό μορφή σπορίων, μυκηλίου ή μυκηλιακών κατασκευών στο έδαφος ή σε υπολείμματα φυτών.

Μερικές σημαντικές ασθένειες που οφείλονται σε μύκητες εδάφους φαίνονται στον πίνακα 1.

**Πίνακας 1. Αντιπροσωπευτικά είδη ασθενειών, που οφείλονται σε μύκητες εδάφους (Ηλιόπουλος, 2000).**

<b>ΑΣΘΕΝΕΙΑ</b>	<b>ΠΑΘΟΓΟΝΟΙ ΜΥΚΗΤΕΣ</b>	<b>ΕΙΔΗ ΦΥΤΩΝ ΞΕΝΙΣΤΩΝ</b>
<b>Τήξη φυταρίων</b>	<i>Pythium spp.</i> <i>Rhizoctonia solani</i>	Λαχανοκομικά, καπνός, ανθοκομικά, φυτώρια, βαμβάκι κ.α.
<b>Σηψιριζιές, Σήψεις λαιμού</b>	<i>Sclerotium rolsfii</i> <i>Rhizoctonia solani</i> <i>Fusarium spp.</i> <i>Phytophthora spp.</i> <i>Sclerotinia spp.</i>	Λαχανοκομικά, ανθοκομικά, φυτώρια, βαμβάκι, καπνός, σιτηρά
<b>Αδρομυκώσεις</b>	<i>Fusarium spp.</i> <i>Verticillium dahliae</i> <i>V. albo-atrum</i>	Λαχανοκομικά, ανθοκομικά, βαμβάκι, οπωροφόρα κ.α.

Η επιβίωση και ανάπτυξη των παθογόνων, εξαρτάται σε πολύ μεγάλο μέρος από τις συνθήκες περιβάλλοντος, όπως την υγρασία, τη θερμοκρασία, τη

διαθεσιμότητα τροφής, παράγοντες που καθορίζουν τη δυνατότητα πρόσληψης της τροφής.

### 1.3.2. Ο μύκητας

*Fusarium oxysporum* f.sp *radicis lycopersici* (FORL)

Ταξινόμηση (κατά Hawksworth et al, 1983)

**ΒΑΣΙΛΕΙΟ:** Μύκητες – Fungi

**ΔΙΑΙΡΕΣΗ:** Ευμύκητες- Eumycota (Θαλλός Νηματοειδής με ή χωρίς Septa)

**ΥΠΟΔΙΑΙΡΕΣΗ:** Δευτερομύκητες ή Ατελείς ή Αδηλομύκητες –  
Deuteromycotina

**ΚΛΑΣΗ:** Υφομύκητες – Hyphomycetes

**ΤΑΞΗ:** Tuberculariales (Τα κονίδια παράγονται σε σποριοδόχεια)

**ΟΜΑΔΑ ΓΕΝΩΝ:** Hyalophragmiae

**ΓΕΝΟΣ :**Fusarium

### 1.3.3.Ταξινόμηση σε φυσιολογικές φυλές (formae speciales)

Το είδος *Fusarium oxysporum* όπως το γνωρίζουμε σήμερα, συμπεριλήφθηκε για πρώτη φορά στο Section Elegans από τους Wollenweder και Reinking το 1935.Ο διαχωρισμός τους βασίστηκε στο εάν τα μακροκονιδιά τους γεννιόνται σε σποριοδόχεια ή όχι, και στο πλάτος αυτών. Χρησιμοποιώντας την τεχνική των μονόσπορων καλλιεργειών και αναπτύσσοντάς τις κάτω από τις ίδιες συνθήκες υποστρώματος και περιβάλλοντος διαπιστώθηκε μεγάλη ποικιλομορφία σε μήκος, πλάτος και παραγωγή διαφραγμάτων, στο είδος και την ένταση της χρωστικής, στην παρουσία ή όχι σποριοδοχείων και σκληρωτίων ακόμη και ανάμεσα σε ανακαλλιέργειες από την ίδια μονόσπορη.

Οι φυσιολογικές φυλές (formae speciales) του *F. oxysporum* μπορούν περαιτέρω να υποδιαιρεθούν σε φυλές (races) με βάση την παθογένεια μίας απομόνωσης σε συγκεκριμένη καλλιέργεια ξενιστή.



Κατάλογοι φυσιολογικών φυλών έχουν δοθεί από τους Armstrongs (1968) και τον Booth (1971). Και αναφέρονται στον πιν.1

**Πίνακας 1. Φυσιολογικές φυλές (ειδικές μορφές) του μύκητα *F. oxysporum***

Φυσιολογική φυλή	Ξενιστής
<i>F.oxysporum</i> f.sp <i>albedinis</i>	Φοίνικας
<i>F.oxysporum</i> f.sp <i>asparagi</i>	Σπαράγγι
<i>F.oxysporum</i> f.sp <i>batatas</i>	Γλυκοπατάτα
<i>F.oxysporum</i> f.sp <i>betae</i>	Ζαχαρότευτλο
<i>F.oxysporum</i> f.sp <i>callistephi</i>	Άστερ
<i>F.oxysporum</i> f.sp <i>cannabis</i>	Κάναβης
<i>F.oxysporum</i> f.sp <i>carthami</i>	Κάρδαμο
<i>F.oxysporum</i> f.sp <i>chrysanthemi</i>	Χρυσάνθεμο
<i>F.oxysporum</i> f.sp <i>ciceri</i>	Ρεβίθι
<i>F.oxysporum</i> f.sp <i>cubense</i>	Μπανανιά
<i>F.oxysporum</i> f.sp <i>radicis-cucumerinum</i>	Αγγούρι
<i>F.oxysporum</i> f.sp <i>cumini</i>	Κύμινο
<i>F.oxysporum</i> f.sp <i>dianthi</i>	Γαρύφαλλο
<i>F.oxysporum</i> f.sp <i>elaeidis</i>	Φοίνικας
<i>F.oxysporum</i> f.sp <i>fabae</i>	Κουκιά
<i>F.oxysporum</i> f.sp <i>fragariae</i>	Φράουλα
<i>F.oxysporum</i> f.sp <i>lathyri</i>	Λάθυρος
<i>F.oxysporum</i> f.sp <i>lentis</i>	Φακή
<i>F.oxysporum</i> f.sp <i>lini</i>	Λινάρι
<i>F.oxysporum</i> f.sp <i>lupini</i>	Λούπινο
<i>F.oxysporum</i> f.sp <i>lycopersici</i>	Τομάτα
<i>F.oxysporum</i> f.sp <i>melonis</i>	Πεπόνι
<i>F.oxysporum</i> f.sp <i>marcissi</i>	Νάρμισσος
<i>F.oxysporum</i> f.sp <i>niveum</i>	Καρπούζι
<i>F.oxysporum</i> f.sp <i>perniciosum</i>	Μιμόζα
<i>F.oxysporum</i> f.sp <i>pisi</i>	Μπιζέλι
<i>F.oxysporum</i> f.sp <i>phaseoli</i>	Φασόλι
<i>F.oxysporum</i> f.sp <i>radicis-lycopersici</i>	Τομάτα
<i>F.oxysporum</i> f.sp <i>raphani</i>	Σταυρανθή
<i>F.oxysporum</i> f.sp <i>spinaciae</i>	Σπανάκι
<i>F.oxysporum</i> f.sp <i>vaninsectum</i>	Βαμβάκι

#### 1.3.4. Εξάπλωση της ασθένειας

Οι περισσότερες φυσιολογικές φυλές του μύκητα *F. oxysporum* παραμένουν σε λήθαργο ως χλαμυδοσπόρια σε ιστούς του ξενιστή μέχρι να υπάρξουν οι κατάλληλες συνθήκες βλάστησης. Η αρχική διέγερση για την βλάστηση των σπορίων μπορεί να γίνει από γειτονικές προσβεβλημένες ή μη, ρίζες φυτών ή μετά από επαφή με τμήματα νεοαποικισμένων φυτικών υπολειμμάτων.

Μετά την βλάστηση των χλαμυδοσπορίων, τα κονίδια και τα νέα χλαμυδοσπόρια σχηματίζονται σε υφές. Η διείσδυση τους στον ξενιστή επιτυγχάνεται είτε μέσω πληγών, είτε απευθείας. Σε κάποια φυτά είναι απαραίτητη η ύπαρξη πληγών πριν από τη μόλυνση, όπως στις γλυκοπατάτες, στον καπνό και στην μπανάνα. Εάν οι κεντρικές ρίζες είναι τραυματισμένες με τρόπο ώστε να εκτίθενται τα αγγεία του ξύλου, ο μύκητας μπορεί να εγκατασταθεί σε αυτά εντός δύο ημερών ή λιγότερο. Το ίδιο αποτέλεσμα επιτυγχάνεται όταν αιώρημα σπορίων του παθογόνου εγχύνεται στην παθούσα περιοχή ή όταν πληγωμένες ρίζες αναπτύσσονται σε μολυσμένο έδαφος. Πληγές της κεντρικής ρίζας οι οποίες δεν φθάνουν στα αγγεία του ξύλου δεν επιτρέπουν τη είσοδο του μύκητα. Αυτό, σημαίνει ότι υγιείς ρίζες των φυτών δεν μολύνονται. (Stover, 1962).

Έχει παρατηρηθεί, ότι το Forl έχει την ικανότητα να καταστρέφει τους παρεγχυματικούς ιστούς νεαρών ριζών και να επεκτείνεται στο βλαστό σε περιορισμένη απόσταση. Τα αγγεία των προσβεβλημένων φυτών δείχνουν σαν να έχουν προσβληθεί από ασθένειες σήψης. (charest et al., 1984).

Γενικά, όταν μία φυσιολογική φυλή του μύκητα *F.oxysporum* έχει διεισδύσει σε ένα κατάλληλο ξενιστή ο μύκητας μεταφέρεται στις ηθμαγγειώδης δεσμίδες. Όταν οι νέες ρίζες είναι στη φάση της μόλυνσης, ο μύκητας μεταφέρεται είτε ενδοκυτταρικά είτε μεσοκυτταρικά στα αναπτυσσόμενα αγγεία του ξύλου και εισβάλλει σ' αυτά πριν από την πλήρη ωρίμανσή τους. Όταν υπάρχει μία πληγή γίνεται η κύρια είσοδος του μύκητα στο αγγειακό σύστημα του ξύλου. Ο μύκητας, γενικά εγκλείεται αρχικά στα αγγεία και τις τραχειίδες, μπορεί όμως να εισβάλλει στο παρέγχυμα κατά τα πρώιμα στάδια ανάπτυξης της ασθένειας.

Το παθογόνο είναι διασκορπισμένο στο φυτό σε μορφή μυκηλίου ή κονιδίων, πρωτίστως ως μικροκονίδια, παραγόμενα σε μολυσμένα αγγεία. Όσο η ασθένεια



εξελίσσεται, ο μύκητας προσβάλλει ιστούς παρακείμενους στο ξύλο όπως την εντεριώνη, το κάμβιο, τη βίβλο και τον φλοιό. Σε κάποιες περιπτώσεις, εκτεταμένη αποίκιση έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση ρωγμών και εξωτερικών καρκινωμάτων στο στέλεχος. Όταν η έκφραση των συμπτωμάτων είναι τόσο πολύ σοβαρή το φυτό υποκύπτει στη ασθένεια.

Η θερμοκρασία αποτελεί σημαντικό ρόλο για την εμφάνιση των συμπτωμάτων και την εκδήλωση της ασθένειας. Η άριστη θερμοκρασία της εκδήλωσης της ασθένειας είναι 15-18 °C. (Δημόπουλος, 1995).

Κάποιες φυλές του *Fusarium oxysporum*, είναι αερόβιες, με αποτέλεσμα όταν το έδαφος βρίσκεται σε κορεσμό, να μειώνεται ο πληθυσμός του μύκητα. Σε συνθήκες κορεσμού, ο μύκητας επιβιώνει περισσότερο σε αμμοπηλώδη εδάφη παρά σε πηλώδη. Επίσης υπάρχουν διαφοροποιήσεις όσον αφορά την έκφραση των παθογόνων σε διαφορετικά εδάφη.

Στα κατασταλτικά εδάφη, μια ασθένεια μπορεί να μην εκδηλώνεται ακόμη και κατά την παρουσία του παθογόνου. Η κατασταλτικότητα εξαρτάται από την σαπροφυτική ανταγωνιστικότητα των διαφόρων συστατικών μικροχλωρίδας και άλλων μικροοργανισμών του εδάφους, τα οποία είναι ανταγωνιστικά προς το παθογόνο. (Beckman, 1987).

## **1.4. ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ**

Οι παθογόνοι μύκητες μπορούν να προκαλέσουν σοβαρές ζημιές, ως και ολοκληρωτική καταστροφή σε μια καλλιέργεια. Έτσι λοιπόν επιβάλλεται η αντιμετώπισή τους.

### **1.4.1. Χημική αντιμετώπιση**

Οι πιο συχνοί τρόποι χημικής αντιμετώπισης των εδαφογενών μυκητολογικών ασθενειών είναι:

Απολύμανση του εδάφους με βρωμιούχο μεθύλιο, dazomet, metam sodium κ.α.λ

Επένδυση σπόρων με ειδικά μυκητοκτόνα.

Χρησιμοποίηση ειδικών διασυστηματικών μυκητοκτόνων ανάλογα με τα είδη των φυτοπαθογόνων μυκήτων. Ειδικότερα για τις φουζαριώσεις χρησιμοποιούνται βενζιμιδαζολικά μυκητοκτόνα όπως benomye, carbendazim κ. α. λ.

Τα μυκητοκτόνα εφαρμόζεται με διάφορους όπως:

Στο σπόριο: για την προστασία των νεαρών φυτάρων από παθογόνα που μεταφέρονται με το σπόριο.

Στο έδαφος: Για τον ίδιο σκοπό όπως προηγουμένως

Στο υπέργειο τμήμα των φυτών με ψεκασμό.

Σε προϊόντα μετά τη συγκομιδή: Για την προστασία νωπών φρούτων από παθογόνα που προκαλούν μετασυλλεκτικές σήψεις. Η εφαρμογή γίνεται με ψεκασμούς, επίπαση, εμβάπτιση, εμποτισμό των υλικών συσκευασίας κ.α.

#### **1.4.2. Καλλιεργητικά μέτρα**

Τα καλλιεργητικά μέτρα που συνιστώνται για την καταπολέμηση της φουζαρίωσης είναι τα εξής:

–Η αμειψισπορά, ως καλλιεργητική τεχνική αποσκοπεί κυρίως στη διατήρηση της γονιμότητας του εδάφους και στην έστω προσωρινή στέρηση των φυτοπαράσιτων από τα φυτά – ξενιστές τους.

–Χρησιμοποίηση υγιούς πολλαπλασιαστικού υλικού.

–Εκρίζωση των προσβεβλημένων φυτών, απομάκρυνση και καταστροφή τους με κάψιμο.

–Ρύθμιση συνθηκών περιβάλλοντος των φυτών το μέτρο είναι ιδιαίτερης σημασίας για τις θερμοκηπιακές καλλιέργειες για την παρεμπόδιση ή τον περιορισμό ανάπτυξης της ασθένειας.

–Αποφυγή δημιουργίας πληγών με τα καλλιεργητικά εργαλεία στην περιοχή του λαιμού και των ριζών, απολύμανση εργαλείων με χημικά απολυμαντικά (π.χ. Χλωρίνη, φορμόλη).

–Να αποφεύγεται η μεταχείριση υγιών φυτών μετά από ασθένεια

-Να γίνεται απολύμανση των υποδημάτων σε χημικά διαλύματα(Ηλιόπουλος 2000).

### **1.4.3. Ανθεκτικά φυτά**

Τόσο η δυνατότητα ενός παθογόνου παράγοντα να προσβάλλει κάποιο φυτό, όσο και η ένταση και η έκταση των συμπληρωμάτων και ζημιών, είναι ιδιότητες που καθορίζονται από τον γενετικό κώδικα του φυτού και του φυτοπαράσιτου και επομένως είναι κληρονομούμενες. Για το λόγο αυτό, μέσω της βελτίωσης των φυτών επιδιώκεται η δημιουργία ανθεκτικών ποικιλιών σε διάφορα φυτοπαθογόνα. (Ηλιόπουλος 2001).

Για το *Foxt* υπάρχουν ορισμένες αυθεντικές ποικιλίες που όμως δεν χρησιμοποιήθηκαν ποτέ στο εμπόριο.

### **1.4.4. Βιολογικός έλεγχος**

#### *Βιολογική καταπολέμηση*

Βιολογική καταπολέμηση στη φυτοπαθολογία είναι η μείωση της ποσότητας των μολυσμάτων ή και της παθογόνου δράσης ενός φυτοπαθογόνου, με τη βοήθεια ενός ή περισσότερων βιοτικών παραγόντων (οργανισμών ιών) άλλων από τον άνθρωπο.

Κυρίαρχο ρόλο μεταξύ αυτών των βιοτικών παραγόντων έχουν:

Το ίδιο το φυτό-ξενιστής, που υφίσταται ειδικούς χειρισμούς (γενετικούς, καλλιεργητικούς, επιδράσεις μικροοργανισμών, που αποσκοπούν στην ενίσχυση της ανθεκτικότητας του στο παθογόνο.

Το παθογόνο αίτιο, που είναι και ο στόχος της βιολογικής καταπολέμησης.

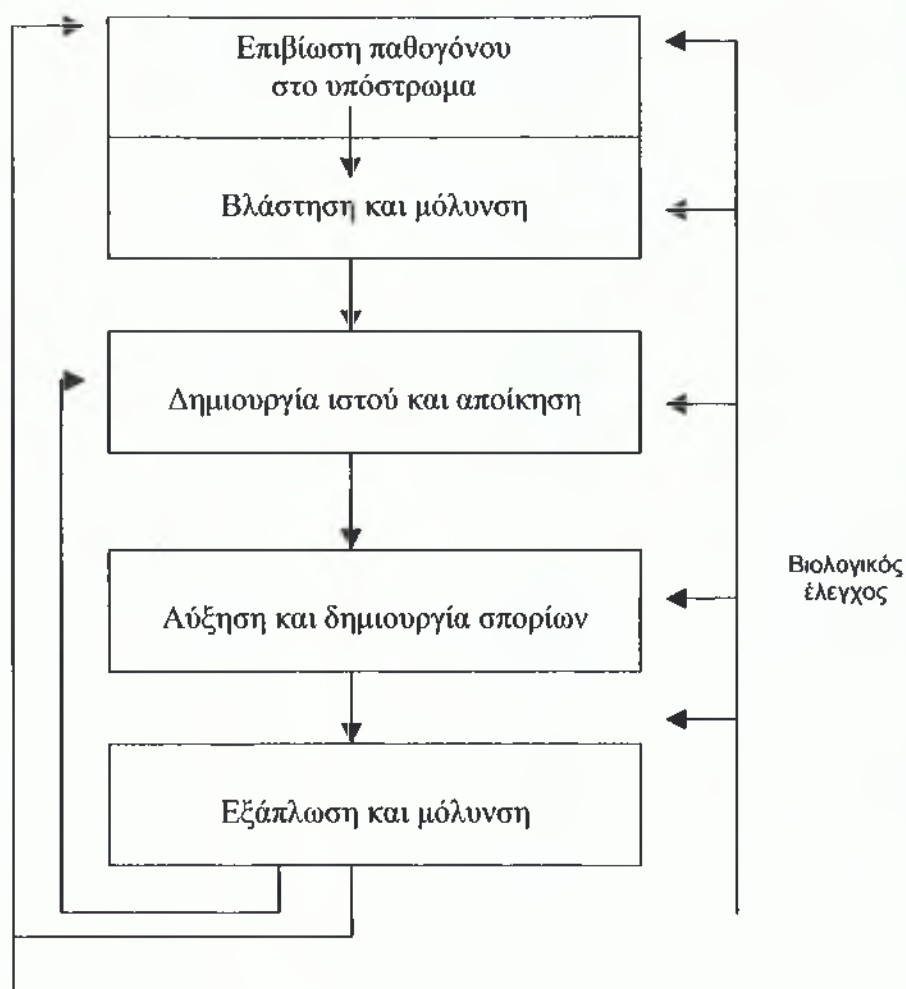
Χαμηλής μολυσματικής ικανότητας (υπομολυσματικά) άτομα ή φυλές του ίδιου είδους με το παθογόνο.

Μικροοργανισμοί – ανταγωνιστές του παθογόνου, που επηρεάζουν την επιβίωση του ή την παθογόνο δράση του.

Στο πίνακα 1. γίνεται αναφορά στα διαδοχικά στάδια εκδήλωσης της παθογένειας και της βιολογικής δράσης στα προσβεβλημένα φυτά.

### Πινάκας 1

Εμφάνιση παθογένειας και δράση του βιολογικού ελέγχου (*Punja & Utkhede 2003*).



Τα διάφορα στάδια εκδήλωσης τη παθογένειας και πως τα προσβεβλημένα φυτά μπορούν να μειώσουν την επέκταση του παθογόνου με βιολογικό έλεγχο.

## 1.5. ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ

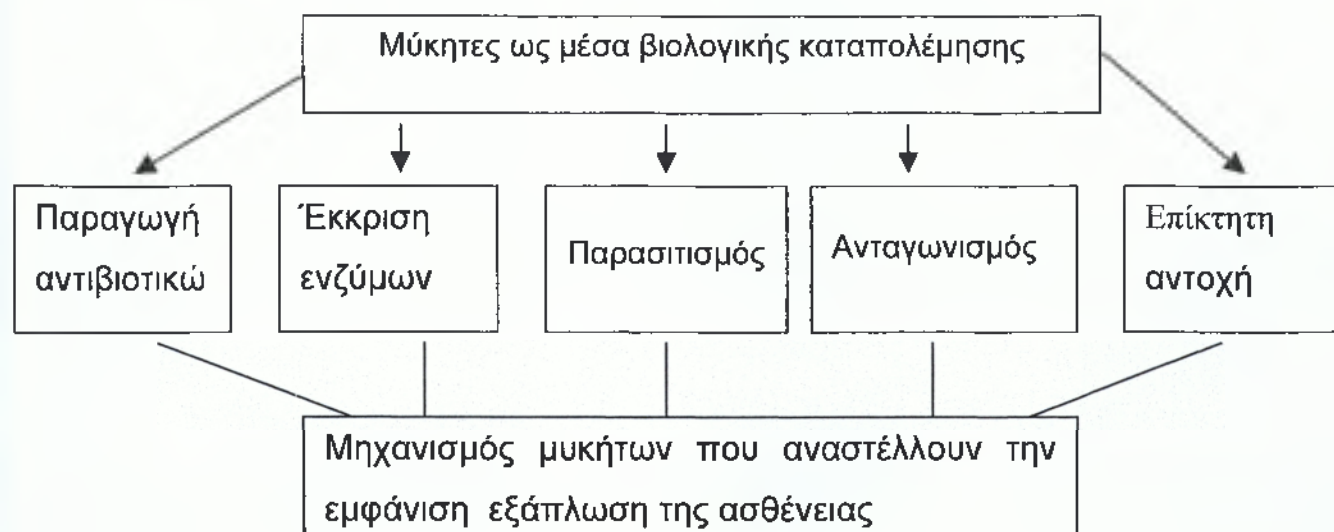
Οι βιολογικοί παράγοντες που χρησιμοποιούνται για την καταστολή των ασθeneιών στη ριζόσφαιρα, βρίσκονται στη ριζόσφαιρα και είναι οι μικροοργανισμοί που αναπτύσσονται σε αυτήν. Η δράση των παθογόνων κατά την πρώτη επαφή τους με την επιφάνεια των υγιών ριζικών συστημάτων και κατά τη διάρκεια της εξάπλωσης τους σε αυτά, εμποδίζεται από τη δράση των ανταγωνιστικών μικροοργανισμών της ριζόσφαιρας.

Η βιολογική δράση των ανταγωνιστικών μικροοργανισμών εξαρτάται από την εδραίωση του πληθυσμού τους στη ριζόσφαιρα, έτσι ώστε να δημιουργούνται οι κατάλληλες συνθήκες για την αντιμετώπιση των παθογόνων του εδάφους. Πολλοί εδαφικοί παράγοντες, όπως η θερμοκρασία, η εδαφική υγρασία, το pH και η περιεκτικότητα της αργίλου, επηρεάζουν την επιβίωση και την εγκατάσταση των μικροοργανισμών και τις αλληλεπιδράσεις τους με το παθογόνο (Weller,1998).

Έχει αποδειχθεί ότι πολλές βιολογικές δραστηριότητες, είναι απαραίτητο να πάρουν μέρος για να επιτευχθεί η βιολογική καταστολή της ασθένειας. Σε αυτές συμπεριλαμβάνονται η ικανότητα αποίκισης του κατάλληλου ξενιστή και η παραγωγή ανταγωνιστικών ενώσεων, όπως αντιβιοτικά, τοξίνες, σιδηροφόροι, αμμωνία, κυανιδίνη, υδρολυτικά ένζυμα και παρασιτισμό (Baker 1968, Lam et al.,1993 Thomashow et. al.,1996)

Στο πιν. 2 γίνεται αναφορά σε μηχανισμούς που παράγουν μύκητες και αναστέλλουν την εμφάνιση και εξάπλωση της ασθένειας

Πίνακας 2



### 1.5.1 Παραγωγή αντιβιοτικών ουσιών

Τα αντιβιοτικά αποτελούν μια χημικά ετερογενή ομάδα οργανικών ενώσεων χαμηλού μοριακού βάρους και μικροβιακής προελεύσεως. Οι χαμηλές συγκεντρώσεις αντιβιοτικών είναι επιβλαβείς στην ανάπτυξη ή στις μεταβολικές δραστηριότητες άλλων μικροοργανισμών συμβάλλοντας στην καταστολή της δράσης των παθογόνων (Fravel, 1988, Thomashow et.al. 1997)

Τα αντιβιοτικά παράγονται στη ριζόσφαιρα πολλών φυτών ξενιστών. Η παραγωγή αντιβιοτικών επηρεάζεται από βιοτικούς παράγοντες όπως το οξυγόνο, η θερμοκρασία, η υγρασία, το pH, οι πηγές άνθρακα και αζώτου και τα μικροστοιχεία. Μεταξύ των βιοτικών παραγόντων που παίζουν καθοριστικό ρόλο στην παραγωγή αντιβιοτικών, είναι το φυτό ξενιστής, το παθογόνο, η μικροχλωρίδα και η πυκνότητα των κυττάρων του παραγόμενου στελέχους.



Ένας άλλος παράγοντας, που επηρεάζει την παραγωγή αντιβιοτικών είναι η ποικίλη έκφραση των γονιδίων που εμπλέκονται στην καταστολή των ασθενειών και στην ελλιπή αποίκιση του φυτού ξενιστή από τον βιολογικό παράγοντα. Τα περισσότερα δεδομένα που αφορούν την παραγωγή αντιβιοτικών από βιολογικούς παράγοντες, αντλούνται από μετρήσεις που εφαρμόζονται *in vitro*. Η Zwittermycin A, είναι ένα αντιβιοτικό το οποίο παράγεται από το *Bacillus cereus* και το *Bacillus thuringiensis* και επηρεάζει αρνητικά την ανάπτυξη και την δραστηριότητα ενός μεγάλου εύρους μικροοργανισμών, συμπεριλαμβανομένου διαφόρων παθογόνων μυκήτων και ειδικότερα τα είδη των *Phytophthora* και *Pythium* (Raaijmakers Vlami και Souza,2002).

### 1.5.2. Τροφικός ανταγωνισμός

Τα περισσότερα θρεπτικά συστατικά στην περιοχή της ριζόσφαιρας προέρχονται από τις εκκρίσεις των ριζών. Μερικά από αυτά τα συστατικά δεν εξυπηρετούν μόνον θρεπτικές ανάγκες, αλλά δρουν και ως σήματα τα οποία ξεκινούν την αλληλεπίδραση μεταξύ φυτών και μικροοργανισμών. Οι περισσότεροι φυτοπαθογόνοι μύκητες βρίσκονται στο έδαφος σε κατάσταση ληθάργου. Μόλυνση επιτυγχάνεται μόνον μετά τη διακοπή του ληθάργου παρουσία των σημάτων ή την διέγερση από τον ξενιστή. Ο βιολογικός παράγοντας μπορεί να προστατεύσει το φυτό με την αποτελεσματική μετακίνηση τέτοιων σημάτων από την ριζόσφαιρα.

Οι μικροοργανισμοί ανταγωνίζονται μεταξύ τους για τροφή και για βασικά θρεπτικά στοιχεία στο έδαφος. Ο ανταγωνισμός μεταξύ των βιολογικών παραγόντων και του παθογόνου με την αποστέρηση των θρεπτικών του συστατικών μπορεί να οδηγήσει στη μείωση της δράσης του παθογόνου. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί ο θρεπτικός ανταγωνισμός για το σίδηρο. Ο σίδηρος βρίσκεται σε άφθονες ποσότητες στο έδαφος, αλλά η ως επί το πλείστον απαντάται στην αδιάλυτη μορφή του, το υδροξείδιο του σιδήρου(Thomashow *et al.* 1996).

Οι Kloerper *et al.*, ήταν οι πρώτοι που απέδειξαν τη σημαντικότητα της παραγωγής σιδηροφόρου, ως μηχανισμού του βιολογικού ελέγχου. Έχει αποδειχθεί ότι οι σιδηροφόροι εμπλέκονται στην καταστολή των *formae speciales* του *Fusarium*



*ochysporum* του *G. graminis* var. *Triticici* και του *Pythium* sp. Επειδή οι σιδηροφόροι απομονώνουν το σίδηρο στη ριζόσφαιρα περιορίζουν τη διαθεσιμότητα του στα παθογόνα και τελικά καταστέλλουν την ανάπτυξή τους.

Η διαθεσιμότητα του σιδήρου στο έδαφος φθίνει λογαριθμικά με την αύξηση του pH του εδάφους. Έτσι η καταστολή του σιδηροφόρου που επάγεται από τα σιδηροφόρα θα έπρεπε να είναι μεγαλύτερη στα ουδέτερα και στα αλκαλικά εδάφη απ' ότι στα όξινα. Τα παθογόνα διαπιστώνεται ότι παρουσιάζουν ευαισθησία στην καταστολή από τους σιδηροφόρους για τους εξής λόγους: α) δεν παράγουν σιδηροφόρους β) δεν έχουν την ικανότητα να χρησιμοποιούν τους σιδηροφόρους που παράγονται από τους ανταγωνιστές ή άλλους μικροοργανισμούς που βρίσκονται στο άμεσο περιβάλλον τους. γ) παράγουν λίγη ποσότητα σιδηροφόρου ή σιδηροφόρο με χαμηλή ανάγκη για σίδηρο από αυτή των ανταγωνιστών, ή δ) παράγουν σιδηροφόρο που μπορεί να χρησιμοποιηθεί από τον ανταγωνιστή, αλλά δεν έχουν την ικανότητα να χρησιμοποιήσουν το σιδηροφόρο που παράγει ο ανταγωνιστής (Weller, 1988).

### 1.5.3 Παρασιτισμός –υδρολυτικά ένζυμα

Ο παρασιτισμός εκδηλώνεται κυρίως με την παραγωγή ενζύμων που προκαλούν λύση των κυττάρων των μυκήτων. Η ιδιότητα αυτή μπορεί να αποτελέσει χρήσιμο εργαλείο στη βιολογική καταπολέμηση παθογόνων μικροοργανισμών. Ένζυμα όπως οι χιτινάσες ή οι γλουκανάσες, παράγονται από τους βιολογικούς παράγοντες, που ευθύνονται για την καταστολή των παθογόνων των φυτών. Αυτά τα ένζυμα έχουν την ιδιότητα να καταλύουν τα πολυσακχαρίδια, τη χητίνη και τη β-γλουκάνη, που είναι βασικά συστατικά των κυτταρικών τοιχωμάτων. Με άλλα λόγια, οι χιτίνες και οι γλουκανάσες είναι ένζυμα που μπορούν να αποδιατάσσουν τα κυτταρικά τοιχώματα.

Η βιοσύνθεση των ενζύμων ως μηχανισμός στη διαδικασία της βιολογικής καταπολέμησης, προάγεται από τους Karat *et al.* (1998) και οι Elad & Karat, (1999), οι οποίοι υποστηρίζουν ότι η βιολογική καταπολέμηση του *B.cinerea* και *T. harzianum* στα φύλλα του φασολιού, οφείλεται στη δράση των προτεασών (ένζυμα)

που παράγονται από το *T.harzianum* και αδρανοποιούν τα υδρολυτικά ένζυμα που παράγονται από τον *B.cinerea*.

#### 1.5.4.Επίκτητη αντοχή

Η επίκτητη αντοχή των φυτών είναι ένας ενεργός μηχανισμός ο οποίος εξαρτάται από φυσικούς ή χημικούς παράγοντες.

Η επαγόμενη αντοχή διακρίνεται σήμερα, στην επαγόμενη διασυστηματική ανθεκτικότητα (Induced Systemic Resistance – ISR) και επίκτητη διασυστηματική αντοχή (Systemic Acquired Resistance- SAR). Η ISR είναι η αντοχή που επάγεται από κάποια αυξητικά ριζοβακτήρια, ενώ η SAR αποτελεί αντίδραση σε τοπική μόλυνση ή σε κάποιο εξασθενημένο παθογόνο, και εκδηλώνεται ως μεταγενέστερη ανθεκτικότητα σε ευρύ φάσμα άλλων παθογόνων.

Η επαγόμενη αντοχή των φυτών ή ανοσοποίηση είναι φαινόμενο μη εξειδικευμένο και χαρακτηριστικό της είναι η βραδύτατη νέκρωση των κυττάρων στη θέση διέγερσης, γεγονός απαραίτητο για την επαγωγή των λανθανόντων μηχανισμών αντοχής στη θέση πρόκλησης (Γζάμος, πανεπιστημιακές παραδόσεις).

Τα πλεονεκτήματα της επαγόμενης αντοχής αναφέρονται κατά τον Kuk (1990) ως εξής:

Πρόκειται για μηχανισμό εξίσου αποτελεσματικό εναντίον μυκητολογικών, βακτηριολογικών και ιολογικών ασθενειών των φυτών.

Βασίζεται στην ενεργοποίηση περισσότερων του ενός κάθε φορά λανθανόντων μηχανισμών άμυνας του ξενιστή, οπότε η διάρκεια της αποτελεσματικότητάς της θεωρείται μεγαλύτερη από εκείνη των μυκητοκτόνων εξειδικευμένης δράσης.

Το φαινόμενο εμφανίζεται διασυστηματικά, σε αντίθεση με τα μυκητοκτόνα μη εξειδικευμένης δράσης που είναι προστατευτικά.

Τα φυτά αντιδρούν ενεργοποιώντας τους μηχανισμούς τους μόνο σε περίπτωση ανάγκης.

Προστατεύει τα ετήσια φυτά καθ' όλη τη διάρκεια του βιολογικού τους κύκλου.

Είναι ακίνδυνο για το περιβάλλον και τον άνθρωπο, επειδή κατά την ανοσοποίηση χρησιμοποιούνται μηχανισμοί που προϋπάρχουν στα φυτά.

Υπάρχει μετάδοση από το υποκείμενο στο εμβόλιο. Οι ανοσοποιημένοι οφθαλμοί όταν εμβολιασθούν σε ευαίσθητα υποκείμενα, θα δώσουν ανοσοποιημένα φυτά.(καπνός,κολοκυνθοειδή).

Ουσίες που απομονώνονται από ανοσοποιημένα φυτά και εφαρμόζονται με ψεκασμό ή αλλιώς σε άλλα φυτά, μπορούν να προκαλέσουν ανοσοποίηση.

Όλα τα φυτά έχουν την ικανότητα να επάγουν ανοχή στις ασθένειες.

Το μειονέκτημα της επαγωγής της ανθεκτικότητας είναι ότι δεν είναι ακόμη οικονομικά ανταγωνίσιμη, με τη χημική καταπολέμηση, αν και η αποτελεσματικότητά της είναι συγκρίσιμη με εκείνη των διασυστηματικών μυκητοκτόνων.

## **1.6. Η ΚΑΛΙΕΡΓΕΙΑ ΤΗΣ ΤΟΜΑΤΑΣ**

### **1.6.1. Βοτανικά χαρακτηριστικά**

Η τομάτα *Solanum Lycopersicum* ή *Lycopersicon esculentum* Miller- ανήκει στην οικογένεια των σολανιδών (*solanaceae*) και έχει βασικό αριθμό χρωματοσωμάτων  $n=12$  και περιλαμβάνει ποικιλίες διπλοειδείς με  $2n=24$  χρωμοσώματα (Κανάκης, 2000).

### **1.6.2. Μορφολογικά χαρακτηριστικά**

Ριζικό σύστημα Η τομάτα έχει πασσαλώδη ρίζα που μπορεί να φθάσει σε βάθος 2 μέτρων, αν και το μεγαλύτερο μέρος της (70%) βρίσκεται στο επιφανειακό στρώμα του εδάφους. Για να αναπτυχθεί όμως η ρίζα με αυτή τη μορφή, θα πρέπει να σπαρεί κατ' ευθείαν στο χωράφι, διαφορετικά με τις μεταφυτεύσεις στις οποίες υπόκεινται, όταν σπέρνεται σε σπορείο, η πασσαλώδης ρίζα καταστρέφεται και το ριζικό σύστημα αποκτά μέλλον θυσανώδη μορφή σαν αποτέλεσμα της ανάπτυξης πολλών πλαγιών ριζών μετά την καταστροφή της πρωτογενούς ρίζας.

Βλαστός Ο βλαστός αποτελείται από αλληλουχία συμποδιακά ενωμένων βλαστών. Μετά το φύτευμα όταν αποκτήσει 6-9 σύνθετα φύλλα αναστέλλει την ανάπτυξη του με την εμφάνιση ταξιανθίας. Τότε από την μασχάλη του νεότερου φύλλου εκπτύσσεται ο οφθαλμός που υπάρχει και παράγεται βλαστός ο οποίος λόγω της ισχυρής ανάπτυξης του παίρνει κατακόρυφη κατεύθυνση, μετά τον σχηματισμό 3 φύλλων, θα παράγει ταξιανθία κ' θα σταματήσει την ανάπτυξη του, όπου θα εκπτυχθεί άλλος οφθαλμός κ.ο.κ Έτσι η αλληλουχία αυτή των συμποδιακά ενωμένων βλαστών δίνει την εντύπωση ενός βλαστού που αναπτύσσεται καθ' ύψος.

Φύλλα Τα φύλλα εμφανίζονται επί των βλαστών εναλλάξ, είναι σύνθετα και αποτελούνται συνήθως από 7,9 και 11 φυλλάκια. Στην επιφάνεια τους, όπως και στους βλαστούς υπάρχουν αδενώδεις τρίχες, οι οποίες θρανόμενες αναδίδουν τη χαρακτηριστική οσμή του φυτού.

Άνθη Τα άνθη είναι ερμαφρόδιτα και φέρονται ανά 4 έως 12 και πλέον σε ταξιανθίες απλές, διχαλωτές ή διακλαδιζόμενες. Ο κάλυκας συνίστανται από 5 ή περισσότερα σέπαλα, η στεφάνη επίσης από 5 ή περισσότερα πέταλα, τα οποία πέφτουν μετά την γονιμοποίηση του άνθους. Οι στήμονες, 5 ή περισσότεροι, είναι μερικώς ενωμένοι στη βάση με τη στεφάνη. Ο ύπερος αποτελείται από πολύχρωρη ωοθήκη με πολλά ωάρια και από βραχύ ή μακρό στύλο, το στίγμα του οποίου στην τελευταία αυτή περίπτωση βγαίνει έξω από τον κώνο των ανθώνων.

Καρπός Είναι πολύχρωρη ράγα με σχήμα που ποικίλλει στις διάφορες ποικιλίες, σφαιροειδές, πιεσμένο στους πόλους ή επίμηκες, με περικάρπιο (σάρκα) χυμώδες κόκκινο και σπόρους πολυάριθμους, δισωοειδείς τραχιάς επιφάνειας ελαιούχους. Η μέση σύνθεση του καρπού είναι: σάρκα και χυμός 96-97%, σπόροι 2-3%, φλοιός 1-2%. Η χημική σύσταση του είναι περίπου 93,5% νερό, 1% αζωτούχες ουσίες, 0,2% λιπαρές ουσίες, 1% κυτταρίνες, 3,5% σάκχαρα και 0,5% τέφρα.

Σπόρος Οι σπόροι της τομάτας είναι πεπλατυσμένοι με σχήμα στρογγυλό ενός νεφροειδές. Η εξωτερική επιφάνεια του περιβλήματος έχει χρώμα καφέ και καλύπτεται από γκριζο χνούδι (Χριστοφιλόπουλος 2000).

## **ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

## 2.1 ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΥΛΙΚΑ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΤΩΝ ΜΥΚΗΤΩΝ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ

Η σύνθεση των θρεπτικών διαλυμάτων, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία, ανά 1lt ήταν η ακόλουθη:

PDB (Potato Dextrose Broth)PDA(Potato Dextrose Agar)/ανά λίτρο	Potato Dextrose Broth (Scharlau Microbiology) 24 gr, Agar-Agar 1,7 % w/v
LB / ανά λίτρο	Casein Hydrolysate 10gr, Yeast Extract 5gr, Nacl 10gr, Agar 1,7%w/v

Όλα τα θρεπτικά υποστρώματα αποστειρώθηκαν σε υγρή αποστείρωση στους 121°C για 20 λεπτά και υπό πίεση 1,1 Atm.

## 2.2 Ο ΠΑΘΟΓΟΝΟΣ ΜΥΚΗΤΑΣ *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis lycopersici*, ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΔΙΑΤΗΡΗΣΗΣ ΚΑΙ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ

Στο πείραμα χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος του μύκητα *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis lycopersici*. CBS 101587 (Central Bureau voor Schimmelcultures, Baam The Netherlands).

Ο μύκητας διατηρούνταν σε θρεπτικό υλικό PDA, (Potato Dextrose Agar) στους 4°C. Για την παραγωγή κονιδίων, καλλιεργούνταν σε θρεπτικό υπόστρωμα PDB (Potato Dextrose Broth), για 4 ημέρες υπό συνεχή ανάδευση στις 150 στροφές/λεπτό και σε θερμοκρασία 25°C. Για την παραγωγή κονιδίων χρησιμοποιήθηκαν υγρές καλλιέργειες του μύκητα σε θρεπτικό υλικό PDB. Η μέτρηση της συγκέντρωσης των κονιδίων γινόταν και εδώ, μετά από διήθηση της καλλιέργειας μέσα από τουλoupάνι και φυγοκέντρωση στις 3000 στρ/λεπτό. Τα κονίδια επαναεωρούντο σε φυσιολογικό ορό (0,85% NaCl) και η συγκέντρωσή τους προσδιορίζονταν με τη χρήση αιματοκυτόμετρου.



### **2.3 ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΤΟΥ ΜΗ ΠΑΘΟΓΟΝΟΥ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ *Fusarium* sp..**

Το μη παθογόνο στέλεχος του μύκητα *Fusarium* sp. που χρησιμοποιήθηκε στο πείραμα έχει απομονωθεί στο (Ινστιτούτο Περιβαλλοντικής Βιοτεχνολογίας Καλαμάτας) και διατηρείται σε στερεό τεχνητό θρεπτικό υλικό PDA (Potato Dextrose Agar) στους 4°C. Για την παραγωγή κονιδίων χρησιμοποιήθηκαν υγρές καλλιέργειες του μύκητα σε θρεπτικό υλικό PDB. Η μέτρηση της συγκέντρωσης των κονιδίων γινόταν και εδώ, μετά από διήθηση της καλλιέργειας μέσα από τουλουπάνι και φυγοκέντρηση στις 3000 στρ/λεπτό. Τα κονίδια επαναεωρούντο σε φυσιολογικό ορό (0,85% NaCl) και η συγκέντρωσή τους προσδιορίζονταν με τη χρήση αιματοκυτόμετρου.

### **2.4 ΦΥΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΧΕΙΡΙΣΜΟΙ ΠΡΙΝ ΤΗ ΣΠΟΡΑ**

Οι σπόροι τομάτας που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα ήταν ποικιλίας ACE55. Μεσοπρώιμη ποικιλία, παραγωγική, κατάλληλη για υπαίθριες καλλιέργειες. Φυτό ζωηρό, μέτριας ανάπτυξης με καρπούς σχεδόν στρογγυλούς λίγο πλατύς, μεγάλου μεγέθους 200-250 gr. (Δημητράκης 1998).

Οι σπόροι πριν την φύτευση τους απολυμάνθηκαν για πέντε λεπτά σε υποχλωριώδες νάτριο (χλωρίνη εμπορίου) 5% και στη συνέχεια ξεπλύθηκαν με απιονισμένο νερό και αφέθηκαν να στεγνώσουν για δέκα λεπτά πάνω σε διηθητικό χαρτί. Σε κάθε γλάστρα όγκου 300cm<sup>3</sup>, τοποθετήθηκαν 7 σπόροι.

### **2.5 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΓΛΑΣΤΡΩΝ**

Φυτοδοχεία χωρητικότητας 300cm<sup>3</sup>, γεμίστηκαν με τύρφη (Peat moss, Sunu Kura, Seda joint-Stock company). Για τη διόρθωση του pH του υποστρώματος προστέθηκε CaCO<sub>3</sub> σε τελική συγκέντρωση 2% κ.β. Η τύρφη εμπλουτίστηκε με



θρεπτικά στοιχεία N-P-K, με προσθήκη λιπάσματος 20-20-20 και σε ποσότητα 0,32 gr/ φυτοδοχείο.

## 2.6 ΘΡΕΠΤΙΚΟ ΔΙΑΛΥΜΑ ΦΥΤΩΝ

Η σύνθεση του θρεπτικού διαλύματος σε 1lt απιονισμένου νερού ήταν η ακόλουθη:

### Θρεπτικό διάλυμα φυτών

MgSO <sub>4</sub> .7M <sub>2</sub> O	0,2gr/lt
KM <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,27gr/lt
KNO <sub>3</sub>	0,2gr/lt
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,1gr/lt
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .4M <sub>2</sub> O	0,7gr/lt
Fe EDTA	0,025gr/lt
Διαλύματα ιχνοστοιχείων	0,015% κ.ο.

### Διάλυμα ιχνοστοιχείων

M <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	7,5gr/lt
MnCl .4H <sub>2</sub> O	6,7gr/lt
CuCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,37gr/lt
MoO <sub>3</sub>	0,15gr/lt
ZnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	1,18gr/lt

Τα φυτοδοχεία με τα φυτά ντομάτας ποτίζονταν με το θρεπτικό διάλυμα φυτών μια (1) φορά την εβδομάδα.

## 2.7 ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΑΥΤΟΧΡΟΝΗΣ ΜΟΛΥΝΣΗΣ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ ΤΟΜΑΤΑΣ ΜΕ ΣΤΕΛΕΧΗ ΤΟΥ ΠΑΘΟΓΟΝΟΥ ΜΥΚΗΤΑ *F.oxysporum* f.sp. *radicis lycopersici* (FORL) ΚΑΙ ΤΟΥ ΜΗ ΠΑΘΟΓΟΝΟΥ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ *Fusarium* sp.

Πριν από την μόλυνση με το φυτοπαθογόνο και το μη παθογόνο Φουζάριο οι γλάστρες τοποθετήθηκαν στο θάλαμο επώασης στους 25°C. Μετά από την μόλυνση η θερμοκρασία του θαλάμου ανάπτυξης των φυτών ρυθμιστική στους 18°C που είναι η ιδανική θερμοκρασία ανάπτυξης του μύκητα FORL. Οι 30 γλάστρες χωρίστηκαν σε 6 ομάδες, όπου η κάθε ομάδα αποτελείτο από 5 γλάστρες. Σε κάθε γλάστρα, η οποία συνιστούσε και από μια επανάληψη, υπήρχαν από 7 φυτά. Τα φυτοδοχεία τοποθετήθηκαν στον θάλαμο σε συγκεκριμένες θέσεις οι οποίες προέκυψαν μετά από τυχαιοποίηση. Η πρώτη ομάδα όπου δεν έγινε μόλυνση με το μη παθογόνο χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας.

Στις υπόλοιπες ομάδες έγιναν οι εξής επεμβάσεις:

Η δεύτερη ομάδα φυτοδοχείων εμβολιάστηκε με το μη παθογόνο Φουζάριο σε τελική συγκέντρωση κονιδίων στο υπόστρωμα ανάπτυξης των φυτών (τύρφη)  $10^2/\text{cm}^3$ .

Η τρίτη ομάδα φυτοδοχείων εμβολιάστηκε με το μη παθογόνο Φουζάριο σε τελική συγκέντρωση κονιδίων στο υπόστρωμα ανάπτυξης των φυτών (τύρφη)  $10^3/\text{cm}^3$ .

Η τέταρτη ομάδα φυτοδοχείων εμβολιάστηκε με το μη παθογόνο Φουζάριο σε τελική συγκέντρωση κονιδίων στο υπόστρωμα ανάπτυξης των φυτών (τύρφη)  $10^4/\text{cm}^3$ .

Η πέμπτη ομάδα φυτοδοχείων εμβολιάστηκε με το μη παθογόνο Φουζάριο σε τελική συγκέντρωση κονιδίων στο υπόστρωμα ανάπτυξης των φυτών (τύρφη)  $10^5/\text{cm}^3$ .

Η έκτη ομάδα φυτοδοχείων εμβολιάστηκε με το μη παθογόνο Φουζάριο σε τελική συγκέντρωση κονιδίων στο υπόστρωμα ανάπτυξης των φυτών (τύρφη)  $10^6/\text{cm}^3$ .

Ταυτόχρονα με την εμβολιασμό με το μη παθογόνο Φουζάριο πραγματοποιήθηκε μόλυνση των φυτών με το παθογόνο (FORL) σε τελική συγκέντρωση κονιδίων  $10^5$  ανά  $\text{cm}^3$  τύρφης.

Μετά την μόλυνση τα φυτοδοχεία ποτίζονταν μια φορά την εβδομάδα με θρεπτικό διάλυμα φυτών (όπως αναφέρεται στην παράγραφο 2.6.) και καθημερινά με νερό βρύσης υπόστρωμα στο αρχικό τους βάρος. Ένα μήνα μετά τον εμβολιασμό με το παθογόνο, παρουσιάστηκαν οι πρώτοι θάνατοι των φυτών. Στην συνέχεια ανά τακτά χρονικά διαστήματα καταγράφονταν οι θάνατοι των φυτών.

## **2.8 ΠΑΡΑΛΑΒΗ ΕΞΑΝΤΛΗΜΕΝΟΥ ΘΡΕΠΤΙΚΟΥ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΟΣ (Ε.Θ.Υ.) ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΤΟΥ ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΥ ΣΤΑ ΠΑΘΟΓΟΝΑ ΜΥΚΗΤΑ *Fusarium* sp**

Το μη παθογόνο στέλεχος του μύκητα *Fusarium* sp. καλλιεργούνταν υπό ανακίνηση (140 στρ/μίν) σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα PDB, στους  $25^\circ\text{C}$  για 4 ημέρες. Το εξαντλημένο θρεπτικό υλικό του μη παθογόνου, λαμβανόταν με σούρωμα με τουλουπάνι και απομάκρυνση της μυκηλιακής βιομάζας. Ακολουθούσε αποστείρωση στους  $121^\circ\text{C}$  για 20 min και στις 1,1 Atm.

## **2.9 ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΟΥ ΕΞΑΝΤΛΗΜΕΝΟΥ ΘΡΕΠΤΙΚΟΥ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΟΣ ΤΟΥ *Fusarium* spp. ΑΝΑ ΤΑΚΤΑ ΧΡΟΝΙΚΑ ΔΙΑΣΤΗΜΑΤΑ ΣΕ ΦΥΤΑ ΤΟΜΑΤΑΣ, ΤΑ ΟΠΟΙΑ ΜΟΛΥΝΘΗΚΑΝ ΜΕ ΤΟΝ ΜΥΚΗΤΑ *F.oxysporum* f.sp. *radicis lycopersici* (FORL)**

Για να διαπιστωθεί, εάν το εξαντλημένο θρεπτικό υπόστρωμα του *Fusarium* spp., επιδρά στην καταστολή της ασθένειας που προκαλείται από το FORL σε φυτά τομάτας, πραγματοποιήθηκε η εξής διαδικασία:

Φυτοδοχεία με φυτάρια ντομάτας τα οποία ετοιμάστηκαν όπως αναφέρθηκε σε προηγούμενες παραγράφους τοποθετήθηκαν στο θάλαμο επώασης όπου υπήρχε

φωτοπερίοδος 16 ωρών και θερμοκρασία 25°C. Όταν τα φυτάρια ντομάτας έφτασαν στο στάδιο του ενός πραγματικού φύλου μολύνθηκαν με το παθογόνο. Για την μόλυνση χρησιμοποιήθηκαν κονίδια τα οποία ελήφθησαν όπως αναφέρεται σε προηγούμενες παραγράφους. Η τελική συγκέντρωση των κονιδίων ήταν 10<sup>5</sup> κονίδια ανά cm<sup>3</sup> τύρφης. Από το σημείο αυτό και μετά η θερμοκρασία του θαλάμου ανάπτυξης των φυτών ρυθμίσθηκε στους 18°C.

Οι 40 γλάστρες χωρίσθηκαν σε 7 ομάδες σε κάθε μια από τις οποίες γινόταν διαφορετική επέμβαση. Κάθε γλάστρα, η οποία περιείχε από 7 φυτά, αποτελούσε μια επανάληψη. Η πρώτη και δεύτερη ομάδα χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες. Η πρώτη ομάδα (Control H<sub>2</sub>O) ποτιζόταν κατά τις μέρες που γινόταν οι χειρισμοί με το Ε.Θ.Υ. με νερό ενώ η δεύτερη (Control PDB) με θρεπτικό διάλυμα PDB. Οι υπόλοιπες πέντε ομάδες ποτιζόνταν ανά εβδομάδα με 10ml εξαντλημένου θρεπτικού υποστρώματος (Ε.Θ.Υ.). Πριν από την εφαρμογή του Ε.Θ.Υ. γινόταν ρύθμιση του pH στην τιμή 6,5 με την βοήθεια διαλύματος ΚΟΗ κανονικότητας 1 N. Ακολούθησε καταγραφή των θανάτων των φυτών σε τακτά χρονικά διαστήματα.

## **ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ- ΣΥΖΗΤΗΣΗ**

### 3.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Στην παρούσα εργασία, χρησιμοποιήθηκε το μη παθογόνο στέλεχος του μύκητα *Fusarium* sp. το οποίο απομονώθηκε από ρίζες φυτών ντομάτας (*Lycopersicon esculentum*) τα οποία είχαν μεγαλώσει σε compost που παρασκευάστηκε στο Ινστιτούτο Περιβαλλοντικής Βιοτεχνολογίας από στέμφυλα και πυρηνόξυλο ελιάς. Η αναγνώριση του μύκητα έγινε με προσδιορισμό της αλληλουχίας του 18s rDNA γονιδίου και της περιοχής. Από προκαταρκτικά πειράματα που έγιναν στο ίδιο Ινστιτούτο δείχθηκε ότι το συγκεκριμένο στέλεχος Φουζαρίου έχει την ικανότητα να προστατεύει φυτά ντομάτας από τον φυτοπαθογόνο μύκητα *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis lycopersici*. Στα πειράματα αυτά είχε γίνει εμβολιασμός με το μη παθογόνο στέλεχος μια περίπου εβδομάδα πριν από την μόλυνση με το παθογόνο.

Είχε ενδιαφέρον ότι το μη φυτοπαθογόνο στέλεχος Φουζαρίου είχε την ικανότητα να προστατεύει σε συγκεντρώσεις κονιδίων, κατά τον εμβολιασμό, που ξεκινούσαν από  $10^3$  κονίδια/cm<sup>3</sup> τύρφης ενώ η συγκέντρωση του παθογόνου ήταν  $10^5$  κονίδια/cm<sup>3</sup>. Επιπλέον είχε δείχθει ότι φυτά ντομάτας τα οποία μεγάλωναν σε τύρφη εμβολιασμένη με το μη παθογόνο μύκητα ανέπτυσαν ανθεκτικότητα στο παθογόνο των φύλλων *Septoria lycopersici* (Καβρουλάκης, αδημοσίευτα αποτελέσματα).

Στην περίπτωση δηλαδή αυτή το παθογόνο και το ανταγωνιστικό στέλεχος δεν είχαν άμεση επαφή. Το γεγονός αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η προστασία που προσφέρεται από το μη παθογόνο φουζάριο έχει να κάνει με ενεργοποίηση ενδογενών μηχανισμών άμυνας του φυτού δηλαδή με επαγόμενη ανθεκτικότητα.

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν:

(α) να διαπιστωθεί εάν διατηρείται η ικανότητα του μη παθογόνου μύκητα να δρα ανασταλτικά ως προς την εκδήλωση της Φουζαρίωσης όταν τα φυτά ντομάτας εμβολιάζονται ταυτόχρονα με το παθογόνο και το μη παθογόνο στέλεχος και

(β) να διερευνηθεί ο μηχανισμός με τον οποίο προστατεύει το μη παθογόνο στέλεχος Φουζαρίου και συγκεκριμένα εάν αυτό γίνεται με έκκριση μεταβολιτών οι οποίοι δρουν παρεμποδιστικά στην εκδήλωση των ασθενειών.

### 3.2 ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΕΝΔΟΦΥΤΙΚΟΥ ΜΗ ΠΑΘΟΓΟΝΟΥ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ *Fusarium* sp. ΝΑ ΠΡΟΣΤΑΤΕΥΕΙ ΦΥΤΑ ΝΤΟΜΑΤΑΣ ΉΝΑΝΤΙ ΤΟΥ *F.oxysporum* f.sp. *radicis lycopersici* ΣΕ ΤΑΥΤΟΧΡΟΝΗ ΜΟΛΥΝΣΗ

Για να διερευνηθεί εάν το ανταγωνιστικό ενδοφυτικό μη παθογόνο στέλεχος *Fusarium* sp. μπορεί, σε ταυτόχρονη μόλυνση, να αναστείλει τη δράση του μύκητα *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis lycopersici* σε φυτά τομάτας, ακολούθηθηκε η παρακάτω διαδικασία. Φυτά ντομάτας που αναπτύσσονταν σε τύρφη, όπως αναφέρεται στο σχετικό κεφάλαιο των «ΥΛΙΚΩΝ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΩΝ», μολύνονταν με κονίδια του μύκητα *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis lycopersici* σε τελική συγκέντρωση  $10^5$  κονίδια/cm<sup>3</sup> τύρφης.



Εικόνα 1. Φυτά τομάτας σε θάλαμο ανάπτυξης





**Εικόνα 2. Φυτά τομάτας στο στάδιο μόλυνσης**

Η μόλυνση έγινε στο στάδιο όπου εμφανίσθηκε το πρώτο πραγματικό φύλλο στα φυτά ντομάτας (εικ.2). Ταυτόχρονα με την μόλυνση με το παθογόνο πραγματοποιήθηκε εμβολιασμός της τύρφης με κονίδια του μη παθογόνου Φουζαρίου. Στο σχεδιασμό του πειράματος χρησιμοποιήθηκε το πειραματικό σχέδιο των τυχαιοποιημένων πλήρων ομάδων. Έγιναν έξι διαφορετικές επεμβάσεις όπου χρησιμοποιήθηκαν 6 διαφορετικές συγκεντρώσεις κονιδίων του ανταγωνιστικού μύκητα ( $0, 10^2, 10^3, 10^4, 10^5$  και  $10^6$  κονίδια/cm<sup>3</sup> τύρφης). Σε κάθε επέμβαση πραγματοποιήθηκαν πέντε επαναλήψεις. Σε κάθε επανάληψη-φυτοδοχείο υπήρχαν 7 φυτά ντομάτας.

Περίπου 17 ημέρες μετά την μόλυνση άρχισαν να παρατηρούνται οι πρώτοι θάνατοι φυτών από Φουζάριο.(Εικόνα 3.4.) Από το σημείο αυτό και μετά άρχισαν να γίνεται καταμέτρηση των φυτών που πέθαιναν σε τακτά χρονικά διαστήματα.

Η καταμέτρηση συνεχίσθηκε έως ότου πέθαναν όλα τα φυτά στα οποία δεν είχαν εμβολιασθεί με το ανταγωνιστικό στέλεχος του μύκητα, επέμβαση που αποτέλεσε και τον μάρτυρα.

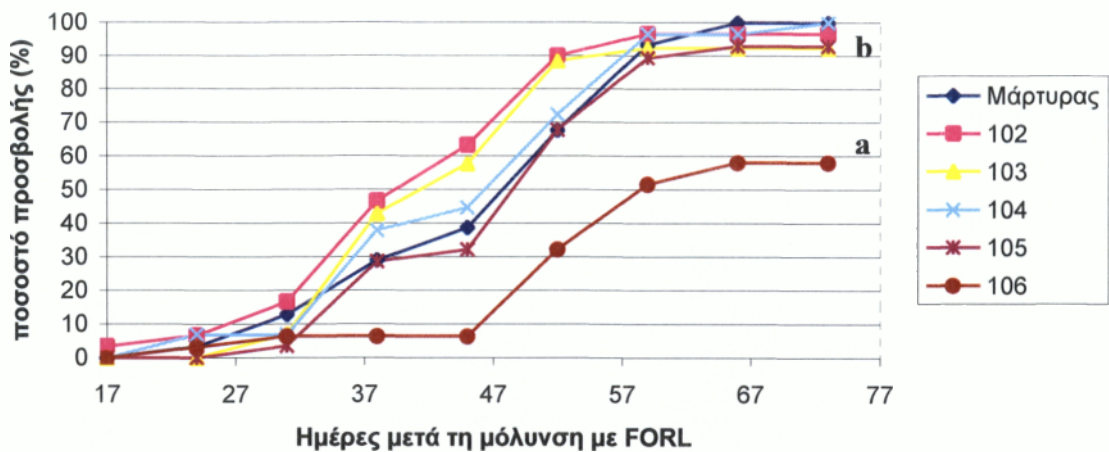
Η στατιστική επεξεργασία των δεδομένων έγινε με το λογισμικό πρόγραμμα SPSS v.10. Πραγματοποιήθηκε ανάλυση διακύμανσης (ANOVA) και στη συνέχεια έγινε το τεστ πολλαπλών συγκρίσεων (Tukey's - HSD) σε επίπεδο σημαντικότητας  $\alpha < 0.05$  για τη σύγκριση των μέσων των διαφορετικών επεμβάσεων.



Εικόνα 3. Εκδήλωση συμπτωμάτων μαρανσης μετά την μόλυνση



Εικόνα 4. Εκδήλωση συμπτωμάτων μαρανσης μετά την μόλυνση



Γράφημα 1: Επίδραση της δράσης του μη παθογόνου στελεχούς του μύκητα *Fusarium* sp. έναντι στο παθογόνο *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis lycopersici* (FORL) σε φυτά τομάτας με ταυτόχρονη μόλυνση. Στο πείραμα αυτό χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικές συγκεντρώσεις κονιδίων σε κάθε επέμβαση. Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν με Tukey's test. Οι επεμβάσεις που φέρουν κοινά γράμματα δεν παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές.

Κάθε μια από τις καμπύλες του γραφήματος, αντιπροσωπεύει την εξέλιξη των θανάτων των φυτών. Για κάθε μια από τις επεμβάσεις πραγματοποιήθηκαν έξι διαφορετικές συγκεντρώσεις κονιδίων. Μέχρι την 31<sup>η</sup> ημέρα δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στους θανάτους των φυτών μεταξύ των διαφόρων επεμβάσεων.

Από το χρονικό σημείο όμως όπου τα φυτά ντομάτας στα οποία το υπόστρωμα ανάπτυξης τους εμβολιάστηκε με κονίδια του ανταγωνισθεί σε συγκέντρωση  $10^6$  άρχισαν να εμφανίζονται περισσότερο ανθεκτικά στην προσβολή από τον μύκητα *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis lycopersici*. Κατά την στατιστική ανάλυση (Tukey's test) διαπιστώθηκε, όπως άλλωστε φαίνεται στο σχήμα, ότι μεταξύ των επεμβάσεων με  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$  κονίδια/cm<sup>3</sup> τύρφης και του μάρτυρα δεν υπάρχουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές. Η τελευταία επέμβαση ( $10^6$  κονίδια/cm<sup>3</sup> τύρφης) διαφέρει, στατιστικώς σημαντικά, από τις υπόλοιπες επεμβάσεις.

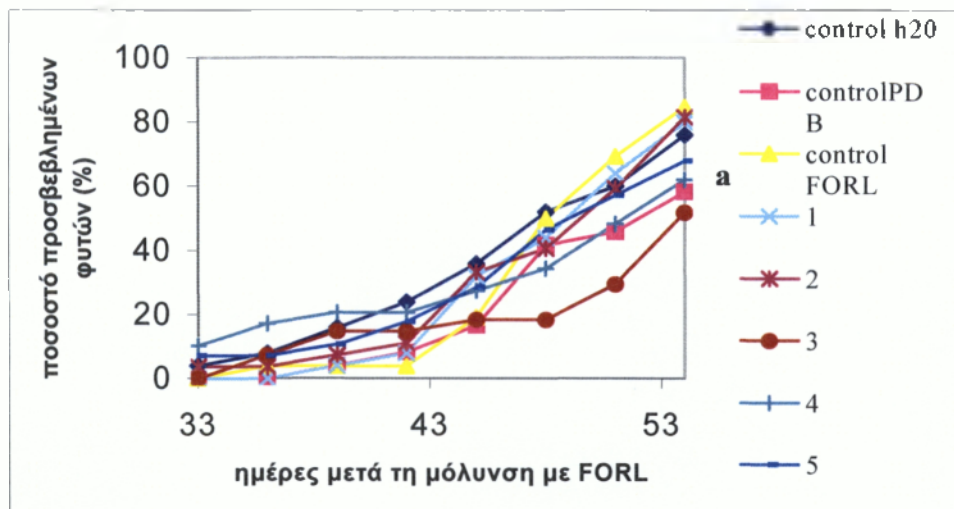
Συμπερασματικά, ο ανταγωνιστής μύκητας *Fusarium* sp. ήταν ικανός να προστατεύει, σε ταυτόχρονη μόλυνση, φυτά ντομάτας από το παθογόνο *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis lycopersici* μονάχα όταν η συγκέντρωση των κονιδίων ήταν  $10^6$  κονίδια/cm<sup>3</sup> τύρφης. Υπενθυμίζεται ότι σε προγενέστερα πειράματα που



πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο μας ο ίδιος μύκητας ήταν ικανός, σε προηγούμενη μόλυνση, ακόμα και σε συγκέντρωση  $10^3$  κονίδια/cm<sup>3</sup>.

### **3.3. ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΕΞΑΝΤΛΗΜΕΝΟΥ ΘΡΕΠΤΙΚΟΥ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΟΣ (ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΟΥ pH ΣΕ ΟΥΔΕΤΕΡΕΣ ΤΙΜΕΣ) ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ *Fusarium* sp. ΣΕ ΦΥΤΑ ΝΤΟΜΑΤΑΣ ΤΑ ΟΠΟΙΑ ΕΙΧΑΝ ΜΟΛΥΝΘΕΙ ΜΕ ΤΟ ΜΥΚΗΤΑ *F.oxysporum* f.sp. *radicis lycopersici***

Σε προηγούμενα πειράματα τα οποία είχαν πραγματοποιηθεί στο Ινστιτούτο Περιβαλλοντικής Βιοτεχνολογίας είχε διερευνηθεί η πιθανότητα το υπό εξέταση μη παθογόνο στέλεχος *Fusarium* sp να εμποδίζει την ανάπτυξη του Forl in vitro εκκρίνοντας κάποιους μεταβολίτες. Για τον σκοπό αυτό είχε σχεδιασθεί πείραμα όπου εξαντλημένο θρεπτικό υπόστρωμα (Ε.Θ.Υ.) PDB, μετά από καλλιέργεια του συγκεκριμένου στελέχους, χρησιμοποιήθηκε προκειμένου σε ποτίσματα φυτών ντομάτας προκειμένου να ελεγχθεί εάν μπορεί να δρα επισχετικά στον μύκητα *F.oxysporum* f.sp. *radicis lycopersici*. Στα πειράματα αυτά παρατηρήθηκε ότι όχι μόνο το Ε.Θ.Υ. δεν είχε καμία επισχετική δράση, ανάλογη αυτής του μη παθογόνου *Fusarium* sp., αλλά ότι αντίθετα συνέβαλε στην ταχύτερη εμφάνιση συμπτωμάτων της ασθένειας η οποία προκαλείται από το FORL (Καβρουλάκης, αδημοσίευτα αποτελέσματα). Ενδιαφέρον παρουσίασε το γεγονός ότι το εξαντλημένο θρεπτικό υπόστρωμα είχε πολύ χαμηλό pH (περίπου 3). Μια υπόθεση που είχε γίνει ήταν ότι αυτό καθαυτό το χαμηλό pH του Ε.Θ.Υ. είναι υπεύθυνο για την εμφάνιση ενίσχυση της δράσης του FORL. Στην παρούσα εργασία επαναλήφθηκε, ουσιαστικά, το αρχικό αυτό πείραμα αυτή την φορά όμως διορθώνοντας την τιμή του pH σε ουδέτερες τιμές (γύρω στο 6,5).



Γράφημα 2: Επίδραση της δράσης του εξαντλημένου θρεπτικού υποστρώματος (Ε.Θ.Υ.) *Fusarium* sp. σε φυτά τομάτας τα οποία μολύνθηκαν με τον μύκητα *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis lycopersici*. Οι καμπύλες του γραφήματος αντιπροσωπεύουν τις ομάδες των φυτών στις οποίες έγιναν οι συγκεκριμένες επεμβάσεις με το εξαντλημένο θρεπτικό υπόστρωμα του ενδοφυτικού *Fusarium* sp. όπως αναφέρεται στον παραπάνω πίνακα. Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν με Tukey's test. Οι επεμβάσεις που φέρουν κοινά γράμματα δεν παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές.

Τα φυτά της ντομάτας ποτίστηκαν με Ε.Θ.Υ (με διορθωμένο pH) όπως περιγράφεται πίνακα της παραγράφου 2.9 στο κεφάλαιο των «ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ». Όπως φαίνεται στον σχεδιάγραμμα δεν παρατηρήθηκε καμιά ιδιαίτερη επίδραση της παρουσίας του Ε.Θ.Υ. στη πορεία των θανάτων των φυτών ντομάτας από FORL. Το εξαντλημένο θρεπτικό υπόστρωμα, με το διορθωμένο pH, δεν εμφανίζεται να έχει επισχετική δράση έναντι του FORL αλλά και ούτε εμφανίσθηκε να ενισχύει τα συμπτώματα της ασθένειας όπως στο προηγούμενο πείραμα όπου χρησιμοποιήθηκε Ε.Θ.Υ. με μη διορθωμένο pH.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Agrios G. 1997 – Plant Pathology. Academic Press. London
- Baker R. 1968. Mechanisms of biological control of soil- borne pathogens. Annual Review of phytopathology **6**: 263-294.
- Βενιεράκη Α.Σ. , και Τζάμος Ε. Κ. , 1994. Παρουσία και διάδοση των φυλών του μύκητα *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* στην Ελλάδα. 7<sup>ο</sup> Πανελλήνιο φυτοπαθολογικό συνέδριο, Αθήνα ..34.
- Benhamou, N. *et al.* 1999. Treatment with the mycoparasite *Pythium oligandrum* triggers induction of defence-related reactions in tomato roots when challenged with *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis lycopersici*. *Phytopathology* **87**: 108-122.
- Γεωργόπουλος Σ.Γ. 1984 Βασικές γνώσεις Φυτοπαθολογίας. Αθήνα.
- Δημητράκης Κ.Γ. 1998 Λαχανοκομία . Αθήνα. Εκδόσεις Αγροτύπος.
- Δημόπουλος Β. 1995. Σημειώσεις Φυτοπροστασίας Ανθοκηπευτικών. ΤΕΙ Καλαμάτας.
- Ηλιόπουλος Α.Γ. 2001 Ολοκληρωμένη Φυτοπροστασία 1 Καλαμάτα.
- Ηλιόπουλος Α.Γ. 2000 Οι ασθένειες των φυτών. Καλαμάτα.
- Harman , G.E. 2000. Myths and dogmas of biocontrol –changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. *Plant Dis.* **84**: 377-393.
- Κανάκης Γ.Α. 2000 Μαθήματα Γενικής Λαχανοκομίας. Καλαμάτα.
- Κανάκης Γ.Α. 2002 Πρόχειρες σημειώσεις ειδικής Λαχανοκομίας υπαίθρου. Καλαμάτα.
- Lorito, M. 1996. Synergising interaction between cell wall degrading enzymes and membrane affecting compounds. *Mol. Plant Microbe Interact* **9**: 206-213.
- Lucas, J. A. 1998. Plant pathology and plant pathogens. Blackwell science oxford.



Lumsden, R.D. 1996. Development of *Gliogladium virens* for damping-off disease control. *Can.j. Plant Pathology* **18**: 463-468.

Mathre, M.E. 1999. From discovery to use- traversing the world of commercializing biocontrol agents for plant disease control. *Plant disease* **83**: 972-983.

Radijmakers J.M. V. , M. and de Souza, J.T.. 2002 Antibiotic production by biocontrol . *Antonie van Leenwenhoek* **81**: 537-547.

Τζάμος Σ.Ε. 2001. Βιοχημικοί παράγοντες ανταγωνιστών μικροοργανισμών που υπεισέρχονται στην βιολογική αντιμετώπιση των αδρομυκώσεων στα φυτά. Μεταπτυχιακή μελέτη Γ.Π.Α.

Thomashow , L.S. and Weller D.M. 1996. Mechanisms and antifungae metabolites in plant- microbe interactions vol.1 eds: Stacy G, Keen N.T.

Χριστοφιλόπουλος Ν.Ι. 2000 Σημειώσεις Λαχανοκομίας 2. Καλαμάτα.

Walker , T.S., Bais, H. P., Grotewold, E., Vivanco, J.M. 2003. Plant physiology **132**:44-51.

Weller, D.M. 1998. Biological control of soil borne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Ann. Rev. Phytopathology* **26**: 379-407.

Punja Z.K. and Utkhede.R.S. 2003 Using fungi and yeasts to manage vegetable crop diseases. September. *Trends in Biotechnology* **21**: 400-401.