

**ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ (Τ.Ε.Ι.)  
ΚΑΛΑΜΑΤΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΘΕΡΜΟΚΗΠΙΑΚΩΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ  
& ΑΝΘΟΚΟΜΙΑΣ**

**Βακτηριακά στελέχη με ανταγωνιστική δράση σε παθογόνα  
φυτών και ο ρόλος των εκκρινόμενων μεταβολιτών**

**Λαμπρούλη Μαρία**

**Επιβλέπων καθηγητής: Καβρουλάκης Νεκτάριος**

**Καλαμάτα 2005**

## Ευχαριστίες

Για την ολοκλήρωση της συγκεκριμένης πτυχιακής εργασίας, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους όσους με βοήθησαν:

Ευχαριστώ πολύ τον επιβλέποντα καθηγητή μου Δρ. Καβρουλάκη Νεκτάριο για την καθοδήγησή του κατά τη διάρκεια του πειράματος, καθώς και για τις γνώσεις που μου μετέδωσε.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τους γονείς μου Βασίλη και Μαριάννα για την ψυχολογική υποστήριξη τους, την αδελφή μου Ιωάννα και τα ξαδέλφια μου Ντόρα και Χρήστο για την έμπρακτη βοήθειά τους. Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω τους φίλους μου Παναγιώτη και Χριστίνα για την συμπαράστασή τους.

## Συνομογραφίες

Ε.θ.υ.: Εξαντλημένο θρεπτικό υπόστρωμα

FORL: *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis lycopersici*

## Περιεχόμενα

Περίληψη.....	7
<b>Κεφάλαιο 1<sup>ο</sup></b>	
<b>Εισαγωγή</b>	
1.1. Στοιχεία γενικής φυτοπαθολογίας.....	8
1.1.1. Η έννοια της αστάθειας των φυτών.....	10
1.1.2. Κατάταξη των ασθενειών.....	11
1.1.3. Άλλες φυτοπαθολογικές έννοιες.....	11
1.2. Φουζαρίωση.....	13
1.2.1. Ταξινόμηση.....	13
1.2.2. Συμπτώματα.....	14
1.2.3. Αιτιολογία.....	14
1.2.4. Επιδημιολογία.....	15
1.2.5. Καταπολέμηση της ασθένειας.....	16
1.2.5.1. Χρήση ανθεκτικών ποικιλιών.....	16
1.2.5.2. Χημική καταπολέμηση.....	17
1.2.5.3. Ηλιοαπολύμανση.....	18
1.2.5.4. Βιολογική καταπολέμηση.....	19
1.2.6. Καλλιεργητικά μέτρα.....	20
1.3. Βιολογική καταπολέμηση φυτοπαθογόνων μικροοργανισμών.....	21
1.3.1. Μηχανισμοί δράσης των ανταγωνιστικών βακτηρίων έναντι των φυτοπαθογόνων μικροοργανισμών.....	24
1.3.1.1. Τροφικός ανταγωνισμός (Σιδηροφόροι).....	24
1.3.2. Αντιβίωση και παρασιτισμός.....	26
1.3.2.1. Παραγωγή αντιβιοτικών ουσιών.....	30

1.3.2.2. Ο ρόλος των αντιβιοτικών στο βιολογικό έλεγχο.....	30
1.3.2.3. Εξάπλωση και ανίχνευση των βακτηριακών αντιβιοτικών προϊόντων.....	30
1.3.2.4. Η κατασκευή των αντιβιοτικών παραγόμενων ουσιών .....	31
1.3.2.5. Παρασιτισμός και υδρολυτικά ένζυμα.....	32
1.4. Επαγόμενη ανθεκτικότητα των φυτών ενάντια στις ασθένειες και ο ρόλος των πτητικών ουσιών.....	34
1.4.1. Επίκτητη αντοχή.....	35
1.4.2. Τι είναι σήμα στην επαγόμενη αντοχή των φυτών.....	36
1.4.3. Αμυντικοί μηχανισμοί των φυτών εναντίον ασθενειών.....	37
1.4.4. Φυτοαλεξίνες.....	38
1.4.5.1. Βιοσύνθεση και κατανομή των φυτοαλεξινών.....	39
1.4.6. Σύνθεση της λιγνίνης.....	40
1.4.7. Αντίδραση υπερευπάθειας.....	40
1.4.8. Τοξίνες.....	41
1.4.9. Παραγωγή ενεργού οξυγόνου.....	41
1.4.10. Διεγέρτες της επαγόμενης αντοχής.....	42
1.4.11. Βιοτικοί διεγέρτες.....	42
1.4.11.1. Ολιγοσακχαρίτες.....	42
1.4.11.2. (Γλυκο)πεπτίδια και πρωτεΐνες.....	43
1.4.11.3. Ακόρεστα λιπαρά οξέα.....	43
1.4.11.4. Αμινοξέα.....	43
1.4.11.5. Αιθυλένιο.....	44
1.4.11.6. Διεγέρτες παραγόμενη από ζύμες.....	44
1.4.11.7. Διεγέρτες παραγόμενη από σαπρόφυτα.....	45
1.4.11.8. Συνθετικοί και ημισυνθετικοί διεγέρτες.....	45

1.4.12. Λόγοι απώλειας της απόδοσης ανταγωνιστών.....	46
1.5. Οι Βάκιλοι ως ανταγωνιστικά βακτήρια κατά φυτοπαθογόνων μικροοργανισμών.....	47
1.6. Το <i>Enterobacter cloacae</i> και η ικανότητα του να προστατεύει τα φυτά έναντι παθογόνων μικροοργανισμών.....	48

## Κεφάλαιο 2<sup>ο</sup>

### Υλικά και μέθοδοι

2.1. Διατήρηση του βακτηρίου <i>Enterobacter cloacae</i> και του μύκητα <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp <i>radisis lycopersi</i> .....	52
2.2. Ανάπτυξη του <i>Enterobacter cloacae</i> σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα.....	52
2.3. Απομόνωση του εξαντλημένου θρεπτικού υποστρώματος.....	53
2.4. Συνθήκες ανάπτυξης του <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp <i>radisis lycopersici</i> ....	53
2.5. Συνθήκες ανάπτυξης των φυτών ντομάτας.....	54
2.6. Σχεδιασμός πειράματος.....	55
2.7. Μόλυνση των φυτών με <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp <i>radisis lycopersici</i> .....	57

## Κεφάλαιο 3<sup>ο</sup>

### Αποτελέσματα-Συζήτηση

3.1. Εισαγωγή.....	60
3.2. Επίδραση της εφαρμογής εξαντλημένου θρεπτικού υποστρώματος του <i>Enterobacter cloacae</i> στην καταστολή της Φουζαρίωσης, η οποία προκαλείται από το μύκητα <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp <i>radicis lycopersici</i> .....	61
<b>Βιβλιογραφία.....</b>	<b>64</b>

## Revision

It is a common belief that many of rhizosphere's bacteria have the ability to protect the plant against pathogenic microorganisms. Many different mechanisms have been proposed in order to explain the phenomenon that was mentioned before. The suggested mechanisms are related with direct mutual influence of the rhizobacterium with the pathogen or they have to do with activation of internal paths of the plant. Such in the second as some times in the first occasion the protection that the competitors are providing to the plants is related to the secretion of the metabolics. These metabolics may have a direct antimicrobial action or to participate in a complicated system of "molecule communication" with the plants. In this project it is tried to be developed a review of the existing knowledge concerning the repression phenomenon of the phytopathogenes from the competitors and the role of the secretive, from these, metabolics. It is also be examined in a familiar way, how can a repressive member of the bacterium *Enterobacter cloacae*, which was isolated from the "compost", to secret metabolics who have a partial role in the plant protection.

For the previous purpose, it has been used the pathosystem of tomato and the fungus *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis lycopersici*, it is confided that the exhausted nutritive bedding of the culture of *Enterobacter cloacae* has the ability to repress the action of the pathogenic fungus in tomato plant. This fact shows that the action of this bacterium in the specific occasion is related with the secretion of metabolics. It must be reminded that for the same bacterium has been proposed the nutrition competition as the most possible way of action against the egg-fungus *Pythium ultimum*.

# Κεφάλαιο 1<sup>ο</sup>

## Εισαγωγή

### 1.1 Στοιχεία γενικής φυτοπαθολογίας

Στο κεφάλαιο αυτό εξετάζονται φυτοπαθολογικές έννοιες χρήσιμες για την κατανόηση των υπολοίπων κεφαλαίων.

#### **Παρασιτισμός-Σαπροφυτισμός Συμβίωση-Ανταγωνισμός.**

Από τους ζωντανούς οργανισμούς, άλλοι μπορούν και συνθέτουν μόνοι τους τις οργανικές ενώσεις που χρειάζονται χρησιμοποιώντας ανόργανες χημικές ουσίες και άλλοι που στερούνται αυτής της ικανότητας, παίρνουν οργανικές ουσίες από το περιβάλλον τους. Οι πρώτοι οργανισμοί ονομάζονται **αυτότροφοι** και οι δεύτεροι ονομάζονται **ετερότροφοι**.

**Αυτότροφοι** οργανισμοί είναι τα πράσινα φυτά, τα οποία με τη λειτουργία της φωτοσύνθεσης συνθέτουν οργανικές ενώσεις από ατμοσφαιρικό CO<sub>2</sub>, νερό και ανόργανα στοιχεία.

**Ετερότροφοι** οργανισμοί είναι οι ζωικοί οργανισμοί, δηλαδή τα φυτά που δεν έχουν χλωροφύλλη και διάφοροι μικροοργανισμοί. Οι ετερότροφοι οργανισμοί παίρνουν οργανικές ουσίες που χρειάζονται είτε από νεκρές οργανικές ύλες, είτε από άλλους οργανισμούς εις βάρος των οποίων αναπτύσσονται.

Μεταξύ των ανώτερων φυτών και των ετερότροφων μικροοργανισμών παρατηρούνται βιολογικές σχέσεις εξάρτησης και αλληλεξάρτησης, που διακρίνονται σε τέσσερις τύπους:

- ✓ στον παρασιτισμό
- ✓ στον σαπροφυτισμό
- ✓ στη συμβίωση
- ✓ στον ανταγωνισμό



**Παρασιτισμός:** Είναι η μερική ή ολική εξάρτηση ενός οργανισμού ή ιού από τους ιστούς άλλου ζωντανού οργανισμού εντός ή επί του οποίου ζει και από τον οποίο παίρνει μέρος ή όλο το υλικό που χρειάζεται για την ανάπτυξη του, χωρίς να προσφέρει σ' αυτόν κανένα αντάλλαγμα. Οι οργανισμοί ή ιοί που παρασιτούν σε άλλους οργανισμούς λέγονται παράσιτα.

Τα παράσιτα διακρίνονται σε:

- ✓ **Υποχρεωτικά παράσιτα.** Μπορούν να ζήσουν μόνο ως παράσιτα, δηλαδή μόνο επί ζωντανών φυτικών ιστών.
- ✓ **Προαιρετικά σαπρόφυτα.** Είναι παράσιτα, τα οποία υπό ορισμένες συνθήκες μπορούν να ζήσουν τρεφόμενα από νεκρή οργανική ύλη.

**Σαπροφυτισμός:** Είναι η ικανότητα ενός οργανισμού να ζει προσλαμβάνοντας τις απαραίτητες ουσίες του από νεκρή οργανική ύλη (π.χ. από νεκρούς φυτικούς ή ζωικούς ιστούς). Οι μικροοργανισμοί που ζουν με αυτό τον τρόπο λέγονται σαπρόφυτα και διακρίνονται σε:

- ✓ **Υποχρεωτικά σαπρόφυτα.** Ζουν μόνο από νεκρή οργανική ύλη. Πλήθος υποχρεωτικών σαπρόφυτων ζουν στο έδαφος και παίζουν ωφέλιμο ρόλο στη διάσπαση της οργανικής ουσίας του εδάφους. Ορισμένα υποχρεωτικά σαπρόφυτα χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία για παραγωγή αντιβιοτικών και σε ζυμώσεις για την παρασκευή ειδικών τυριών (π.χ. ροκφόρ).
- ✓ **Προαιρετικά παράσιτα.** Υπό ορισμένες συνθήκες μπορούν να ζήσουν παρασιτικά και να προξενήσουν ασθένειες στα φυτά. Στα προαιρετικά παράσιτα ανήκουν πολλοί μύκητες και βακτήρια που ζουν σαπροφυτικά στο έδαφος ή επί των φυτών, αλλά υπό ορισμένες συνθήκες προσβάλλουν και δημιουργούν σοβαρές ασθένειες στα φυτά.

**Συμβίωση:** Είναι η από κοινού στενή και διαρκής διαβίωση δυο ανόμοιων οργανισμών από την οποία προκύπτει αμοιβαίο όφελος.

**Ανταγωνισμός:** Είναι η σχέση μεταξύ διαφόρων οργανισμών κατά την οποία ο ένας παρακωλύει μερικώς ή πλήρως την ανάπτυξη του άλλου ή προκαλεί την εξόντωση του. Η επίδραση αυτή μπορεί να ασκείται και αμοιβαία. Το αποτέλεσμα του ανταγωνισμού είναι ο περιορισμός ή ο θάνατος του αντιπάλου και οφείλεται κυρίως στη στέρηση απαραίτητων θρεπτικών στοιχείων από αυτόν ή στις τοξικές ουσίες που παράγει ο ανταγωνιστής. Ανταγωνιστικά φαινόμενα που ενδιαφέρουν τη φυτοπαθολογία παρατηρούνται κυρίως μεταξύ μυκήτων που ζουν στο έδαφος και μεταξύ βακτηρίων κ.λ.π.

### 1.1.1. Η έννοια της αστάθειας των φυτών

Ένα υγιές φυτό είναι σε θέση να πραγματοποιεί τις φυσιολογικές λειτουργίες του κατά τον καλύτερο δυνατό τρόπο στα πλαίσια των γενετικών δυνατοτήτων του. Οι λειτουργίες αυτές επιγραμματικά είναι:

- ✓ Η διαίρεση, η αύξηση και η διαφοροποίηση των κυττάρων του
- ✓ Η απορρόφηση νερού και θρεπτικών στοιχείων από το έδαφος
- ✓ Η μεταφορά αυτών μέσω των αγγείων του φυτού
- ✓ Η φωτοσύνθεση
- ✓ Η μεταφορά, ο μεταβολισμός και η αποθήκευση των προϊόντων της φωτοσύνθεσης
- ✓ Η αναπαραγωγή

Αν οι φυσιολογικές αυτές λειτουργίες διαταραχθούν, είτε από την επίδραση (προσβολή) παθογόνου μικροοργανισμού, είτε από την επίδραση συνθηκών του περιβάλλοντος με αποτέλεσμα μια ή περισσότερες λειτουργίες να μη συντελούνται ομαλά, τότε το φυτό ασθενεί.

**Ασθένεια** λοιπόν (ή φυτονόσος), από καθαρά βιολογική άποψη είναι οποιαδήποτε εκτροπή μιας ή περισσότερων λειτουργιών ενός φυτικού οργανισμού από τη φυσιολογική του κατάσταση.

### 1.1.2 Κατάταξη των ασθενειών

Οι ασθένειες των φυτών ανάλογα με το αίτιο που τις προκαλεί διακρίνονται σε **παρασιτικές** και **μη παρασιτικές**.

**Παρασιτικές:** Είναι οι ασθένειες που οφείλονται σε προσβολή από μικροοργανισμό ή ιό που χαρακτηρίζονται από την ικανότητα του παθογόνου αυτού αιτίου να πολλαπλασιάζεται στους ιστούς του φυτού και να εξαπλώνεται σε υγιή φυτά. Για το λόγο αυτό οι παρασιτικές ασθένειες, είναι και μεταδοτικές. Οι παρασιτικές ασθένειες ανάλογα με το είδος του αιτίου στο οποίο οφείλονται, διακρίνονται κυρίως σε μυκητολογικές (ή μυκώσεις), βακτηριολογικές (ή βακτηριώσεις), ιολογικές (ή ιώσεις) και σε οφειλόμενες σε φανερόγαμα (σπερμόφυτα) παράσιτα.

**Μη παρασιτικές:** Ασθένειες είναι εκείνες που οφείλονται κυρίως σε μετεωρολογικά και εδαφολογικά αίτια, τα οποία προκαλούν διάφορες ανωμαλίες. Τέτοιες ασθένειες είναι, για παράδειγμα, οι διαταραχές θρέψεως (τροφοπενίες, τοξικότητες), τοξικότητες από ατμοσφαιρικούς ρυπαντές, νεκρώσεις από χαμηλές θερμοκρασίες (παγετοί) ή υψηλές θερμοκρασίες (καύσωνες). Οι μη παρασιτικές ασθένειες δεν είναι μεταδοτικές.

Ανάλογα με τη μορφή που εκδηλώνεται μια παρασιτική (μεταδοτική) ασθένεια μπορεί να είναι:

- ✓ **Επιδημητική:** Εκδηλώνεται περιοδικά, αλλά με μεγάλη ταχύτητα και ένταση και σε μεγάλες εκτάσεις καλλιεργειών (μορφή επιδημίας).
- ✓ **Ενδημική.** Εκδηλώνεται σταθερά κάθε χρόνο σε μια περιοχή με διαφορετική ένταση κάθε φορά (ενδημία).

### 1.1.3 Άλλες φυτοπαθολογικές έννοιες

Η φυτοπαθολογική ορολογία είναι πλούσια, αλλά η εκτεταμένη αναφορά σε πολλούς φυτοπαθολογικούς όρους είναι πέρα από τους σκοπούς

αυτής της εργασίας. Εν τούτοις, θεωρείται σκόπιμη η εξήγηση ορισμένων φυτοπαθολογικών εννοιών, τις οποίες συναντά συχνά όποιος ασχολείται με τη μελέτη των φυτονόσων.

**Παθογόνο:** Καλείται ένας οργανισμός (μύκητας, βακτήριο κ.λ.π) ή ιός που μπορεί να προκαλέσει ασθένεια. Ο όρος αυτός δεν είναι συνώνυμος με τον όρο “παράσιτο” αν και αναφέρεται στις ίδιες κατηγορίες οργανισμών. Το παράσιτο μπορεί ορισμένες φορές να ζει εις βάρος ενός φυτού χωρίς να προκαλεί ασθένεια, οπότε δεν είναι παθογόνο. Η ικανότητα ενός μικροοργανισμού ή ιού να προκαλεί ασθένεια λέγεται παθογένεια.

- ✓ **Ξενιστής:** Είναι το φυτό, επί του οποίου αναπτύσσεται ένας παρασιτικός οργανισμός ή ιός, ανεξάρτητα από το αν του προκαλεί ασθένεια.
- ✓ **Ευπάθεια:** Είναι η ανικανότητα ενός φυτού να αναπτύσσει αποτελεσματική άμυνα στην εισβολή και τη δράση ενός παθογόνου ή άλλου επιζήμιου παράγοντα.
- ✓ **Ευαισθησία:** Είναι η αδυναμία ενός φυτού να υποφέρει τη δράση ενός παθογόνου ή άλλου επιζήμιου παράγοντα. Η αδυναμία αυτή εκδηλώνεται με διάφορα συμπτώματα.
- ✓ **Αντοχή:** Είναι η ικανότητα ενός φυτού να αντιστέκεται με οποιονδήποτε τρόπο στην είσοδο, στην εγκατάσταση και στην ανάπτυξη ενός παθογόνου (το αντίθετο της ευπάθειας).
- ✓ **Ανοχή:** Είναι η ικανότητα ενός προσβεβλημένου φυτού να υπομένει την επίδραση ενός παράσιτου ή ιού χωρίς να εκδηλώνει συμπτώματα ή να υφίσταται ζημιά (το αντίθετο της ευαισθησίας).
- ✓ **Υπόστρωμα:** Είναι το υλικό (φυτικός ιστός, νεκρή οργανική ύλη) πάνω ή μέσα στο οποίο αναπτύσσεται ένας μικροοργανισμός.
- ✓ **Μόλυνση:** Είναι η είσοδος και η εγκατάσταση ενός οργανισμού ή ιού σε ένα ξενιστή και η δημιουργία μόλυνσης ή πρόσκαιρης παρασιτικής σχέσης. (Ηλιόπουλος Γ. Αναστασίου.)

## 1.2. Φουζαρίωση

### 1.2.1. Ταξινόμηση

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε ως παθογόνο των φυτών ντομάτας ο μύκητας *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis lycopersici* (FORL). Κρίνεται λοιπόν σκόπιμο να γίνει μια αναφορά στους μύκητες του γένους *Fusarium* καθώς και στις ασθένειες, οι οποίες προκαλούνται στα φυτά από αυτούς. Το γένος *Fusarium* ανήκει στην κλάση *Hyphomycetes* των Δευτερομυκήτων και στην τάξη *Tuberculariales*, της οικογένειας *Tuberculariaceae* και της υποδιαίρεσης *Deuteromycotina*. Αποτελεί ατελή μορφή των ασκομυκήτων που ανήκουν στην κλάση *Pyrenomycetes* και στην τάξη *Hypocreales*. Οι Δευτερομύκητες είναι ανώτεροι μύκητες και σχηματίζουν πολυκύτταρο μυκήλιο. Τα είδη που ανήκουν στους Δευτερομύκητες αναπαράγονται αγενώς. Όλα τα είδη του *Fusarium* παράγουν μακροκονίδια με ιδιαίτερο σχήμα από σποριοδοχεία, των οποίων το κύτταρο της βάσης έχει σχήμα ποδιού. Το *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis lycopersici* (FORL) παράγει μικροκονίδια. Ορισμένα είδη παράγουν γλαμυδοσπόρια. Σε αυτά τα είδη συμπεριλαμβάνεται και το FORL. Τα μέλη του γένους *Fusarium* διαφέρουν όσον αφορά τα μορφολογικά και τα μη μορφολογικά χαρακτηριστικά και την παθογένεια. Εντός του γένους *Fusarium* υπάρχουν κάποιες υποδιαίρεσεις, οι οποίες βασίζονται στη φυσιολογία (*Formae speciales* και φυλές) ή στη γενετική (ομάδες συμβατότητας), όμως δεν αναγνωρίζονται από τον Κώδικα Βοτανικής Ονοματολογίας σύμφωνα με το άρθρο 4,3 (Windels, 1991). Έχει χρησιμοποιηθεί η τεχνική των μονόσπορων καλλιεργειών για να αναγνωρίσουν παθογενή στελέχη, τα οποία διέφεραν μορφολογικά από τα σαπροφυτικά στελέχη του είδους και ξεχώριζαν στην ικανότητά τους να προσβάλουν συγκεκριμένους ξενιστές. Στην αρχή πίστευαν ότι οι εξειδικευμένες μορφές ήταν παθογόνες για ένα μόνο ξενιστή και έπαιρναν το όνομά τους από το λατινικό όνομα του ξενιστή, όμως εξειδίκευση προσβολής υπάρχει μόνο για μερικές εξειδικευμένες μορφές (Windels, 1991). Το παθογόνο Forl της ντομάτας προσβάλλει τα φυτά της οικογένειας *Leguminosae* (Menzies *et al*, 1990).

### 1.2.2. Συμπτώματα

Τα συμπτώματα της ασθένειας εκδηλώνονται τις περισσότερες φορές με την έλλειψη νερού. Στην αρχή παρατηρείται χλώρωση και στη συνέχεια νέκρωση των κατώτερων φύλλων, αργότερα αυτά τα συμπτώματα εμφανίζονται και στα ανώτερα φύλλα. Τα προσβεβλημένα φυτά εμφανίζουν καχεξία και τελικά ξεραίνονται. Χαρακτηριστικό σύμπτωμα είναι ένας ανοιχτόχρωμος βαθυκάστανος μεταχρωματισμός των αγγείων του ξύλου που φαίνεται σε επιμήκη ή εγκάρσια τομή της ρίζας, αλλά και του στελέχους και μπορεί να εμφανίζεται μόνο σε μια περιοχή ή σε ολόκληρη την έκταση των αγγείων.

Σε καλλιέργειες, υπό κάλυψη, η ασθένεια εκδηλώνεται από την εμφάνιση μιας ξαφνικής σήψης ακριβώς πριν να ωριμάσουν οι καρποί, όταν είναι έτοιμοι για συγκομιδή, ιδιαίτερα τις ημέρες με ηλιοφάνεια (Δημόπουλος 1995). Τα συμπτώματα σε καλλιέργεια ντομάτας, υπό κάλυψη, όταν μολύνεται από τον μύκητα *F. oxysporum* f.sp. *radicis lycopersici* είναι η λεύκανση των λεπτών νεύρων και η αποκοπή ή η επιναστία των μίσχων (Walker, 1971).

### 1.2.3. Αιτιολογία

Διάφορα είδη του γένους *Fusarium* είναι δυνατόν να προκαλέσουν τις παραπάνω αλλοιώσεις είτε μόνα τους, είτε σε συνδυασμό μεταξύ τους. Τα σπουδαιότερα από αυτά είναι τα *F. culmorum*, *F. avenaceum*, *F. nivale*, *F. graminearum*. Τα είδη του γένους χαρακτηρίζονται από τα υαλώδη δρεπανοειδή, πολυκύτταρα σκωληκοσπόρια, το κύτταρο της βάσεως των οποίων δίδει την όψη πέλματος ανθρώπου. Τα σπόρια αυτά παράγονται (τυπικά) σε χαλαρά σποριοδοχεία, στα οποία οφείλεται και η πορτοκαλόχρωμη πολυστιγμία στους προσβεβλημένους ιστούς. Πολλά είδη παράγουν και δεύτερο είδος σπορίων, που είναι μονοκύτταρα ή δικύτταρα, και παράγονται μεμονωμένα ή σε αλυσίδες ή σε ομάδες στην κορυφή φιαλιδίων. Τα σπόρια αυτά ονομάζονται μικροκονίδια, σε αντιδιαστολή με τα πολυκύτταρα μακροκονίδια. Πολλά είδη παράγουν και χλαμυδοσπόρια. (Γραβάνης Θ. Φώτιος).

#### 1.2.4. Επιδημιολογία

Η θερμοκρασία αποτελεί σημαντικό ρόλο για την εμφάνιση συμπτωμάτων και την εκδήλωση της ασθένειας. Η άριστη θερμοκρασία της εκδήλωσης της ασθένειας είναι 15-18°C. Η μόλυνση των φυτών γίνεται κυρίως από τις ρίζες με απευθείας είσοδο του παθογόνου, μέσω των πληγών που δημιουργούνται από τις αναφυόμενες ρίζες και μ' αυτόν τον τρόπο προκαλείται καφέτιασμα σ' αυτές τις περιοχές (Δημόπουλος, 1995). Το παθογόνο εγκαθίσταται στα αγγεία του ξύλου και η προσβολή επεκτείνεται στο αγγειακό σύστημα μέχρι τα 25εκ. από τη ζώνη μετάβασης ρίζας-βλαστού (Jarvis, 1988). Στην αρχή, τα κύτταρα του μύκητα αναπτύσσονται σε περιορισμένη περιοχή των αγγείων και εισβάλλουν σε γειτονικά αγγεία, δια μέσου των αλοφόρων βοθρίων. Τα κύτταρα του παρεγχύματος αποικούνται κατά το τελευταίο στάδιο της ασθένειας, κυρίως όταν είναι ετοιμοθάνατα. Τα κονίδια συσσωρεύονται στις πλάκες διάτρησης των αγγείων, αλλά δεν σταματούν την κίνηση του παθογόνου προς τα επάνω. 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).

Κάποιες φυλές του *Fusarium oxysporum* είναι αερόβιες, με αποτέλεσμα όταν το έδαφος βρίσκεται σε κορεσμό από νερό να μειώνεται ο πληθυσμός του μύκητα. Σε συνθήκες κορεσμού 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 τη σαπροφυτική ανταγωνιστικότητα των διαφόρων συστατικών μικροχλωρίδας και άλλων μικροοργανισμών του εδάφους, τα οποία είναι ανταγωνιστικά προς τα παθογόνα (Beckman, 1987).

Η ασθένεια μεταδίδεται από τα προσβεβλημένα υπολείμματα της καλλιέργειας με τον αέρα, υπό μορφή κονιδίων σε υγιή φυτά. Μπορεί να επιβιώσει σε σωρούς σκουπιδιών, στο έδαφος, σε χοντρές ρίζες και σε άλλους ξενιστές. Η διασπορά των μολυσμάτων γίνεται κυρίως με το νερό της άρδευσης και με το πολλαπλασιαστικό υλικό (Δημόπουλος, 1995).

### 1.2.5. Καταπολέμηση της ασθένειας

Για την καταπολέμηση της ασθένειας που προκαλούν τα είδη του *Fusarium* χρησιμοποιούνται συνήθως μέθοδοι απολύμανσης του εδάφους και ανθεκτικές ποικιλίες φυτών. Οι ουσίες που χρησιμοποιούνται για την απολύμανση του εδάφους έχουν ζημιογόνες επιπτώσεις για το περιβάλλον και είναι προτιμότερο να αποφεύγονται. Η πιο συμφέρουσα μέθοδος όσον αφορά το κόστος και τις συνέπειες που έχει στο περιβάλλον είναι η μέθοδος των ανθεκτικών ποικιλιών, όταν αυτές είναι διαθέσιμες. Η δυσκολία καταπολέμησης του φουζάριου έχει στρέψει τους ερευνητές στη διερεύνηση της καταπολέμησης του βιολογικά (Fravel *et al*, 2002).

Παρακάτω αναφέρονται αναλυτικά οι μέθοδοι καταπολέμησης της ασθένειας που προκαλείται από το *Fusarium sp*.

#### 1.2.5.1. Χρήση ανθεκτικών ποικιλιών

Η χρήση ανθεκτικών ποικιλιών αποτελεί ιδανικό τρόπο καταπολέμησης μιας ασθένειας, όμως είναι πολύ δύσκολο να δημιουργηθούν ανθεκτικές ποικιλίες. Λίγες ποικιλίες είναι γνωστές για την ανθεκτικότητά τους στην φουζαρίωση σε υπαίθριες ή θερμοκηπιακές καλλιέργειες. Στις Η.Π.Α συγκριτικά με όλες τις ποικιλίες που χρησιμοποιούνται ανθεκτική ποικιλία θεωρείται μόνο η Lamta. Στην Ιαπωνία, ανθεκτικές θεωρούνται οι ποικιλίες IRB-301-30 IRB-301-3, οι οποίες δημιουργήθηκαν με μεταλλάξεις του *Lycopersicon peruvianum*. Στο Κεμπέκ αποδείχθηκαν ανθεκτικές δύο βελτιωμένες ποικιλίες που προέρχονταν από τις ποικιλίες Lamta και Vendor, οι 15-12K και 15-12P, ενώ μέση ανθεκτικότητα είχαν οι σειρές 17-3 και 19-2. Ανθεκτικότητα, επίσης, διαπιστώθηκε στα είδη *L. Hirsutum* f. *Glabratum* & *L. Pimpinellifolium* (Jarvis, 1988).



### 1.2.5.2. Χημική καταπολέμηση

Η χημική καταπολέμηση μπορεί να είναι προληπτική ή θεραπευτική κατά την παρουσία του παθογόνου. Κατά την προληπτική χημική καταπολέμηση εφαρμόζεται απολύμανση του εδάφους με τη χρήση του βρωμιούχου μεθυλίου (η εφαρμογή του τίθεται με περιορισμούς και από το 2005 θα απαγορευθεί), του ισοθειοκυανικού μεθυλίου, της χλωροπικρίνης, φορμαλδεΐδης, Avian, Vorlex κ.α. Αυτή η μέθοδος είναι αποτελεσματική σε ένα ευρύ φάσμα παθογόνων, όμως υπάρχουν κίνδυνοι επαναποίκισης από το παθογόνο, γιατί στο έδαφος μετά την απολύμανση υπάρχει έλλειψη ανταγωνιστών. Η μικροβιακή ισορροπία επέρχεται στο έδαφος μετά από μεγάλο χρονικό διάστημα, με αποτέλεσμα το έδαφος να μολύνεται με παθογόνους μύκητες εφόσον έχουν καταστραφεί οι μικροοργανισμοί που δρουν ως ανταγωνιστές. Η απολύμανση με βρωμιούχο μεθύλιο έχει θετικά αποτελέσματα όσον αφορά την απελευθέρωση θρεπτικών συστατικών, την αποικοδόμηση παρεμποδιστικών ουσιών και την δραστηριοποίηση των μικροοργανισμών που επιζούν μετά την απολύμανση. Οι αρνητικές επιπτώσεις της απολύμανσης είναι η αύξηση απωλειών από τις ασθένειες, που είναι φαινόμενα τοξικότητας και μειωμένης ανάπτυξης των φυτών. Επίσης, κάποιο μέρος των απολυμαντικών διαφεύγει στον αέρα, κάποιο άλλο προσροφάτε στην οργανική ουσία, ενώ το υπόλοιπο διασπάται.

Για να αντιμετωπιστεί η φουζαρίωση, με χημική μέθοδο χρησιμοποιούνται διασυστηματικά μυκητοκτόνα μονά ή σε συνδυασμό με κλασικά, όπως το benomyl και το thiram για ριζοπότισμα, συνήθως κατά την μεταφύτευση.

Γενικότερα, η χρήση των χημικών δεν είναι αποτελεσματική, γιατί απαιτούνται μεγάλες ποσότητες δραστικής ουσίας, που έχει ως αποτέλεσμα υψηλό κόστος και εμφάνιση φυτοτοξικότητας. Επίσης, το ριζικό σύστημα συνεχώς αναπτύσσεται και η δράση των χημικών δεν είναι εφικτή, ώστε να προστατεύσουν τα αγγεία του φυτού από την εισβολή και εγκατάσταση του παθογόνου (Αντωνίου, 1995).

### 1.2.5.3. Ηλιοαπολύμανση

Η ηλιοαπολύμανση εφαρμόζεται κυρίως σε ετήσιες καλλιέργειες υπαίθριες ή θερμοκηπίου. Σκοπός της μεθόδου αυτής είναι η καταστροφή ή η μείωση των παθογόνων του εδάφους. Κατά τους θερινούς μήνες, αφού οργωθεί και φρεζαριστεί ο αγρός καλύπτεται το έδαφος με διαφανές λεπτό φύλλο πολυαιθυλενίου. Το φύλλο πολυαιθυλενίου επιτρέπει την είσοδο περισσότερης ακτινοβολίας εγκλωβίζει τη θερμότητα και παράλληλα μειώνει τη διαφυγή θερμότητας και υγρασίας από το έδαφος προς την ατμόσφαιρα (Αντωνίου, 1995).

Σε σχέση με άλλες μεθόδους η ηλιοαπολύμανση έχει τα εξής αποτελέσματα:

- ✓ Το κόστος εφαρμογής είναι χαμηλό και η διαδικασία εφαρμογής είναι εύκολη
- ✓ Δεν αφήνει τοξικά υπολείμματα στο περιβάλλον και στα φυτικά προϊόντα
- ✓ Λειτουργεί ως ένα ευρύτερο σύστημα ελέγχου, αφού περιλαμβάνει χημικούς, φυσικούς και βιολογικούς μηχανισμούς
- ✓ Συνδυάζεται με μειωμένες δόσεις απολυμαντικών και με βιολογικά σκευάσματα για την επίτευξη καλύτερου αποτελέσματος
- ✓ Ευνοεί την επιβίωση ανταγωνιστών που αντέχουν στις υψηλές θερμοκρασίες με αποτέλεσμα τη μακροχρόνια αποτελεσματικότητά της
- ✓ Είναι μια από τις ενδεδειγμένες μεθόδους απολύμανσης του εδάφους, που σε εύκρατα κλίματα καλύπτει τις αρχές της οργανικής γεωργίας

Τα μειονεκτήματα της είναι:

- ✓ Για την εφαρμογή της χρειάζεται έδαφος ελεύθερο καλλιεργειών
- ✓ Μπορεί να εφαρμοστεί μόνο σε περιοχές με υψηλή ηλιοφάνεια και πολύ υψηλές θερμοκρασίες θέρους
- ✓ Για το βόρειο ημισφαίριο μπορεί να εφαρμοστεί μόνο το διάστημα Ιουνίου-Σεπτεμβρίου

- ✓ Δεν είναι αποτελεσματική εναντίων όλων των παθογόνων εδάφους. (Τζάμος, 1989)

#### 1.2.5.4. Βιολογική καταπολέμηση

Ως βιολογική καταπολέμηση των ασθενειών του φυτού ορίζεται η μείωση της μόλυνσης ή της δράσης της ασθένειας που προκαλείται από κάποιο παθογόνο χρησιμοποιώντας κάποιους μικροοργανισμούς (Roberts & Lohrke, 2003). Τα τελευταία χρόνια, το ενδιαφέρον για την βιολογική καταπολέμηση των παθογόνων των φυτών έχει αυξηθεί έναντι της χρήσης επικίνδυνων χημικών μικροβιοκτόνων (Cook, 1993). Οι συνέπειες της χρήσης των χημικών και των μικροβιοκτόνων στην ανθρώπινη υγεία και στο περιβάλλον απαιτεί την μείωση αυτών των χημικών σκευασμάτων. Η προσπάθεια να μειωθούν οι χημικές ουσίες που χρησιμοποιούνται στη γεωργία αποτελεί αφορμή για τη χρήση βιολογικών παραγόντων όσον αφορά την καταστολή των παθογόνων. Η ενσωμάτωση κατάλληλων βιολογικών παραγόντων για την αντιμετώπιση των παθογόνων των φυτών, ενδεχομένως να επιφέρει βιολογική ισορροπία στο περιβάλλον πετυχαίνοντας αποτελεσματικότερο έλεγχο των ασθενειών από ότι με τις ισχύουσες μεθόδους αντιμετώπισης αυτών (Roberts & Lohrke, 2003).

Η βιολογική καταπολέμηση στις ασθένειες που προκαλούν τα είδη του γένους *Fusarium sp.*, μπορεί να επιτευχθεί με μύκητες των γενών *Trichoderma sp.*, *Penicillium sp.*, *Fusarium sp.*, και το βακτήριο *Bacillus subtilis*. Στελέχη του *Bacillus subtilis* έχει αποδειχθεί ότι δρουν ανταγωνιστικά στην αποίκηση της ριζόσφαιρας και περιορίζουν την προσβολή από το FORL στο 50% (Bochow *et al*, 1998). Παρόμοια δράση είχε και το στέλεχος PCL 1391 του βακτηρίου *Pseudomonas chlororaphis* (Woengt *et al*, 1998). Στελέχη των *Pseudomonas fluorecens* και μη παθογόνα στελέχη του *Fusarium oxysporum* κατέχουν σημαντικό ρόλο στο βιολογικό έλεγχο της ασθένειας που προκαλεί το *Fusarium oxysporum*. (Mark Mazzola, 2002). Η καταστολή της ασθένειας με το συγκεκριμένο μικροβιακό συνδυασμό συνδέθηκε με την παραγωγή σιδηροφόρου ψευδοβακτίνης από το στέλεχος *P. putida* WCS 358. Το στέλεχος WCS 358 βοήθησε το βιολογικό έλεγχο που πραγματοποιείται από το στέλεχος του *Fusarium oxysporum*, Fo 47. Ο συνδυασμός αυτών των δύο στελεχών

μειώνει τη μυκηλιακή αύξηση του *Fusarium oxysporum* εξαιτίας του ανταγωνισμού για σίδηρο και άνθρακα (Duijf *et al*, 1998, Duijf *et al*, 1999). Στα κατασταλτικά εδάφη, οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των παθογόνων και των μη παθογόνων στελεχών του *Fusarium oxysporum* επιδρούν στον έλεγχο της ασθένειας που προκαλεί το *Fusarium oxysporum* (Fravel, Olivain alabouvette, 2002).

Οι ενδομυκορριζικοί μύκητες (VAM) αλληλεπιδρούν με παθογόνους μύκητες ριζών. Προκαλούν αλλαγές στη ριζόσφαιρα, έτσι ώστε να αυξάνεται η δραστηριότητα των μικροοργανισμών που ανταγωνίζονται άλλα παθογόνα σ' αυτήν (ριζόσφαιρα), όπως το FORL. Εμπορικά σκευάσματα που διατίθενται για εφαρμογή στο έδαφος είναι τα *Glomus intraradices* που χρησιμοποιούνται μαζί με τα *Trichoderma harzianum*. Αυτά τα δύο σκευάσματα χρησιμοποιούνται ξεχωριστά ή σε συνδυασμό για καλύτερα αποτελέσματα (Datnoff *et al*, 1995).

#### 1.2.6. Καλλιεργητικά μέτρα

Τα καλλιεργητικά μέτρα που εφαρμόζονται για την καταπολέμηση της φουζαριώσης είναι:

- ✓ Η χρήση υγιούς πολλαπλασιαστικού υλικού
- ✓ Αποφυγή χρήσης κοπριάς που περιέχει υπολείμματα φυτών ευαίσθητων στο μύκητα
- ✓ Αποφυγή δημιουργίας πληγών με τα καλλιεργητικά εργαλεία στην περιοχή του λαιμού και των ριζών
- ✓ Η άρδευση των φυτών να μην γίνεται σε αυλάκια, γιατί τα μολύσματα μεταφέρονται με το νερό σε υγιή δέντρα ή σε ετήσια φυτά
- ✓ Ισορροπημένη λίπανση και αποφυγή υπερβολικών αζωτούχων λιπάνσεων που ευνοούν την ασθένεια
- ✓ Καταπολέμηση των ζιζανίων, τα οποία είναι ξενιστές και συμβάλλουν στην αύξηση και διάδοση του μολύσματος
- ✓ Αποφυγή βαθέως οργώματος-φρεζαρίσματος για την αποφυγή δημιουργίας πληγών στο ριζικό σύστημα

- ✓ Καταστροφή των προσβεβλημένων φυτών και των υπολειμμάτων της καλλιέργειας
- ✓ Ισορροπημένη λίπανση, δηλαδή χορήγηση νιτρικών αντί αμμωνιακών λιπασμάτων
- ✓ Αύξηση του pH του εδάφους στο 6,5-7,0 επειδή συντελεί στην καταπολέμηση του *Fusarium oxysporum* (Παναγόπουλος, 1993).

### 1.3. Βιολογική καταπολέμηση φυτοπαθογόνων μικροοργανισμών

Η βιολογική αντιμετώπιση ασθενειών είναι μια καλλιεργητική πρακτική που στηρίζεται στις αρχές της φυτοπαθολογίας, οικολογίας, ταξινόμησης, μικροβιολογίας εδάφους, μορφολογίας-κυτταρολογίας-φυσιολογίας φυτών, γενετικής μικροοργανισμών, μοριακής βιολογίας και βιοχημείας.

Η βιολογική καταπολέμηση αφορά τη μείωση του πληθυσμού ή της δραστηριότητας ενός φυτοπαράσιτου με τη χρήση ενός ή περισσότερων οργανισμών πλην του ανθρώπου. Στη χρήση βιολογικών μέσων, πολλοί συγκαταλέγουν και τη χρήση ανθεκτικών ποικιλιών, αλλά συνήθως εννοούμε τη χρήση μυκήτων, βακτηρίων, ιών, εντομών αλλά και εντομοελκυστικών ή εντομοαπωθητικών φυτών. Η βιολογική αντιμετώπιση λαμβάνει χώρα πάνω στο φυτό, μέσα ή ακόμη και μακριά από αυτό. Αυτό αποτελεί επιστημονικό πεδίο έρευνας σπουδαίο και χρήσιμο για την ανεύρεση μακροπρόθεσμων λύσεων κατά τη στρατηγική αντιμετώπιση διαφόρων ασθενειών των φυτών. Η καταστολή των ασθενειών με τη χρήση παραγόντων βιολογικής αντιμετώπισης βασίζεται στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ του φυτού, του παθογόνου, του βιολογικού παράγοντα, της υπάρχουσας μικροχλωρίδας του φυτού και του φυτικού περιβάλλοντος (Handelsman *et al*, 1996).

Κατά τον Cook (1985): οι προσεγγίσεις της βιολογικής αντιμετώπισης μπορούν να διαχωριστούν στις εξής φάσεις:

- ✓ Βιολογική αντιμετώπιση του παθογόνου μολύσματος με τις κατάλληλες καλλιεργητικές τεχνικές όπως π.χ. η αμειψισπορά, η οποία επιτρέπει την καταστροφή του μολύσματος διευκολύνοντας την δράση των ήδη υπάρχοντων ανταγωνιστικών εδαφογενών μικροοργανισμών ή/και την

άροση, η οποία διευκολύνει την αποδιοργάνωση και αποσύνθεση των ευπαθών φυτικών υπολειμμάτων.

- ✓ Βιολογική αντιμετώπιση με ενίσχυση και ενδυνάμωση της φυτικής επιφάνειας ενάντια στα παθογόνα με την εγκατάσταση σε αυτήν κατάλληλων ανταγωνιστών.
- ✓ Επαγωγή αντοχής στις ασθένειες των φυτών.

Για την επίτευξη της δραστικότερης αποτελεσματικότητας των ανταγωνιστών πρέπει να προωθείται πρώτον, η αύξηση των ήδη υπάρχοντων ανταγωνιστών που επιζούν στο έδαφος ή η καταστολή του πληθυσμού του παθογόνου ή έστω η μη διαταραχή αυτών και δευτέρων, ο εντοπισμός ή η ανάπτυξη ανώτερων ανταγωνιστών ώστε να εγκατασταθούν στο έδαφος ή να εμβολιασθούν στο φυτό (Cook, 1985). Προσπάθειες για τη χρησιμοποίηση βακτηρίων ως βιολογικοί ανταγωνιστές έχουν ξεκινήσει από τις αρχές του αιώνα. Το ενδιαφέρον στο πεδίο αυτό αυξήθηκε ιδιαίτερα στα μέσα της δεκαετίας του '60 όπου και ξεκίνησε ένας μεγάλος αριθμός πειραματικών εφαρμογών σε συνθήκες αγρού. Τα βακτήρια της ριζόσφαιρας με ικανότητα να περιέχουν βιολογική αντιμετώπιση ασθενειών είναι λιγότερο από 10% από το συνολικό πληθυσμό των ριζοβακτηρίων. Η βασική αρχή για την επιλογή του κατάλληλου ανταγωνιστικού βακτηρίου είναι ότι τα επιλεγθέντα βακτηριακά στελέχη πρέπει να χρησιμοποιούνται σε εδάφη με παρόμοιες εδαφοκλιματικές συνθήκες με αυτές που επικρατούν στα εδάφη από τα οποία απομονώθηκαν. Απομονώνοντας στελέχη από κατασταλτικά εδάφη έχουμε αυξημένες πιθανότητες στην εύρεση δυνητικά ανταγωνιστικών βακτηρίων. Σημειώνεται ότι δεν υπάρχει συσχέτιση μεταξύ της ικανότητας ενός βακτηρίου στο να αναπτύσσει ζώνη παρεμπόδισης στο παθογόνο *in vitro* με το να καταστέλλει την ασθένεια στον αγρό από το ίδιο παθογόνο. Στελέχη που δημιουργούν τη μεγαλύτερη ζώνη παρεμπόδισης στο τριβλίο δεν είναι πάντα και οι καλύτεροι βιολογικοί ανταγωνιστές. Επιβάλετε ότι κάθε στέλεχος πρέπει να δοκιμάζεται και σε πειράματα θερμοκηπίου. Βασικοί παράμετροι σε αυτή την περίπτωση είναι οι συνθήκες του περιβάλλοντος (π.χ. η θερμοκρασία και η υγρασία του εδάφους), το ποσό μόλυσματος του παθογόνου και η δόση του ανταγωνιστικού βακτηρίου (Weller, 1988). Σημαντικοί προϋπόθεση των βιολογικών ανταγωνιστών σε παθογόνα εδάφους είναι να αποτελούν δυνητικούς αποικιστές

της ριζόσφαιρας ή της σπερματοσφαιρας και να υπάρχει αμοιβαία προστασία μεταξύ ξενιστή-παθογόνου (Fravel, 1991).

Όσον αφορά στα ενδοφυτικά βακτήρια μάλλον σχετίζονται στενά με τα φυτά-ξενιστές, μέσω των διαδικασιών της εξέλιξης επηρεάζοντας τη φυσιολογία του φυτού. Η μοναδική τους ικανότητα να επιζούν μέσα στο φυτό αποφεύγοντας το μικροβιακό ανταγωνισμό, τα καθιστά αξιόλογους βιολογικούς παράγοντες (Misaghi, 1990). Η βιολογική δράση των ανταγωνιστικών βακτηρίων εξαρτάται από την εγκατάσταση και την διατήρηση του βιολογικού πληθυσμού σε ένα επίπεδο στη ριζόσφαιρα, όπου θα προσφέρει τη δυνατότητα της αντιμετώπισης του παθογόνου. Πάρα πολλοί εδαφικοί παράγοντες (θερμοκρασία, υγρασία, pH, άργιλος) επηρεάζουν την επιβίωση και την εγκατάσταση των βακτηρίων και τις αλληλεπιδράσεις τους με το παθογόνο. Ο τρόπος με τον οποίο τα βακτήρια καλλιεργούνται και στη συνέχεια εφαρμόζονται *in vitro* μπορεί να επηρεάσει τη βιωσιμότητα τους και την αντοχή τους στις αντίξοες συνθήκες που επικρατούν κατά την εφαρμογή τους στο έδαφος. Μικρότερο κίνδυνο έχουν οι βάκιλοι, λόγω της αντοχής που τους προσδίδει η παραγωγή ενδοσπορίων (Weller, 1988).

Σύμφωνα με τη Fravel (1991), ο αποτελεσματικότερος συνδυασμός μεταξύ του συγκεκριμένου βιολογικού ανταγωνιστή και του παθογόνου εδάφους εξαρτάται από δύο παράγοντες. Πρώτον, ο μηχανισμός δράσης του ανταγωνιστή να υιοθετηθεί και να επενεργήσει στο συγκεκριμένο σύστημα και δεύτερον, η συγκεκριμένη χρονική στιγμή και οι περιβαλλοντολογικές συνθήκες που θα επιλεχθούν για να εφαρμοστεί ο ανταγωνιστής να συμπέσει με τη σωστή στιγμή στη διάρκεια του βιολογικού κύκλου της ασθένειας.

Έχει αποδειχθεί ότι μεγάλο πλήθος βιολογικών δραστηριοτήτων παίρνουν μέρος για την επιτυχή βιολογική καταστολή της ασθένειας. Σε αυτές συμπεριλαμβάνονται η ικανότητα αποίκησης του κατάλληλου ξενιστή και η παραγωγή ανταγωνιστικών ενώσεων, όπως αντιβιοτικά, τοξίνες, σιδηροφόροι, αμμωνία, κυανιδίνη, υδρολυτικά ένζυμα και παρασιτισμός. Επίσης, τα ανταγωνιστικά βακτήρια μπορούν να προστατεύσουν το φυτό μέσω της επαγωγής των μηχανισμών αντοχής του και της απαλοιφής των σημάτων που προωθούν την ανάπτυξη του παθογόνου ή να ανταγωνιστούν τα θρεπτικά στοιχεία (Baker 1968 Lam *et al*, 1993 & Thomashow *et al*, 1996).

### **1.3.1. Μηχανισμοί δράσης των ανταγωνιστικών βακτηρίων έναντι των φυτοπαθογόνων μικροοργανισμών**

Υπάρχουν τριών ειδών μηχανισμοί, οι οποίοι δρουν κατά των φυτοπαθογόνων μικροοργανισμών. Αυτοί είναι οι εξής:

- ✓ ο τροφικός ανταγωνισμός (Σιδηροφόροι)
- ✓ η αντιβίωση και ο παρασιτισμός και
- ✓ η επαγόμενη ανθεκτικότητα στα φυτά

#### **1.3.1.1. Τροφικός ανταγωνισμός (Σιδηροφόροι)**

Τα περισσότερα θρεπτικά συστατικά στην περιοχή της ριζόσφαιρας προέρχονται από τις εκκρίσεις των ριζών. Μερικά από αυτά τα συστατικά δεν εξυπηρετούν μόνο 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 λήθαργου. Η μόλυνση επιτυγχάνεται μόνο μετά τη διακοπή του λήθαργου παρουσία των σημάτων ή της διέγερσης από τον ξενιστή. Ο βιολογικός παράγοντας μπορεί να προστατεύσει το φυτό με την αποτελεσματική μετακίνηση τέτοιων σημάτων από τη 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. Μεγάλοι βακτηριακοί πληθυσμοί εγκαθίστανται στο ριζικό σύστημα των φυτών και καταναλώνουν τα ποσά άνθρακα και αζώτου που είναι απαραίτητα για την ενεργοποίηση των μορφών διαχείμασης των παθογόνων ή για τον αποικισμό της ριζόσφαιρας ( Thomashow *et al*,1996). Το πιο χαρακτηριστικό παράδειγμα αυτής της περίπτωσης αποτελεί ο θρεπτικός ανταγωνισμός για το σίδηρο. Ο σίδηρος βρίσκεται σε άφθονες ποσότητες στο έδαφος, αλλά ως επί το πλείστον απαντάται στην αδιάλυτη μορφή του, το υδροξείδιο του σιδήρου. Έχει αποδειχθεί ότι ο σίδηρος είναι διαθέσιμος στους οργανισμούς σε συγκεντρώσεις



της τάξης των  $10^{-18}$  moles ή και λιγότερο στα εδαφικά διαλύματα με ουδέτερο pH. Τα βακτήρια χρειάζονται σίδηρο σε συγκεντρώσεις moles για την ανάπτυξη τους και διαθέτουν μικροοργανισμούς υψηλής ικανότητας για τη δέσμευση του στοιχείου αυτού στο κύτταρο τους. Σιδηροφόρος είναι μια ένωση  $Fe^{3+}$  μικρού μοριακού βάρους στα κύτταρα ορισμένων βακτηρίων. Η ένωση αυτή δεσμεύει το σίδηρο και μαζί με μια πρωτεΐνη, το μεταφέρει στο κύτταρο (Handelsman, 1996). Οι σιδηροφόροι συμβάλλουν στον περιορισμό των ιόντων σιδήρου στη ριζόσφαιρα, έχοντας ως αποτέλεσμα τη μείωση της ανάπτυξης των παθογόνων. Οι περισσότεροι αερόβιοι και ορισμένοι αναερόβιοι μικροοργανισμοί αντιδρούν σε περιβάλλον με χαμηλή συγκέντρωση σιδήρου, παράγοντας εξωκυτταρικά σιδηροφόρους με μοριακό βάρος 500-1000 daltons. Οι μικροοργανισμοί που παράγουν σιδηροφόρους δραστηριοποιούνται σε περιβάλλον με χαμηλό επίπεδο διαθεσιμότητας σιδήρου. Βέβαια, εκτός από το ρόλο της μεταφοράς του τρισθενούς σιδήρου, οι σιδηροφόροι βοηθούν στην ανάπτυξη του φυτού και μερικοί είναι δυνητικά αντιβιοτικά (Leong 1991, Chet *et al*, 1990). Η διαθεσιμότητα των σιδηροφόρων στο έδαφος μειώνεται λογαριθμικά με την αύξηση του pH. Η καταστολή της ασθένειας χάρη στους σιδηροφόρους είναι μεγαλύτερη σε ουδέτερα ή αλκαλικά εδάφη. Τα παθογόνα είναι ευαίσθητα στην παρουσία των σιδηροφόρων, γιατί δεν παράγουν δικούς τους ή είναι ανίκανα να χρησιμοποιήσουν σιδηροφόρους που παράγονται από βακτήρια ή από άλλους οργανισμούς. Αναφέρεται βέβαια, ότι δύναται να παράγουν μικρές ποσότητες σιδηροφόρων ή σιδηροφόροι ασθενέστερης έλξης για το σίδηρο από ότι αυτών των βακτηρίων ή ότι οι παραγόμενοι από τα παθογόνα σιδηροφόροι μπορεί να χρησιμοποιηθούν από τους ανταγωνιστές (Weller 1988). Οι ψευδομπακτίνες είναι σιδηροφόροι που παράγονται από τις φθορίζουσες ψευδομονάδες και οι οποίες μπορούν να προσδίδουν σίδηρο στα φυτά. Εάν υπάρχει η κατάλληλη πρωτεΐνη παραλαβής του σιδήρου διαφορετικά βακτήρια μπορούν να χρησιμοποιούν τον ίδιο τύπο σιδηροφόρου (Handelsman 1996).

## 1.3.2. Αντιβίωση και παρασιτισμός

### 1.3.2.1. Παραγωγή αντιβιοτικών ουσιών

Τα αντιβιοτικά αποτελούν μια ετερογενή ομάδα οργανικών ενώσεων, χαμηλού μοριακού βάρους, τα οποία έχουν και μικροβιακή προέλευση. Σε μικρές συγκεντρώσεις παρεμποδίζουν την ανάπτυξη ή άλλες μεταβολικές διαδικασίες άλλων μικροοργανισμών, συμβάλλοντας στην καταστολή των δραστηριοτήτων των παθογόνων. Η παραγωγή αντιβιοτικού ίσως προσφέρει στο μικροοργανισμό πλεονέκτημα όσον αφορά τον ανταγωνισμό για θρεπτικά στοιχεία και χώρο στις διάφορες θέσεις οικολογικής σημασίας. Έχει παρατηρηθεί ότι μικροοργανισμοί παράγουν αντιβιοτικά υπό συνθήκες καταπόνησης, αν και ο ρυθμός ανάπτυξης τους είναι μικρότερος από ότι αυτών που δεν παράγουν (Fravel, 1988).

Τα περισσότερα αντιβιοτικά παράγονται από εδαφογενείς μικροοργανισμούς. Η αντιβίωση είναι ένας πολύ αποτελεσματικός μηχανισμός καταστολής των παθογόνων στη ριζόσφαιρα (Fravel, 1998). Αυτός ο εξειδικευμένος τρόπος ανταγωνισμού πραγματοποιείται είτε με εξειδικευμένους τοξικούς μεταβολίτες μικροβιακής προέλευσης, είτε με μυκοτοξίνες του εδάφους, είτε με λυτικούς παράγοντες (Paranizas, 1980), είτε με ένζυμα είτε με άλλες τοξικές ενώσεις (Fravel, 1988). Η αντιβίωση ενδεχομένως μπορεί να μειώνει ή να εμποδίζει την παραγωγή των πολλαπλασιαστικών μονάδων του παθογόνου ή ακόμη και να εμποδίζει την ανάπτυξη του. Σε συστήματα βιολογικής αντιμετώπισης που έχουν μελετηθεί ένα ή περισσότερα αντιβιοτικά έχει αποδειχθεί ότι παίζουν ρόλο στην καταστολή της εκάστοτε ασθένειας.

Οι αρχές που διέπουν το φαινόμενο της παραγωγής αντιβιοτικών κατά των Baker είναι:

- ✓ Η παραγωγή αντιβιοτικών στο έδαφος πραγματοποιείται παρουσία οργανικής ουσίας. Απαιτείται επάρκεια θρεπτικών στοιχείων και κυρίως πηγών άνθρακα, οι οποίοι μεταβολίζονται από τον μικροοργανισμό για την παραγωγή της αντιβιοτικής ουσίας. Η ανίχνευση των αντιβιοτικών στο έδαφος είναι δυσχερής, αλλά εφικτή. Η εγγενής πολυπλοκότητα της ριζόσφαιρας δυσχεραίνει την ανίχνευση των αντιβιοτικών, αλλά αυτό

είναι το ενδιαφέρον σημείο για τον εντοπισμό των δυνητικών ανταγωνιστών.

- ✓ Παραγωγή αντιβιοτικών *in vitro* δε συνεπάγεται οπωσδήποτε και παραγωγή αντιβιοτικών *in vivo*.
- ✓ Η μεγάλη ευαισθησία των αντιβιοτικών στους περιβαλλοντικούς παράγοντες έχει κάποιες φορές ως αποτέλεσμα την αδρανοποίηση τους στο έδαφος. Η αποδιοργάνωση των μικροοργανισμών, η αστάθεια του pH, η προσρόφηση τους στα κolloειδή και στα χουμικά εδαφικά στοιχεία επηρεάζουν ανεπανόρθωτα τη δραστηριότητα τους.
- ✓ Μεγάλο μέρος των αντιβιοτικών παραμένουν προσροφημένα στο έδαφος σε μορφή που δεν είναι διαθέσιμη για να επιτευχθεί η ανταγωνιστική δράση τους (Baker, 1968).

Η υποψία ότι η αντιβίωση συμβάλει στην καταστολή ασθενειών από ένα βακτήριο-ανταγωνιστή, συνήθως ξεκινάει από μια *in vitro* απόδειξη ή ακόμη και ένδειξη. Οι γενετικές αναλύσεις έχουν δώσει σημαντικές πληροφορίες για τον ρόλο των αντιβιοτικών στη βιολογική αντιμετώπιση, λόγω του ότι τα μεταλλαγμένα στελέχη δύναται να μελετηθούν εύκολα *in vitro* δημιουργώντας αλλαγές στην συσσώρευση αντιβιοτικών, παρέχοντας έτσι τα μέσα για λεπτομερή διεξαγωγή γενετικών αναλύσεων και κατανόηση του τρόπου δράσης των εξειδικευμένων παρεμποδιστών με τη καταστολή συγκεκριμένων ασθενειών (Lam, 1993 Handelsman, 1996). Η απομόνωση και η παραγωγή αυτών των ουσιών δεν είναι ιδιαίτερα εύκολη και αυτό αποτελεί εμπόδιο για την πλήρη κατανόηση και συλλογή των κατάλληλων πληροφοριών (Fravel, 1988), αλλά η καθημερινή εξέλιξη της τεχνολογίας και η χρήση μοριακών τεχνικών μπορεί να μειώσει το πρόβλημα αυτό. Η περιγραφή των χημικών, φυσικών και βιολογικών παραγόντων, οι οποίοι ρυθμίζουν την έκφραση γονιδίων των βακτηρίων της ριζόσφαιρας συμβάλει στην κατανόηση της συμπεριφοράς των παραγόντων βιολογικής αντιμετώπισης και εισάγει στρατηγικές που βελτιώνει την εφαρμογή τους. Τα αντιβιοτικά συχνά είναι ισχυρά, συνδεδεμένα με την οργανική ουσία του εδάφους ή αποσυντίθενται γρήγορα από την εδαφική μικροχλωρίδα. Είναι όμως δυνατή η ανίχνευση του αντιβιοτικού σε μικρές ποσότητες, ακόμη και μετά από τριάντα ημέρες από την παραγωγή του σε μη αποστειρωμένο έδαφος. Οι τεχνικές ανίχνευσης αντιβιοτικών στο έδαφος συνεχώς βελτιώνονται (Fravel, 1988).

Κατά τον Cook *et al.* (1995) υπάρχουν τρία επίπεδα ρύθμισης των γονιδίων για τη βιοσύνθεση των αντιβιοτικών από ριζοβακτήρια:

- ✓ Το αρχικό επίπεδο έχει άμεση σχέση με το περιβάλλον όπου βρίσκεται το βακτήριο
- ✓ Το δεύτερο ή ενδιάμεσο επίπεδο, που συνδέει τη ρύθμιση της βιοσύνθεσης του αντιβιοτικού με άλλες μεταβολικές διαδικασίες μέσω της όλης ρύθμισης και κυτταρικής ομοιοστασίας, και τέλος
- ✓ Το εξειδικευμένο τριτογενές επίπεδο που περιλαμβάνει την περιοχή ρύθμισης, η οποία είναι συνδεδεμένη και διαφορετικά μεταγραμμένη από τα δομικά γονίδια για τα γονίδια που βιοσυνθέτουν τα αντιβιοτικά.

Για κάποιους παράγοντες, η παραγωγή αντιβιοτικών *in vitro* και η βιολογική καταπολέμηση *in situ* είναι αποτέλεσμα της παραγωγής ενός ή περισσότερων στοιχείων που παράγονται διαδοχικά από μοναδικά βιοχημικά μονοπάτια. Τα στελέχη που παρουσιάζουν τα χαρακτηριστικά αυτά έχουν αναχθεί σε γενετικά μοντέλα αποτελώντας πηγές ήδη κλωνοποιημένων βιοσυνθετικών τόπων για την ωομυκίνη A, φεναζίνη και 2,4-διακετλοφλορογλουσινόλη.

Η παραγωγή του αντιβιοτικού ωομυκίνης A γίνεται από στελέχη του βακτηρίου *P. Fluorescens* (Hv 37a κα) και το *Pseudomonas putida* συμβάλλοντας στην καταστολή της σηψηριζίας (*Pythium spp.*) στο σιτάρι. Υπεύθυνοι παράγοντες για τη σύνθεση αυτών των αντιβιοτικών είναι ορισμένα γονίδια, τα οποία έχουν χαρακτηριστεί και επιτρέπουν γενετικούς χειρισμούς. Το Hv 37a έχει απομονωθεί από τη ριζόσφαιρα του κριθαριού, παράγει ωομυκίνη A σταθερή στη θερμότητα, 700-800-Da, προκαλεί 50% αύξηση ανάπτυξης στα φυτάρια βάμβακος και 70% καταστολή της ασθένειας που προκαλείται από το *P. ultimum*. Η παραγωγή ωομυκίνης A επάγεται από τη γλυκόζη και παρεμποδίζεται από αμινοξέα, τα οποία αμφότερα βρίσκονται σε αφθονία στις ρίζες και στα εκκρίματα των σπόρων (Thomashow, 1996).

Οι φεναζίνες είναι αντιβιοτικά που περιέχουν χρωστική ουσία στο μόριο τους, όπως επίσης και αζωτούχα ετεροκλυστικά στοιχεία παραγόμενα από βακτήρια μέσω του μονοπατιού του σικιμικού οξέος. Παράγονται από στελέχη

του *Pseudomonas fluorescens* 2-79 και *Pseudomonas aureofaciens* 30-84 όπου καταστέλλουν την ανάπτυξη του *Gaeumanomyces graminis* var. *tritici*.

Οι φλορογλουσινόλες είναι αντιβιοτικά-μεταβολίτες βακτηριακής και φυτικής προέλευσης με αντιϊκή, αντιβακτηριακή, αντιμυκητιακή και αντιελμινθιακή δράση με φυτοτοξικές κάποιες φορές ιδιότητες. Η 2,4-διακετιλοφθλορογλουσινόλη παράγεται από στελέχη φθοριζουσών ψευδομονάδων ευρέως διαδεδομένων σε όλη την υφήλιο (Q<sub>2</sub>-87, F113, CHAO, CHA625 κα) τα οποία έχουν χρησιμοποιηθεί εναντίον των μυκητών *Thielaviopsis basicola* και *P. ultimum*.

Άλλα αντιβιοτικά παραγόμενα από ψευδομονάδες είναι η πυολουτεορίνη (Plt) με ανταγωνιστική δράση ενάντια στους μύκητες *P. ultimum*, *Verticillium dahliae*, *Alternaria* sp., *Fusarium* sp., *Rh solani* και *T. basicola*. η πυρολνιτρίνη ενάντια στον μύκητα *Ahanomyces cochliodes* και στον *Rh. solani*.

Η ομάδα των βακίλων παράγει αντιβιοτικά που μπορεί να δράσουν αποτελεσματικά ως καταστολείς ασθενειών και αποτελούν δυνητικούς παράγοντες βιολογικής αντιμετώπισης. Έχει αποδειχθεί ότι το στέλεχος UW85 του *Bacillus cereus* έχει κατασταλτική δράση σε ασθένειες προκαλούμενες από τους ωομύκητες, που ανήκουν στα PROTISTA και προκαλούν σημαντικές ασθένειες στα φυτά. Ανάλυση των μεταλλαγμένων στελεχών του *Bacillus cereus* δείχνει, ότι υπάρχει μια σημαντική ποσοτική σχέση μεταξύ της κατασταλτικότητας της ασθένειας και της παραγωγής δύο αντιβιοτικών, της ζβιτερμυκίνης A και της κανοσαμίνης. Τα αντιβιοτικά αυτά καταστέλλουν τις ασθένειες και παρεμποδίζουν την ανάπτυξη των ωομυκήτων ,εμποδίζοντας την ανάπτυξη, παραμορφώνοντας τους βλαστικούς σωλήνες και τις βλαστανούσες κύστες των μυκήτων αυτών.

Πρόσφατες μελέτες έχουν αποδείξει την αντιβιοτική ικανότητα πτητικών ουσιών (π.χ. ιουρίνη κ.α.) παραγομένων από το βακτήριο *Bacillus subtilis* να συμβάλλουν στην καταπολέμηση των μυκήτων *Rh. solani*, *P. ultimum*, ενώ συνδυασμός του μύκητα *Gliocladium virens* και του βακτηρίου *Bacillus subtilis* κατέστειλε σε σημαντικό βαθμό τη φουζαρίωση του βαμβακιού μετά από κάλυψη των σπόρων του με τους δυο ανταγωνιστές (Phae *et al*, 1990, Thomashow *et al* 1996).

Οι βακτηριοσίνες είναι υποκατηγορία των αντιβιοτικών. Πρόκειται για ενώσεις που μοιάζουν με αντιβιοτικά με εξειδικευμένο βακτηριοκτόνο δράση για κάθε βακτηριακό στέλεχος και άμεσα σχετιζόμενη με το μικροοργανισμό που την παράγει. Η πλέον γνωστή βακτηριοσίνη είναι η agrocipin 84 όπου παράγεται από το στέλεχος *A. radiobacter* στέλεχος K84 το οποίο χρησιμοποιείται στην αντιμετώπιση του *Agrobacterium tumefaciens* με πολύ θεαματικά αποτελέσματα (Κεπ, 1978).

### 1.3.2.2. Ο ρόλος των αντιβιοτικών στο βιολογικό έλεγχο

Οι πρώτες ενδείξεις για τη σημασία των αντιβιοτικών στον έλεγχο των ασθενειών των φυτών προέκυψαν από την παρατήρηση ότι φιλτραρισμένες καλλιέργειες βακτηρίων ή απομονωμένα αντιβιοτικά είχαν την ίδια αποτελεσματικότητα με τα ίδια τα βακτήρια (Hopell & Stipanovic 1979, Kang *et al*, 1998, Nakayama *et al*, 1999). Επίσης η απενεργοποίηση των βιοχημικών μονοπατιών της παραγωγής αντιβιοτικών είχε σαν αποτέλεσμα σε μερικές περιπτώσεις την μείωση της ικανότητας των ανταγωνιστικών βακτηρίων να ελέγξουν τα παθογόνα. Για παράδειγμα, η μετάλλαξη χρησιμοποιείται επιτυχημένα για να αποδειχθεί ότι τα αντιβιοτικά που παράγονται από τα είδη του *Pseudomonas* (Thomashow & Weller 1988, Keel *et al*, 1990, Vincent *et al*, 1991, Cronin *et al*, 1997 & Anjiaiah *et al*, 1998) του *Burkholalerialia cepacia* (Kang *et al*, 1998, Heungens & Parke 2001) και του *Bacillus cerens* (Soulos *et al*, 1994) παίζουν ένα σημαντικό ρόλο στο βιολογικό έλεγχο των φυτικών ασθενειών. Σε μερικές από τις μελέτες αυτές, βακτηριακά μεταλλάγματα στα οποία έγινε αποκατάσταση της βιοσύνθεσης αντιβιοτικών απεκατέστησαν την ικανότητα τους να προστατεύουν τα φυτά (Thomashow *et al*, 1997). Η τρίτη ένδειξη προήλθε από την προαγωγή της ικανότητας βιοελέγχου των φυτοπαθογόνων μέσω της εισαγωγής ή τροποποίησης των αντιβιοτικών βιοσυνθετικών μονοπατιών.

### 1.3.2.3. Εξάπλωση και ανίχνευση των βακτηριακών αντιβιοτικών προϊόντων

Πολυάριθμα είδη βακτηρίων, τα οποία παράγουν αντιβιοτικά *in vitro* έχουν απομονωθεί από διαφορετικά εδάφη και είδη φυτών. Ο μεγάλος αριθμός τέτοιων απομονωμένων στελεχών καταδεικνύει την ευρεία εξάπλωση τέτοιων μικροοργανισμών στη μικροχλωρίδα του εδάφους και στα περιβάλλοντα που συσχετίζονται με φυτά σ' όλο τον κόσμο. Παρόλα αυτά λίγα είναι γνωστά σχετικά με την οικολογία τέτοιων βακτηρίων. Έχει διατυπωθεί η άποψη ότι η απομόνωση και ο χαρακτηρισμός γονιδίων τα οποία σχετίζονται με τη βιοσύνθεση αντιβιοτικών ουσιών θα μπορούσε να συνεισφέρει ουσιαστικά στην κατανόηση των μηχανισμών με τους οποίους δρουν αυτοί οι μικροοργανισμοί. Για μερικά αντιβιοτικά που παράγονται από διαφορετικά είδη βακτηριακών γονιδίων, τα βιοσυνθετικά γονίδια έχουν κλωνοποιηθεί μερικώς ή ολόκληρα και έχει βρεθεί η νουκλεοτιδική τους ακολουθία.. Τέτοια είναι η περίπτωση των αντιβιοτικών zwittermicin που παράγεται από το *Bacillus cereus* (Stohl *et al*, 1999), του AFC-BC11 που παράγεται από *Cepacia* (Kang *et al*, 1998) καθώς και τα DAPG phenazines rygolnitrin, και ryoluteorin που παράγονται από ποικίλα είδη *Pseudomonas* (species) (Pierson *et al*, 1995, Hammer *et al*, 1997, Martodi *et al*, 1998. Bangera & Thomashow 1999, Nowak-Thompson *et al*, 1999, Chin-A-Woeng-2000, Delaney *et al*, 2001).

### 1.3.2.4. Η κατασκευή των αντιβιοτικών παραγόμενων βακτηρίων

Μια σημαντική πηγή για την προαγωγή του βιολογικού ελέγχου των παθογόνων των φυτών αποτελούν οι φυσικοί πληθυσμοί των μικροοργανισμών και η γενετική ποικιλομορφία η οποία υπάρχει σε αυτούς (Handelsman & Stabb 1996, Thomashow Weller 1996). Παρόλα αυτά, η εκμετάλλευση της γενετικής ποικιλομορφίας των βακτηριακών στελεχών, τα οποία είναι ικανά να ελέγξουν φυτοπαθογόνους μύκητες των φυτών έχει λάβει έως τώρα, σχετικά λίγης προσοχής. Πιθανόν να έχει μεγάλη σημασία ο συνδυασμός διαφορετικών βακτηριακών στελεχών, τα οποία έχουν την ικανότητα βιοελέγχου. Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι υπάρχει μια σημαντική ποικιλομορφία των πληθυσμών

*B. cepacia* (Dicello *et al*, 1997, Berivino *et al*, 1998, Parke & Gurian-Sherrman 2001), *Serratia plymuthica* (Bery 2000) *Bacillus cereus* (Raffel *et al*, 1996) και είδη του *Pseudomonas* (Keel *et al*, 1996, Mc Spadden-Gardener *et al*, 2000).

### 1.3.2.5. Παρασιτισμός και υδρολυτικά ένζυμα

Ο παρασιτισμός εκδηλώνεται κυρίως με την παραγωγή ενζύμων που προκαλούν λύση στα κύτταρα των φυτών ενάντια στους μύκητες. Η ιδιότητα αυτή μπορεί να αποτελέσει χρήσιμο εργαλείο στη βιολογική καταπολέμηση παθογόνων μικροοργανισμών.

Από πολύ παλιά ανακαλύφθηκε ότι υπάρχει άμεση συσχέτιση μεταξύ ανταγωνισμού μυκήτων και βακτηριακής παραγωγής υδρολυτικών ενζύμων. Η χιτίνη και η γλουκάνη είναι βασικά συστατικά των κυτταρικών τοιχωμάτων των μυκήτων, οπότε τα υδρολυτικά αυτά ένζυμα μπορούν να τις αποδιατάξουν. Το φαινόμενο κατά το οποίο παράγονται ένζυμα που προκαλούν λύση των κυττάρων των μυκήτων είναι μορφή παρασιτισμού.

Η κλωνοποίηση των γονιδίων της χιτινάσης από το *Serratia marcescens* QMB1466 επέτρεψε την αποδιοργάνωση του γενετικού τύπου *chiA* και τον ανασυνδυασμό του στο χρωμόσωμα της *Serratia*. Το μεταλλαγμένο στέλεχος αυτής *chiA* παρεμποδίζει την παραγωγή χιτινάσης. Τα χιτινολυτικά ένζυμα που κωδικοποιούνται από τα γονίδια της *Serratia* έχουν εμπλακεί στην καταπολέμηση του *Fusarium oxysporum* f.sp *redolans*, *F. o. f. sp. Pisi*, *Rhizoctonia solani* και *Sclerotium rolfsii*. Ανασυνδυασμένα στελέχη *E. coli* ή *P. putida* που εκφράζουν το γονίδιο αυτό της *Serratia* έχουν χρησιμοποιηθεί επιτυχώς για την προστασία φυταρίων φασολιού από τα προαναφερθέντα παθογόνα.

Ο παρασιτισμός αυτού του είδους εκδηλώνεται κυρίως ως μυκοπαρασιτισμός και οι μύκητες που λαμβάνουν μέρος στη βιολογική καταπολέμηση παράγουν σειρά λυτικών ενζύμων, τα οποία έχουν ατομική δράση ή έχουν συνεργιστική δράση σε μείγματα μεταξύ τους ή με αντιβιοτικά για την εξασθένιση των κυτταρικών τοιχωμάτων των παθογόνων. Χαρακτηριστικό παράδειγμα μυκοπαρασιτικών μυκήτων είναι οι μύκητες



*Trichoderma spp.* και *Gliocladium virens*, αλλά η συμβολή τους στην καταστολή της ασθένειας παραμένει αβέβαιη. Απάντηση σε αυτή την αβεβαιότητα δίνουν μεταλλαγμένα στελέχη, που έχουν έλλειψη ενζύμων απαραίτητων για την αποδιοργάνωση του κυτταρικού τοιχώματος. Ο μύκητας *Trichoderma harzianum* έχει την ικανότητα να δρα ανταγωνιστικά εναντίον των μυκήτων *Sclerotium rolfsii* και *Rhizoctonia solani* (Papavizas, 1980). Το παράσιτο αναπτύσσεται με τις διακλαδώσεις των υφών του προς τον ξενιστή-στόχο, περιτυλίσσεται και προσκολλάται σ' αυτόν με κατασκευές σαν *appressoria*, όπου διατρύπουν το μυκήλιο του παθογόνου. Το *Trichoderma harzianum* παράγει τουλάχιστον τρεις χιτινάσες, καθώς και πρωτεολυτικά και γλουκανολυτικά ένζυμα. Πρόσφατα έχει επιτευχθεί η κλωνοποίηση γονιδίου του *T.harzianum*, που κωδικοποιεί στην παραγωγή της ενδοχιτινάσης καθώς και του *Gliocladium* στέλεχος 41, το οποίο προκαλεί καταστολή 95% της ασθένειας από τον *Botrytis cinerea* έναντι 20% του αγρίου τύπου (Handlesman *et al*, 1996, Thomashow *et al*, 1996).

Ο ρόλος των χιτινολυτικών ενζύμων στη βιολογική καταπολέμηση υποστηρίζεται από τους Logito *et al*, 1998, οι οποίοι μετέφεραν το γονίδιο που κωδικοποιεί την ενδοχιτινάση από το *T.harzianum*, στο καπνό και στη πατάτα και απέδειξαν ένα ευρύ φάσμα αντοχής, έναντι ενός μεγάλου βαθμού παθογόνων. Έχει αποδειχθεί ότι η επαγόμενη αντοχή που υποκινείται από το *Venturia inaequalis* στην ασθένεια apple scab σε διαγονιδιακά φυτά μηλιάς, οφείλεται στα γονίδια που έχουν εισαχθεί και κωδικοποιούν τις ενδοχιτινάσες και τις εξωχιτινάσες από το *T. atroviride*. Η βιοσύνθεση των ενζύμων ως μηχανισμός στη διαδικασία της βιολογικής καταπολέμησης, προάγεται από τους Karat *et al*, 1998, Elad & Karat, 1999, οι οποίοι υποστηρίζουν ότι η βιολογική καταπολέμηση του *B.cinerea* από το *T.harzianum* στα φύλλα φασολιού, οφείλεται στην δράση των προτεασών (ένζυμα) που παράγονται από το *T.harzianum* και αδρανοποιούν ένζυμα που παράγονται από τον *B.cinerea*.

Έχουν μελετηθεί τα αποτελέσματα της συνεργασίας των ενδοχιτινάσων και των γλιτοκίπ στην ανάπτυξη των κονιδίων του *Botrytis cinerea*. Απέδειξαν ότι ο χειρισμός των κονιδίων με το συνδυασμό του ενζύμου και του αντιβιοτικού ήταν περισσότερο αποτελεσματικός στην καταστολή του μύκητα από τον χειρισμό στον οποίο το ένζυμο ή το αντιβιοτικό τοποθετήθηκαν ξεχωριστά. Οι Schrimbock *et al*, 1994, κατέληξαν σε ανάλογο συμπέρασμα

κατά την ανάπτυξη των κονιδίων και την επιμήκυνση των υφών του *B. cinerea*, όταν μαζί με τον μύκητα τοποθετήθηκαν συνδυασμοί των υδρολυτικών ενζύμων και των peptaibols που παράγονται από το *T. Harzianum* (C.R. Howell, 2003).

#### 1.4. Επαγόμενη ανθεκτικότητα των φυτών ενάντια στις ασθένειες και ο ρόλος των πτητικών ουσιών

Επαγόμενη ανθεκτικότητα των φυτών ή ανοσοποίηση είναι μια πολύπλοκη αντίδραση με την οποία το φυτό έχει την ικανότητα να αναγνωρίζει τους εχθρούς από τους οποίους απειλείται και να αντιδρά εναντίον τους. Για να καταπολεμήσει παθογόνα και φυτοφάγα έντομα χρησιμοποιεί φυσικά και χημικά εμπόδια, όπως μηχανισμούς άμυνας, οι οποίοι ενεργοποιούνται σύμφωνα με την επίθεση. Τα φυτά εκτός από την αντίδραση τους σε μια τοπική επίθεση μπορούν να οργανώσουν μια διασυστηματική αντίδραση, η οποία αποδεικνύει αυξημένη αμυντική ικανότητα στα σημεία που βρίσκονται πιο μακριά από το σημείο της πρωταρχικής εισβολής. Αυτή η επαγόμενη διασυστηματική δράση προστατεύει το φυτό ενάντια στους εχθρούς που εισβάλουν διαδοχικά σ' αυτό.

Η μολυσματική ασθένεια είναι το αποτέλεσμα της ικανότητας του παθογόνου να υπερνικήσει τους αμυντικούς μηχανισμούς του ξενιστή. Η αναγνώριση του παθογόνου από το φυτό εξαρτάται από την ταυτόχρονη παρουσία δύο ομάδων γονιδίων των "γονιδίων ανθεκτικότητας" (R-genes) στο φυτό και των "γονιδίων μη παθογένειας" (avirulence genes) στο παθογόνο. Η αναγνώριση του παθογόνου πραγματοποιείται από ένα ολόκληρο μηχανισμό άμυνας που συνήθως περιλαμβάνει και τη γρήγορη θανάτωση των κυττάρων στο σημείο της μόλυνσης, που καλείται αντίδραση υπερευπάθειας (HR). Αν και ο χαρακτηρισμός των R-γονιδίων διευκολύνει την κατανόηση της αναγνώρισης από το παθογόνο, η ακριβής σειρά των σημάτων που οδηγεί στην ενεργοποίηση της άμυνας του ξενιστή δεν έχει πλήρως διευκρινιστεί.

Ορισμένα βακτήρια έχουν ανταγωνιστική δράση κατά παθογόνων μικροοργανισμών οφειλόμενη στην παραγωγή πτητικών ουσιών. Έχει

αποδειχθεί ότι στελεχη του *Enterobacter cloacae* ανταγωνίζονται επιτυχώς μύκητες του γένους *Rhizium sp.* σε φυτά αγγουριάς, ντοματιάς, φασολιού, βαμβακιού και τεύτλου παράγοντας ουσία, η οποία δεν είναι τοξίνη, αντιβιοτικό ή κυτταρολυτικό ένζυμο. Προκαλεί παρεμπόδιση της αύξησης των υφών του μύκητα και συγκόλληση των κυτταρικών τοιχωμάτων. Τα φαινόμενα αυτά μειώνονται παρουσία σακχάρων όπως D-γλυκόζη ή σακχαρόζη. Η ουσία προσδιορίστηκε ως αμμωνία και η παρεμποδιστική δράση της ενάντια στο *Rhizium* έχει επιβεβαιωθεί.

Αλλά βακτήρια που παράγουν πτητικές ουσίες είναι στελέχη της *Pseudomonas fluorescens*, όπως το CHA0 που παράγει δευτερογενείς μεταβολίτες, ένας εκ των οποίων είναι το υδροκυάνιο. Το ίδιο ισχύει με τα στελέχη της *P. fluorescens* CHA5, P3 και CHA77, τα οποία είναι μεταλλαγμένα (Lam *et al*, 1993).

#### 1.4.1. Επίκτητη ανοχή

Η επίκτητη ανοχή των φυτών είναι ένας ενεργός μηχανισμός, ο οποίος εξαρτάται από φυσικούς ή χημικούς φραγμούς του ξενιστή ενάντια στις ασθένειες και ενεργοποιείται από βιοτικούς ή αβιοτικούς επαγωγικούς παράγοντες.

Η επαγόμενη ανοχή διακρίνεται σήμερα στην επαγόμενη διασυστηματική ανθεκτικότητα (Induced Systemic Resistance-ISR) και επίκτητη διασυστηματική ανοχή (Systemic Acquired Resistance-SAR). Η ISR είναι η ανοχή 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.

Ορισμένοι βιολογικοί παράγοντες καταστέλλουν την ασθένεια, όταν αυτοί εφαρμοστούν μακριά από τη θέση μόλυνσης από το παθογόνο. Επίσης, λιποπολυσακχαρίτες απομονωμένοι από την κυτταρική επιφάνεια του βακτηρίου, αλλά και χημικοί διεγέρτες μπορούν να επάγουν ανθεκτικότητα το ίδιο αποτελεσματικά με ζωντανά βακτηριακά κύτταρα αποδεικνύοντας, ότι η

βιολογική αντιμετώπιση δε στηρίζεται αναγκαστικά στη μεταφορά των βακτηρίων ή ενός αντιβιοτικού μέσα στο φυτό.

Ως πλεονεκτήματα της επαγόμενης αντοχής αναφέρεται κατά τον Kuc (1990) τα ακόλουθα:

- ✓ 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 αποτελεσματικότητας της θεωρείται μεγαλύτερη από εκείνη των μυκητοκτόνων εξειδικευμένης δράσης. Το φαινόμενο εμφανίζεται διασυστηματικά, σε αντίθεση με τα μυκητοκτόνων 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 τον άνθρωπο και το περιβάλλον του, 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 και εφαρμόζονται με ψεκασμό ή αλλιώς σε άλλα φυτά μπορούν να προκαλέσουν ανοσοποίηση.
- ✓ Όλα τα φυτά έχουν την ικανότητα να επάγουν αντοχή στις ασθένειες.

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

#### 1.4.2. Τι είναι "σήμα" στην επαγόμενη αντοχή των φυτών

Η αντοχή των φυτών εναντίον παθογόνων ενεργοποιείται από διάφορα σήματα παραγόμενα από βιοτικούς παράγοντες ή αβιοτικές καταπονήσεις, όπως ξηρασία, έλλειψη θρεπτικών στοιχείων ή αλκαλιωμένο έδαφος (Bostock, 1999).

Το σήμα είναι βιοχημικός, φυσικό-ηλεκτρικός παράγοντας που παράγεται στο σημείο διέγερσης και μετακινείται διασυστηματικά στα άλλα σημεία, όπου "προετοιμάζει" τους ιστούς για ενδεχόμενη μόλυνση από το ίδιο ή άλλα παθογόνα. Παράγεται στο φύλλο διέγερσης και μετακινείται ταχύτατα και συνεχώς προς όλες τις κατευθύνσεις (ανοδικά και καθοδικά). Η ανθεκτικότητα στο φυτό αυξάνεται με το χρόνο. Πρόκειται δηλαδή για σχέση ποσοτική (Τζάμος πανεπιστημιακές παραδόσεις).

Η επαγωγή των αμυντικών αντιδράσεων πραγματοποιείται κατά την αναγνώριση των μορίων διέγερσης που παράγονται από τους εισβάλλοντες μικροοργανισμούς. Η αναγνώριση αυτή ενεργοποιεί μεταβολικά μονοπάτια μεταφοράς του ενδογενούς σήματος. Οι ενώσεις που αποτελούν το σήμα διαχέονται διασυστηματικά στους φυτικούς ιστούς, οι οποίοι είναι απομακρυσμένοι από την αρχική θέση προσβολής και ενεργοποιούν τα γονίδια των αντιμικροβιακών πρωτεϊνών ή πεπτιδίων (Thomma *et al*, 1998).

#### 1.4.3. Αμυντικοί μηχανισμοί των φυτών εναντίον ασθενειών

Τα φυτά χαρακτηρίζονται από πλήθος αμυντικών μηχανισμών έναντι των ασθενειών, οι οποίοι είναι τοπικού χαρακτήρα και λαμβάνουν χώρα στη θέση της προσβολής, έχοντας ως αποτέλεσμα τον περιορισμό της νεκρωτικής κηλίδας που δημιουργείται από την προσβολή. Οι εκλεκτοί αυτοί παραμποδιστές παθογόνων μικροοργανισμών παράγονται από το φυτό είτε πριν από την επαφή του με το παθογόνο είτε ως αποτέλεσμα της επαφής αυτής.

Τυπικά στοιχεία των μηχανισμών άμυνας του φυτού που διεγείρονται μετά την επαφή του με το παθογόνο (μύκητες, βακτήρια, ιοί) είναι:

- ✓ Σύνθεση φυτοαλεξίνων
- ✓ Σύνθεση λιγνίνης (λιγνινοθύλακες, κελλόζη)

- ✓ Αντίδραση υπερευπάθειας (HR)
- ✓ Τοξίνες
- ✓ Οξειδωτική μεταβολική έκρηξη (Reactive Oxygen species, ROS)
- ✓ Παραγωγή των παραμποδιστών πρωτεϊνών (proteinase inhibitor)
- ✓ Λυτικά ένζυμα (γλουκανάσες και χιτινάσες) (Ebel, 1998).

#### 1.4.4. Φυτοαλεξίνες

Οι φυτοαλεξίνες είναι αντιμικροβιακές ενώσεις μικρού μοριακού βάρους, που δεν παράγονται κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, αλλά μόνο ως αντίδραση των φυτικών κυττάρων σε παθογόνα ή άλλα φυσικά και χημικά ερεθίσματα ως αποτέλεσμα μόλυνσης ή καταπόνησης και είναι τοξικές σε μικροοργανισμούς (Ebel 1986 & Kuc 1995). Ο όρος "αντιμικροβιακές" είναι γενικός και κυρίως αναφέρεται στους μύκητες μια και δεν υπάρχουν αντίκες φυτοαλεξίνες και η δράση τους ως αντιβακτηριακές είναι μειωμένη (Kuc, 1995).

Τα κριτήρια που έχουν θεσπιστεί για τον έλεγχο της παρουσίας των φυτοαλεξινών στην εκδήλωση αντοχής των φυτών στην ασθένεια είναι ότι:

- ✓ πρέπει να παράγονται στο χρόνο, χώρο και σε συγκέντρωση απαραίτητη για την καταστολή του παθογόνου
- ✓ η παραγωγή τους πρέπει να είναι σύμφωνη με τις γενετικές πληροφορίες του συστήματος, δηλαδή πρέπει να συνοδεύεται με την παρουσία των συγκεκριμένων γονιδίων αντοχής.

Παρόλο που μερικές φορές η σύνθεση των φυτοαλεξινών στηρίζεται σε πολυγωνικά ενζυμικά συστήματα, τις περισσότερες φορές εξαρτάται μόνο από ένα γονίδιο αλληλεπίδρασης μεταξύ παθογόνου-ξενιστού (Sequeira, 1983).

Η συσσώρευση φυτοαλεξινών παρεμποδίζει την ανάπτυξη του παθογόνου προσφέροντας στην άμυνα του φυτού, ενώ σε περίπτωση που εκδηλωθεί ασθένεια, το παθογόνο είναι ανθεκτικό απέναντι στην παρουσία των φυτοαλεξινών, γιατί τις αποτοξικοποιεί, καταστέλλει τη συσσώρευση τους και/ή "αποφεύγει" τη διέγερση τους (Vance, 1980).

Η παραγωγή φυτοαλεξινών είναι πιθανό να καθορίζεται από την παρουσία ή την απουσία γενετικών πληροφοριών σχετιζόμενων με τη βιοσύνθεσή τους. Οι φυτοαλεξίνες παράγονται από mRNA στον πυρήνα, αφού φθάσουν σ' αυτόν τα κατάλληλα μηνύματα. Η ταχύτητα και η έκταση της συσσώρευσης τους, αλλά και η αποτοξικόποιήση τους καθορίζεται από φυτικά ένζυμα, το βαθμό απελευθέρωσης των πρόδρομων ουσιών και από το μεταβολισμό τόσο του ξενιστού, όσο του παθογόνου. Η σύνθεση τους δεν αποτελεί εξειδικευμένο βιολογικό φαινόμενο δηλαδή δεν απαιτεί την ύπαρξη κάποιων ειδικών δομικών στοιχείων από τους διεγέρτες των παθογόνων (Kuc 1995). Ίσως να προϋπάρχουν στο πρωτόπλασμα των φυτικών κυττάρων με τη μορφή πρόδρομων ουσιών, αλλά απαιτείται η σύνθεση ορισμένων ενζύμων-κλειδιά για να παραχθούν (Τζάμος πανεπιστημιακές παραδόσεις).

Οι φυτοαλεξίνες παρουσιάζουν πολυπλοκότητα στη δομή τους ως τυπικά φυτικά προϊόντα και αποτελούν παράγωγα φαινυλπροπανών, ισοπρενών και ακετυλιών. Κατατάσσονται στα ισοφλαβονοειδή, σεσκουιτερπένια, πολυακετυλιένια, διτερπένια, διυδροφενανθέρες, στυλιένια και άλλες κατηγορίες χημικών ενώσεων. Η παραγωγή φυτοαλεξινών από τους μικροοργανισμούς παρεμποδίζει τη συσσώρευση των φυτοαλεξινών (Ebel, 1986). Στα κύτταρα των ανθεκτικών φυτών συντίθενται ταχύτερα και σε μεγαλύτερες ποσότητες σε σύγκριση με τα ευαίσθητα φυτά. (Τζάμος, πανεπιστημιακές παραδόσεις).

#### **1.4.5.1. Βιοσύνθεση και κατανομή των φυτοαλεξινών**

Οι φυτοαλεξίνες παράγονται μέσω τριών μεταβολικών μονοπατιών: των φαινυλοπροπανοϊδών, των ισοφλαβονοϊδών και των τερπενοϊδών (σεσκουιτερπένια, διτερπένια). Έχουν προσδιοριστεί χημικά περισσότερες από 350 φυτοαλεξίνες από 30 φυτικές οικογένειες (Ebel, 1986).

Οι διεγέρτες των φυτοαλεξινών είναι ουσίες που απαντώνται πάνω στα κυτταρικά τοιχώματα των παθογόνων και έχουν τη δυνατότητα σε ελάχιστες ποσότητες (ng) να προκαλούν τη δυνατότητα σύνθεσης φυτοαλεξινών εξειδικευμένα. Ουσίες που απελευθερώνονται μετά τη δημιουργία πληγής ή από κάποια μόλυνση, όπως επίσης κάποια μυκητοκτόνα, οι χαμηλές θερμοκρασίες και η υπερϊώδης ακτινοβολία μπορούν να διεγείρουν τη

συσσώρευση φυτοαλεξινών, καθώς και βαρέα μέταλλα, η ριβονουκλεάση και οργανικές ουσίες (Τζάμος, πανεπιστημιακές παραδόσεις).

Οι παράγοντες που μπορούν να επηρεάζουν τη δράση των φυτοαλεξινών ως ενώσεων αντοχής είναι:

- ✓ Η αντιμικροβιακή του δράση *in vitro*
- ✓ Ο ρυθμός σύνθεσης
- ✓ Η θέση στην οποία συσσωρεύονται σε σχέση με τη θέση του παθογόνου
- ✓ Η παρουσία ενώσεων *in vitro*, οι οποίες επηρεάζουν την αντιμικροβιακή δράση των φυτοαλεξινών
- ✓ Η ανθεκτικότητα των φυτοαλεξινών στην αποτοξικοποίηση τους από τους μικροοργανισμούς ή από το φυτό
- ✓ Υπάρχει μεγάλη ποικιλομορφία στα στερεοϊσομερή των φυτοαλεξινών, όσον αφορά στην αντιμικροβιακή τους δραστηριότητα (Vance *et al* 1980).

#### 1.4.6. Σύνθεση λιγνίνης

Η λιγνίνη είναι πολυμερισμένη αρωματική ένωση μικρού μοριακού βάρους, αδιάβροχη, σχεδόν αδιαπέραστη και ανθεκτική στη χημική αποικοδόμηση της από τα παθογόνα. Συντίθεται στο κυτταρικό τοίχωμα κατά την εισβολή του παθογόνου δημιουργώντας μηχανική παρεμπόδιση. Η επαγωγή της λιγνιτοποίησης γύρω από τις θέσης προσβολής του φυτικού ιστού συνοδεύεται με την αύξηση της δραστηριότητας ενζύμων, όπως της PAL, TAL, μεθυλτρανφεράσης κ.α. (Vance *et al*, 1980). Λόγω της δράσεως των ενζύμων αυτών παρατηρείται έντονος μεταχρωματισμός (Τζάμος, πανεπιστημιακές παραδόσεις).

#### 1.4.7. Αντίδραση υπερευπάθειας

Αντίδραση υπερευπάθειας ή υπερευαισθησίας (Hypersensitive Responce, HR) είναι η ταχύτητα και η έντονη αντίδραση ενός οργανισμού στην προσβολή



ενός παθογόνου οργανισμού ή ιού, η οποία καταλήγει σε άμεση νέκρωση του προσβεβληθέντος ιστού, ώστε να παρακωλύεται η περαιτέρω επέκταση της μόλυνσης. Σε μικρό αριθμό κυττάρων πραγματοποιούνται αλλοιώσεις κυτταρολογικές, ιστολογικές και βιοχημικές, μόλις το πρωτόπλασμα έρθει σε επαφή με την επιφάνεια του μικροοργανισμού. Η αλλοίωση που προκύπτει στον ιστό δεν είναι ορατή μακροσκοπικά.

Η διαδικασία αναγνώρισης από τον ξενιστή λαμβάνει χώρα με μια σειρά ουσιές που εκλύονται με την παρουσία του παθογόνου. Η αντίδραση υπερευπάθειας πραγματοποιείται σε 70-90 λεπτά, μετά την διέγερσή της και υπάρχει και τεχνική εργαστηριακή για την επαγωγή της.

#### 1.4.8. Τοξίνες

Οι τοξίνες είναι οργανικές ουσίες, παραγόμενες από βακτήρια και μύκητες, οι οποίες συνήθως δρουν σε χαμηλή συγκέντρωση και η οποία δρα σαν δηλητήριο και επηρεάζει ανεπανόρθωτα τις φυσιολογικές λειτουργίες ενός ζωντανού οργανισμού.

Οι μη εξειδικευμένες τοξίνες (non-host-specific) είναι μεταβολικά προϊόντα ενός οργανισμού που προκαλεί τοξικά φαινόμενα σε άλλους οργανισμούς (π.χ. φασεολοτοξίνη από *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*).

#### 1.4.9. Παραγωγή ενεργού οξυγόνου

Η παραγωγή ενεργού οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS), που πραγματοποιείται κατά την οξειδωτική μεταβολική έκρηξη είναι μια γρήγορη αντίδραση των φυτών στην μόλυνση ή στους διεγέρτες, κατά την διάρκεια έκφρασης της αντιδράσεως υπερευπάθειας. Οι ROS ( $O_2^-$ ,  $H_2O_2$ ,  $OH^\cdot$ ) είναι τοξικά παράγωγα και δημιουργούνται από την αφαίρεση ενός ηλεκτρονίου από το  $O_2$ .

Η τοξικότητα των ROS έχει ως αποτέλεσμα την άμεση καταστολή του παθογόνου και νέκρωση των κυττάρων κατά την αντίδραση υπερευπάθειας. Η

νέκρωση των κυττάρων οφείλεται κατά ένα ποσοστό στην απελευθέρωση των μεγάλων ποσοτήτων ROS, ως αντιοξειδωτικές ουσίες. Μικρά επίπεδα συγκέντρωσης αντιοξειδωτικών ενζύμων έχει ως αποτέλεσμα μεγαλύτερη αντοχή ενάντια σε προσβολή από παθογόνα.

#### 1.4.10. Διεγέρτες της επαγόμενης αντοχής

Οι διεγέρτες της αμυντικής αντοχής είναι χημικές ενώσεις διαφόρων τύπων και κατηγοριών που έχουν βρεθεί να έχουν την ικανότητα να ενεργοποιούν αμυντικούς μηχανισμούς σε όλα τα είδη φυτών παίζοντας το ρόλο σήματος και αναγνωρίζονται από κατάλληλα συστήματα υψηλής εξειδίκευσης. Οι διεγέρτες μπορούν να έχουν ή όχι αντιμικροβιακή δράση, αναστέλλοντας την ανάπτυξη του παθογόνου και να επάγουν αμυντικούς μηχανισμούς στο φυτό, όπως σύνθεση φυτοαλεξινών κ.α. Οι ενώσεις που διεγείρουν ή επάγουν αμυντικούς φυτικούς μηχανισμούς διακρίνονται σε βιοτικούς (υδατάνθρακες, λιπίδια, πρωτεΐνες) και αβιοτικούς (βαρέα μέταλλα, απολυμαντικά άλατα) (Ebel, 1998).

#### 1.4.11. Βιοτικοί διεγέρτες

##### 1.4.11.1. Ολιγοσακχαρίτες

Οι ολιγοσακχαρίτες ως διεγέρτες χωρίζονται σε τέσσερις κλάσεις: (ολιγο)γλουκάνες, (ολιγο)χιτίνη, (ολιγο)χιτοσάνη μυκητολογικής προέλευσης (Ebel *et al*, 1998)

Οι γλουκάνες έχουν ικανότητα να ενεργοποιούν τη σύνθεση των φυτοαλεξινών είναι ενώσεις μικρού μοριακού βάρους και με αντιμικροβιακή δράση. Έχουν απομονωθεί από το μύκητα *Phytophthora sojae*, παθογόνου της σόγιας.

Γλουκάνες εφαρμόζονται εξωτερικά σε καλλιέργειες φυτών με ψεκασμό και παρομοίως ενεργοποιούν τη δράση των γλουκανασών. Οι γλουκανάσες

απαντώνται στα φυτικά κυτταρικά τοιχώματα και είναι υπεύθυνες για την απελευθέρωση των γλουκανών από το μυκήλιο των μυκήτων που προσπαθούν να εισβάλλουν στο τοίχωμα του φυτικού κυττάρου (Ebel *et al*, 1998).

Η χιτίνη ενεργοποιεί τους αμυντικούς μηχανισμούς και είναι η εναπόθεση λιγνίνης στο κυτταρικό τοίχωμα, η σύνθεση φυτοαλεξινών καλλόζη και η λιγνιτοποίηση (Ebel *et al*, 1998 Lyon *et al*, 1995).

Η χιτινάση (διακετυλιωμένη χιτίνη) είναι χημικά παρόμοια με τη χιτίνη και ίδιας δράσεως και μαζί με τη χιτίνη δε παρουσιάζουν εξειδίκευση του τρόπου δράσεως τους ανάλογα με τον ξενιστή. Η χιτινάση έχει παρουσιάσει μεγαλύτερη αντιμικροβιακή δράση και μεγαλύτερη διέγερση των αμυντικών φυτικών μηχανισμών, σε σχέση με τη χιτίνη (Ebel *et al*, 1998).

Τα ολιγογαλακτουρονίδια απελευθερώνονται κατά την είσοδο του παθογόνου στο φυτικό κύτταρο από την ομογαλακτουρονάνη, ένα πηκτινικό πολυσακχαρίδιο που συντίθενται από το (1,4)-α-D-γαλακτοσυλουργονικό οξύ. Το (1,4)-α-D-γαλακτοσυλουργονικό οξύ είναι σημαντικό δομικό συστατικό των κυτταρικών τοιχωμάτων των φυτών και ίσως αποτελεί έναν από τους ενδογενείς διεγέρτες των αμυντικών μηχανισμών.

#### **1.4.11.2. (Γλυκο)πεπτίδια και πρωτεΐνες**

Οι γλυκοπρωτεΐνες είναι πρωτεϊνικοί διεγέρτες που έχουν απομονωθεί, με ποικίλο βαθμό εξειδίκευσης και διεγείρουν τη σύνθεση φωτοαλεξινών κ.α.

#### **1.4.11.3. Ακόρεστα λιπαρά οξέα**

Τα ακόρεστα λιπαρά οξέα αραχιδονικό οξύ πρωτοαναφέρθηκαν ως διεγέρτες φυτοαλεξινών σε κονδύλους πατάτας, αφού το αραχιδονικό οξύ είναι ένα ακόρεστο λιπαρό οξύ με φυτοτοξική δράση που διεγείρει μηχανισμό άμυνας ανάλογα με την αντίδραση υπερευπάθειας στους πρωτοπλάστες πατάτας. Ανάλογη δράση έχει το εικοσαπενταενοϊκό οξύ, καθώς και οι μεθυλιωμένοι εστέρες και των δύο και παράγονται από το μυκήλιο του *Phytophthora infestans*. Επίσης, λιπαρά οξέα με αμυντική δράση έχουν

αναφερθεί τα: λινολενικό, λινολεϊκό και ολεϊκό οξύ. Αυτά επάγουν SAR σε φυτά πατάτας κατά την προσβολή τους από το *P. infestans* (Lyon *et al*, 1995).

#### 1.4.11.4. Αμινοξέα

Αμινοξέα τα οποία δρουν ως διεγέρτες της άμυνας των φυτών είναι τα L-μεθειονίνη, N-τριμεθυλ-L-λυσίνη, για το μη (πρωτεϊνικό αμινοξύ DL-3-άμινο-η-βουτανοϊκό οξύ και 3-αμινοβουτυρικό οξύ. Το τελευταίο φαίνεται να ενεργοποιεί το σχηματισμό των PR-πρωτεϊνών) (Lyon *et al*, 1995).

#### 1.4.11.5. Αιθυλένιο

Το αιθυλένιο παράγεται αμέσως μετά την είσοδο του παθογόνου στο φυτικό ιστό προκαλώντας την επαγωγή των μηχανισμών άμυνας. Πρόκειται για μια πτητική φυτική ορμόνη, η οποία παράγεται από τη μεθειονίνη. Η εξωγενής εφαρμογή αιθυλενίου επάγει ένζυμα που σχετίζονται με την άμυνα των φυτών και τη σύνθεση φυτοαλεξινών. Μπορεί να επάγει τη σύνθεση πρωτεϊνών παθογένεσης, όπως β-1,3 γλουκανάση, β-γλουκανάση και χιτινάση. Η παρουσία του αιθυλενίου επηρεάζει δομικές αλλαγές στο κυτταρικό τοίχωμα που αυξάνουν την αντοχή του, όπως εναπόθεση λιγνίνης και συσσώρευση υδροξυπρολινοπρωτεϊνών. Επίσης, επηρεάζει το ρυθμό ανάπτυξης των φυτών και τη γήρανση των κυττάρων. Για το λόγο αυτό δεν ενδείκνυται η εφαρμογή του αιθυλενίου στον αγρό (Sticher *et al*, 1997, Lyon *et al*, 1995).

#### 1.4.11.6. Διεγέρτες παραγόμενοι από ζύμες

Παράγωγα από τα κυτταρικά τοιχώματα ζυμών διεγείρουν αμυντικούς μηχανισμούς εναντίον ασθενειών όπως π.χ. συσσώρευση φυτοαλεξινών στις κοτυληδόνες της σόγιας και την ενεργοποίηση της PAL, όταν προσβληθεί από οίδιο. Διεγέρτες παραγόμενοι από ζύμες μειώνουν την ασθένεια από τους μύκητες *Botrytis cinerea* και *Rhizoctonia solani* στο μαρούλι, αν και *in vitro* δεν έχουν καμία δράση εναντίον αυτών των μυκήτων. Η δράση αυτών των

διεγερτών επηρεάζεται από τον τρόπο εφαρμογή τους στα φυτά. Οι πρόσθετες ουσίες που χρησιμοποιούνται για την τυποποίηση των ενώσεων αυτών επηρεάζουν την παραμονή τους πάνω στο φυτό, την αύξηση κοινής επιφάνειας, διεγερτών παραγομένων από ζύμες, με το φυτικό ιστό και αυξάνουν το βαθμό απορρόφησης τους από το φυτικό κύτταρο. Η εφαρμογή τους στον αγρό προκαλεί μείωση της παραγωγής. Η βελτίωση της τυποποίησης τους, η διευκρίνιση του κατάλληλου χρονικού σημείου και της συχνότητας εφαρμογής τους θα βοηθήσει στην αντιμετώπιση ασθενειών και στην αύξηση της παραγωγής (Lyon *et al*, 1995).

#### 1.4.11.7. Διεγέρτες παραγόμενοι από σαπρόφυτα

Μεταβολίτες που παράγονται από κάποια σαπροφυτικά βακτήρια και μύκητες διεγείρουν λανθάνοντες αμυντικούς μηχανισμούς του φυτού ενάντια σε πολλά βιοτροφικά παθογόνα, χωρίς να επιδεικνύουν άμεση δράση στα παθογόνα και αυξάνουν την παραγωγή της καλλιέργειας. Εφαρμογή μεταβολιτών του *Bacillus subtilis* σε καλλιέργεια κριθαριού μείωσε την προσβολή από οΐδιο, αυξάνοντας ταυτόχρονα την παραγωγή (Lyon *et al*, 1995).

#### 1.4.11.8. Συνθετικοί και ημισυνθετικοί διεγέρτες

Συνθετικές χημικές ουσίες έχουν δοκιμασθεί για την ικανότητα τους να προστατεύουν τα φυτά από τα παθογόνα διεγείροντας αμυντικούς μηχανισμούς. Αναφορές υπάρχουν για τις ενώσεις 2,2 διχλωρο-3,3-διμεθυλ κυκλοπροπαν καρβοξυλικό οξύ, 2,6 διχλωρο-ισονικοτινικό οξύ και το εστερικό παράγωγο του (στην κολοκυθιά η επαγόμενη αντοχή συνοδεύεται με τη δράση χιτινάσης). N-φαινυλσουλφοονυλ-2-χλωρο-ισονικοτιναμίδη (PBSI), προμπεναζόλη, διαλύματα των  $K_3PO_4$ ,  $K_2HPO_4$ ,  $Na_3PO_4$ ,  $Na_2HPO_4$ , EDTA και την υπεριώδη ακτινοβολία.

Η προμπεναζόλη και οι μεταβολίτες της διεγείρουν τη σύνθεση των μυκητολογικών λιπαρών οξέων, όπως το α-λινολενικό οξύ και αυξάνουν τη συγκέντρωση της PAL, της κατεχόλης, μεθυλτρανσφεράσης και περοξειδάσης,

ένζυμα που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση λιγνίνης. Τα διαλύματα των  $K_3PO_4$ ,  $K_2HPO_4$ ,  $NaPO_4$ ,  $Na_2HPO_4$  αυξάνουν τη συγκέντρωση της περοξειδάσης και της χιτινάσης (Lyon *et al.* 1995). Ημισυνθετικοί διεγέρτες είναι ορισμένες χημικά τροποποιημένες βιοτικές ενώσεις με τις οποίες επιτυγχάνεται η μετατροπή τους σε ανενεργούς διεγέρτες ή αύξηση της δράσης τους (Lyon *et al.* 1995).

#### 1.4.12. Λόγοι απώλειας της απόδοσης ανταγωνιστών

- ✓ Απώλεια της ικανότητας ανταγωνισμού και επιβίωσης στη φύση. Τα χαρακτηριστικά που συμβάλλουν στον ανταγωνισμό των μικροοργανισμών στη ριζόσφαιρα είναι: 1.τα πολυσακχαρίδια στην επιφάνεια του κυττάρου 2.κρόσσια (Fimbriae-pili) 3. μαστίγια 4. το φαινόμενο του χημειοτακτισμού 5. η αντοχή στην οσμωτική πίεση 6. ο μηχανισμός χρησιμοποίησης των υδατανθράκων. Αυτά τα χαρακτηριστικά είναι πάρα πολύ ευαίσθητα και υπάρχει πιθανότητα να καταστραφούν κατά την *in vitro* ανάπτυξη του βακτηρίου.
- ✓ Απουσία του παθογόνου-στόχου ή επαφή με ένα παθογόνο-μη στόχο. Τα βακτήρια-ανταγωνιστές αυξάνουν το ρυθμό ανάπτυξης του φυτού μειώνοντας τη ζημιά από τα παθογόνα. Αυτή η θετική τους δράση δεν σημειώνεται όταν απουσιάζει το παθογόνο ή όταν οι συνθήκες του περιβάλλοντος είναι ακατάλληλες για την εκδήλωση της ασθένειας.
- ✓ Διακύμανση πληθυσμού του βακτηρίου κατά τον αποικισμό της ριζόσφαιρας. Η διακύμανση του πληθυσμού του ανταγωνιστικού βακτηρίου από φυτό σε φυτό και από ρίζα σε ρίζα σε ένα δεδομένο φυτό είναι πιθανότατα ο κυριότερος λόγος των αντιφατικών αποτελεσμάτων της βιολογικής αντιμετώπισης των παθογόνων με ριζοβακτήρια. Ο αποικισμός της ριζόσφαιρας αποτελεί βασικό χαρακτηριστικό του βακτηριακού στελέχους για επιτυχή βιολογική αντιμετώπιση παθογόνου. Ωστόσο δεν έχει μελετηθεί ακόμη λεπτομερώς η επίδραση του επιπέδου του πληθυσμού του ανταγωνιστικού βακτηρίου στον πληθυσμό του παθογόνου και στη μείωση της έντασης της ασθένειας. Έχει διαπιστωθεί ότι κατά μήκος μιας ρίζας, ο πληθυσμός του

εισαγόμενου βακτηρίου στο έδαφος μπορεί να ποικίλει κατά αρκετές μονάδες. Τα μεγαλύτερα επίπεδα πληθυσμού του βακτηρίου σημειώνονται στα σημεία παρουσίας του παθογόνου και μειώνονται προς το ακρορρίζιο (Weller, 1998).

### **1.5. Οι Βάκιλλοι ως ανταγωνιστικά βακτήρια κατά φυτοπαθογόνων μικροοργανισμών**

Οι βάκιλλοι είναι υποχρεωτικά αερόβια βακτήρια, τα οποία ανήκουν στην οικογένεια *Bacillaceae*. Έχουν σχήμα ραβδοειδές, είναι θετικοί στη δοκιμή καταλάσης, αρνητικοί στην οξυάντοχη χρώση και σχηματίζουν ενδοσπόρια. Το ενδοσπόριο αυτό είναι κύτταρο το οποίο έχει μεταπέσει σε ληθαργική κατάσταση και έτσι μπορεί να επιβιώνει παθητικά επί μακρόν. Το ενδοσπόριο είναι εξαιρετικά ανθεκτικό στην ξηρασία, θερμότητα, ακτινοβολίες (υπεριώδης, X, γ) καθώς και σε πολλές χημικές ουσίες. Οι ιδιότητες αυτές του ενδοσπορίου καθιστούν τους βάκιλλους, ιδιαίτερα ανθεκτικούς στις εδαφοκλιματικές συνθήκες και εδραιώνουν τη χρήση τους, ως βιολογικούς ανταγωνιστές. Ανάλογα με τη μορφολογία και τη θέση του στο κύτταρο του ενδοσπορίου, οι βάκιλλοι διαιρούνται σε τρεις ομάδες (group I, II, III). Είναι ακίνητοι ή κινητοί, με τη βοήθεια πλευρικών μαστιγίων, ετερότροφοι και αερόβιοι ή προαιρετικά αναερόβιοι. Η περιεκτικότητα σε G+C του DNA κυμαίνεται μεταξύ 32%-62%.

Οι βακίλλοι είναι θετικοί κατά Gram, πλην όμως εξαιρέσεων στην ομάδα III, όπου το 46% των βακτηρίων εμφανίζονται να μην είναι σταθερά κατά Gram μετά από εξάωρη επώαση και το 40% να είναι Gram αρνητικά. Υπάρχει η εσφαλμένη εντύπωση ότι όλοι οι βάκιλλοι είναι Gram<sup>+</sup>, από παρατήρηση που προέρχεται από το χειρισμό των σημαντικών στην ιατρική βακίλλων, όπως το *Bacillus anthracis*. Στο έδαφος όμως, έχουν βρεθεί και Gram<sup>-</sup> βάκιλλοι, γι' αυτό και η ταυτοποίηση ενός βάκιλλου πρέπει να βασίζεται όχι μόνο στη χρώση Gram, αλλά και σε άλλες δοκιμές (Leary *et al.*, 1988).

Αν και τα ανταγωνιστικά βακτήρια σε αντίθεση με τους ανταγωνιστές μύκητες, παρουσιάζουν μείωση των πληθυσμών τους μετά την εφαρμογή της

ηλιοαπολύμανσης, έχουν απομονωθεί πληθυσμοί των ειδών *Bacillus spp.* από ηλιοαπολυμανθέντα εδάφη, οι οποίοι αυξάνονται γρήγορα συμβάλλοντας στην επαγωγή της κατασταλτικότητας (Αντωνίου, 1995).

Γενικά, φαίνεται ότι η μείωση του πληθυσμού τους κατά τη διάρκεια της ηλιοαπολύμανσης είναι μικρότερη από την αντίστοιχη μείωση των άλλων βακτηρίων, πιθανότατα λόγω της σποριογόνου ικανότητάς τους. Έχει αποδειχθεί επίσης, ότι οι βάκιλλοι βελτιώνουν το ρυθμό ανάπτυξης των φυτών (Gamliel *et al.*, 1991).

Η παρουσία του βάκιλλου επιφέρει μορφολογικές και δομικές αλλαγές στην υφή του μύκητα για τις οποίες είναι υπεύθυνη η παρουσία των παραγόμενων αντιβιοτικών. Ειδικότερα, παρατηρείται διόγκωση στο άκρο της υφής, ακανόνιστη διακλάδωση και ανάπτυξη των υφών, υφές κενές από πρωτόπλασμα. Κάποιες υφές διαρρηγνύονται και το κυτόπλασμα διαχέεται στο περιβάλλον και τα μικροσκληρότια είναι κακοσχηματισμένα.

Από το γένος *Bacillus*, ιδιαίτερη σημασία έχει το είδος *B. subtilis*, όσον αναφορά στην ανταγωνιστική δράση του εναντίον φυτοπαθογόνων μικροοργανισμών και την θετική του επίδραση στην ανάπτυξη των φυτών. Ο *B. subtilis* έχει χιτινολυτική δράση, παράγοντας μεγάλες ποσότητες β-γλουκανάσης, η οποία είναι υπεύθυνη για την διάσπαση των κυτταρικών τοιχωμάτων των μυκήτων. Τα αντιβιοτικά που έχουν ανιχνευθεί να παράγονται από τον βάκιλλο είναι η μυκοβακιλίνη, η ιτουρίνη Α, η βακιλλομυκίνη, η μικοσουμπιλίνη, η φουγιστατίνη, η σαμψορίνη, η βακιλλισίνη και η φενκιμυσίνη (Berg *et al.*, 1994). Οι *Bacillus cereus* και *B. thuringiensis* παράγουν τα αντιβιοτικά ζβιττερμισίνη-Α και/ή το αντιβιοτικό-Β. Για την καταπολέμηση των εδαφογενών παθογόνων, τα σποριογόνα βακτήρια έχουν εμπορικά πλεονεκτήματα για την παραγωγή ενός σταθερού προϊόντος με μεγάλη διάρκεια ζωής. Ένα στέλεχος του *B. subtilis* το A13 αποτελεί το εμπορικό βιολογικό σκεύασμα Quantum-4000 από την εταιρεία Abbott και έχει αποδειχθεί ότι είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικό εναντίον παθογόνων σε σπορεία και εφαρμόζεται ως επενδυτικό σπόρων βάμβακος και αραχίδας (Weller, 1988).



## 1.6. Το *Enterobacter cloacae* και η ικανότητά του να προστατεύει τα φυτά έναντι παθογόνων μικροοργανισμών

Η καταστολή μιας ασθένειας και η προαγωγή της ανάπτυξης των φυτών εξαρτάται από την αλληλεπίδραση μεταξύ φυτού και μικροοργανισμού. Ο ανταγωνισμός μεταξύ βακτηρίων, ο οποίος είναι συνδεδεμένος με τα φυτά και των παθογόνων θεωρείται ένα σημαντικό μέσο καταστολής των ασθενειών (Van Dijk & Nelson, 2000)

Το *Enterobacter cloacae* είναι ένας οργανισμός που συναντάται συχνά στη ριζόσφαιρα των φυτών (Lorito *et al.*, 1993). Είναι ένα αποτελεσματικό ριζοβακτήριο, κυρίως στον έλεγχο των ασθενειών που προκαλούνται από το *Pythium* (Kegeyama & Nelson, 2003).

Το γένος *Enterobacter* ανήκει στο βασίλειο των βακτηρίων στην κλάση των *Gammaproteobacteria* και στην τάξη των *Enterobacteriales* της οικογένειας των *Enterobacteriaceae*.

Το *Enterobacter cloacae* μπορούμε να το συναντήσουμε σε διάφορες βιβλιογραφίες και σαν *Aerobacter cloacae*, *Aerobacter cloacae*, *Cloaca cloacae*, *Bacterium cloacae* και *Babillus cloacae*.

Έχει αποδειχθεί ότι ο ανταγωνισμός μεταξύ του *E. cloacae* και του *Pythium* για την ακόρεστη αλυσίδα των λιπαρών οξέων που παράγεται από το φυτό συμβάλλει στην καταστολή της ασθένειας που προκαλείται από το *Pythium*. Η ανάπτυξη του *Pythium* εξαρτάται από την παρουσία λιπαρών οξέων και άλλων λιπιδίων. Το *E. cloacae* έχει την ικανότητα να μεταβολίζει γρήγορα τα λιπαρά οξέα. Ο μεταβολισμός των λιπαρών οξέων από το *E. cloacae* νωρίς κατά την ανάπτυξη των σπερμάτων εμποδίζει την μόλυνση του σπόρου από τον μύκητα και προστατεύει τα φυτά από την σήψη.

Αφού αποδείχθηκε ότι κατά την παρουσία του *E. cloacae* τα λιπαρά οξέα που εκκρίνονται από τους σπόρους και τις ρίζες χρησιμεύουν στο να μειώνουν την ανάπτυξη του *Pythium*, δημιουργήθηκαν στελέχη του *E. cloacae* για να αποτιμηθεί ο ρόλος του στο μεταβολισμό των λιπαρών οξέων, στην καταστολή της ανάπτυξης των σποριαγγείων του *Pythium* και επομένως στην καταστολή της μόλυνσης. Τα δυο μεταλλαγμένα στελέχη του *E. cloacae*, EcCT-501R3, Ec31 (*fadB*) και EcL1(*fadL*), απέτυχαν να μεταβολίσουν το λινολεϊκό

οξύ και να καταστείλουν την ασθένεια που δημιουργείται από το *Pythium* στα σπέρματα του βαμβακιού (Van Dijk & Nelson, 2000).

Το *E. cloacae* είναι αποτελεσματικό όσον αφορά την καταστολή της σήψης του *Pythium ultimum*, μόνο στα φυτά των οποίων οι εκκρίσεις περιέχουν χαμηλά ποσοστά υδρογονανθράκων στις εκκρίσεις τους. Σε επιπλέον πειραματικές διαδικασίες προστέθηκαν μαζί με το *E. cloacae* στη ριζόσφαιρα του αγγουριού μόνο-, δι- και τρισακχαρίτες, έτσι αποδείχθηκε ότι κάποια σάκχαρα (D-γαλακτόζη, D-γλυκόζη, σουκρόζη και β-μέθυλ-D-γλυκοσίδιο) μειώνουν σημαντικά ως βιοπαράγοντες, τη σήψη που προκαλείται από το *Pythium*, όπου άλλα σάκχαρα (3-0-μέθυλ-D-γλυκόζη, D-τρεχαλόζη, L-γλυκόζη, L-σορβόζη) δεν την μειώνουν. Οι D-γαλακτόζη, D-γλυκόζη, σουκρόζη και β-μέθυλ-D-γλυκοσίδιο υποστηρίζουν την ανάπτυξη του *E. cloacae*, ενώ οι 3-0-μέθυλ-D-γλυκόζη, D-τρεχαλόζη, L-γλυκόζη δεν την υποστηρίζουν. Κανένα από τα σάκχαρα που χρησιμοποιήθηκαν δεν αύξησε τον αποικισμό ή τη μόλυνση από το *Pythium* στα σπέρματα αποδεικνύοντας ότι οι διαφορετικές παρατηρήσεις οφείλονται στις επιδράσεις του *E. cloacae*. Τα σάκχαρα χρησιμοποιούνται από το *E. cloacae* ως πηγές ενέργειας και άνθρακα κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης των σπερμάτων.

Τα είδη των εκκρίσεων των σπόρων και η απελευθέρωση των απαγωγέων ανάπτυξης των σποριαγγείων του *Pythium* ποικίλουν ανάμεσα στα φυτά που εξετάστηκαν. Το *E. cloacae* είναι αποτελεσματικό στο να ελέγχει τη σήψη, όταν τοποθετείται στους σπόρους του καρότου, του βαμβακιού, του αγγουριού, του μαρουλιού, του ρεπανιού, της ντομάτας και του σιταριού, αλλά δεν μπορεί να προστατέψει το καλαμπόκι και το φασόλι από τη σήψη. Οι σπόροι των φυτών, όπως του καλαμποκιού και του φασολιού, έχουν υψηλά ποσοστά εκκρίσεων, ενώ οι σπόροι του βαμβακιού και του αγγουριού έχουν πολύ μικρότερα ποσοστά (Kageyama & Nelson, 2003).

Επιπλέον παρουσιάζεται συνεργασία μεταξύ του *E. cloacae* και των χιτινολυτικών ενζύμων από το *T. harzianum*, όσον αφορά την καταστολή των ασθενειών των φυτών. Η παρουσία των χιτινολυτικών ενζύμων επηρεάζει το πληθυσμό του *Enterobacter cloacae*, με δυο τρόπους: 1. η βακτηριακή ανάπτυξη εντείνεται 2. η ικανότητα των βακτηριακών κυττάρων να προσκολλώνται στις υφές του μύκητα μεταβάλλεται σημαντικά.

Η έκφραση των γονιδίων της χιτινάσης του *T. harzianum* και ένας αποτελεσματικός μηχανισμός για την έκκριση των χιτινολυτικών ενζύμων, στο στέλεχος E6 του *Enterobacter cloacae* αυξάνει την αποτελεσματικότητα του στελέχους στην καταστολή των ασθενειών και την ικανότητα του βακτηρίου να προστατεύει τα σπέρματα ή άλλα μέρη των φυτών, ανεξάρτητα από το ποσοστό των υδρογονανθράκων που εκκρίθηκαν κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης των σπερμάτων.

Στο στέλεχος E6 του *E. cloacae*, δεν εντοπίστηκαν αντιβιοτικά, τοξίνες και ένζυμα που προκαλούν λύση των κυττάρων, εντοπίστηκαν πτητικοί και μη πτητικοί αντιμυκητιακοί μεταβολίτες. Οι Howel *et al*, 1988 απέδειξαν ότι η αμμωνία είναι ένας πτητικός αντιμυκητιακός μεταβολίτης που παράγεται από το στέλεχος E6-pif του *E. cloacae*, μια μετάλλαξη του στελέχους E6 ανθεκτική στη ριφαμπικίνη.

Το σιδηροφόρο αεροβακτήνη παράγεται από έξι στελέχη του *Enterobacter cloacae* αλλά δεν παρατηρείται η εμπλοκή του στην καταστολή του *Pythium ultimum*. Το στέλεχος E6 περιέχει αντιμυκητιακά στοιχεία ικανά να παράγουν μετρίου βαθμού αναστολή της ασθένειας που προκαλούνται από τα *B. cinerea*, *F. solani*, *U. necator*. Στο στέλεχος E6 εντοπίστηκε ενδοχιτινάση, η οποία είχε χαμηλό επίπεδο δράσης. Αυτά τα αποτελέσματα είναι αντίθετα με αυτά των Roberts & Sheets, 1991, οι οποίοι ανακάλυψαν ότι η N-acetyl-β-glucosaminidase παρουσιάζει δράση στο ίδιο στέλεχος του *E. cloacae*, αλλά όχι η ενδοχιτινάση ή η χιτοβιοσιδάση. Αυτή η ασυμφωνία μπορεί να οφείλεται στις διαφορές των μέσων στα οποία καλλιεργήθηκαν ή στο ένζυμο που χρησιμοποιήθηκε για τη μέτρηση. (Lorito *et al*, 1993).

## Κεφάλαιο 2<sup>ο</sup>

### Υλικά και μέθοδοι.

#### 2.1. Διατήρηση του βακτηρίου *Enterobacter cloacae* και του μύκητα *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis lycopersici*

Το βακτηριακό στέλεχος του *Enterobacter cloacae* διατηρείται στο εργαστήριο σε στερεό θρεπτικό υλικό PSM στους 4 °C. Επιλέχθηκε το συγκεκριμένο θρεπτικό υλικό, έναντι άλλων κοινών θρεπτικών υλικών βακτηρίων, γιατί είναι ημιεπιλεκτικό κάτι που μειώνει τις πιθανότητες επιμολύνσεων. Ανακαλλιέργεια του βακτηρίου γίνονταν κάθε μήνα. Παράλληλα, και προκειμένου να διασφαλισθεί η διατήρηση του συγκεκριμένου στελέχους, είχε ληφθεί μέριμνα έτσι ώστε να υπάρχει απόθεμα (stock) γλυκερόλης στους -80 °C.

Οι στερεές καλλιέργειες του παθογόνου μύκητα *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis lycopersici* ανανεώνονταν κάθε μήνα. Χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό υλικό PDA και η φύλαξη γινόταν στους 4 °C.

#### 2.2. Ανάπτυξη του *Enterobacter cloacae* σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα

Η ανάπτυξη του γινόταν σε υγρό θρεπτικό διάλυμα (PSM)<sup>1</sup> (αφού αυτό αποστειρώνονταν στο αυτόκαυστο στους 121 °C για 20 λεπτά και υπό πίεση 1,1 Atm) το οποίο εμβολιάζονταν υπό ασηπτικές συνθήκες από στερεή καλλιέργεια του *Enterobacter cloacae*. Οι φιάλες με το εμβολιασμένο θρεπτικό υλικό τοποθετούνταν στην συνέχεια σε κατάλληλη θερμοκρασία (25°C) υπό ανάδευση στις 150 στροφές ανά λεπτό έτσι ώστε να εξασφαλίζεται ο αερισμός τους. Η καλλιέργεια επωάζονταν για 48 ώρες και μετά το πέρας αυτού του χρονικού διαστήματος αποκτούσε ένα χαρακτηριστικό φωτεινό πράσινο χρώμα..

### 2.3. Απομόνωση του εξαντλημένου θρεπτικού υποστρώματος

Το εξαντλημένο θρεπτικό υπόστρωμα *Enterobacter cloacae* λαμβάνονταν ως εξής :

Η υγρή καλλιέργεια του βακτηρίου, η οποία είχε αναπτυχθεί όπως περιγράφηκε προηγουμένως, μεταφέρονταν σε κατάλληλους σωλήνες φυγοκέντρου. Στην συνέχεια ακολουθούσε φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 9000 στροφές ανά λεπτό. Μετά το τέλος φυγοκέντρησης παραλαμβάνονταν προσεκτικά το υπερκείμενο υγρό θρεπτικό έτσι ώστε να μην διαταραχθεί παραληφθεί το σχηματιζόμενο ίζημα. Η διαδικασία αυτή αποσκοπούσε στο να απομακρύνει τα βακτηριακά κύτταρα από το θρεπτικό υλικό. Το ελεύθερο από βακτηριακά κύτταρα θρεπτικό υπόστρωμα αποστειρωνόταν σε αυτόκαυστο στους 121<sup>0</sup>C για 20 λεπτά και υπό πίεση 1,1 Atm..

Θα πρέπει επίσης να αναφερθεί ότι δεν υπήρχε δυνατότητα άπαξ δημιουργίας αποθέματος εξαντλημένου θρεπτικού υποστρώματος. Και αυτό γιατί αυτό υφίσταντο αλλοίωση, πιθανά από οξείδωση. Είναι χαρακτηριστικό ότι συνήθως μετά από μερικές μόνο μέρες αποθήκευσης του εξαντλημένου θρεπτικού υποστρώματος αυτό έχανε το χαρακτηριστικό πράσινο χρώμα και ελάμβανε ένα βαθύ κόκκινο. Για τον λόγο αυτό και προκειμένου να ελαχιστοποιηθούν οι πιθανότητες καταστροφή του υποθετικού παράγοντα-μεταβολίτη που σχετίζεται με την ικανότητα προστασίας των φυτών από το συγκεκριμένο βακτήριο, η διαδικασία που αναφέρθηκε παραπάνω επαναλαμβανόταν κάθε φορά που χρειάζονταν να προστεθεί εξαντλημένο θρεπτικό υλικό στα φυτά ντομάτας.

### 2.4. Συνθήκες ανάπτυξης του *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis lycopersici* (FORL)

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε το παθοσύστημα της ντομάτας και του μύκητα *Fusarium oxysporum* f.sp *radicis lycopersici* (FORL). Προκειμένου να παραληφθούν τα σπόρια από το μύκητα με τα οποία θα γινόταν η μόλυνση του υποστρώματος ανάπτυξης φυτών ντομάτας, ακολουθήθηκε διαδικασία κατά την οποία το θρεπτικό υλικό PDB

εμβολιάστηκε υπό ασηπτικές συνθήκες με ένα κομμάτι στερεού ανακαλλιευγόμενου μύκητα και στη συνέχεια η φιάλη που περιείχε το εμβολιασμένο πλέον θρεπτικό υλικό επώασθη υπό ανάδευση (150 στροφές ανά λεπτό στους 25<sup>0</sup>C). Η επώαση, η οποία σημειωτέον γινόταν στο σκοτάδι διήρκησε περίπου τέσσερις ημέρες. Μετά το πέρας αυτού του χρονικού διαστήματος το μυκήλιο του μύκητα απέκτησε ένα ελαφρά ερυθρό χρώμα.

Η παραλαβή των κονιδίων του μύκητα έγινε μετά από στράγγιση της καλλιέργειας μέσα από κατάλληλο ύφασμα (τυρόπανο) για την απομάκρυνση του μυκηλίου. Το διήθημα φυγοκεντρήθηκε, στις 5000 στροφές, για πέντε λεπτά. Τα κονίδια του μύκητα μετά το τέλος της φυγοκέντρωσης κατακάθονταν με μορφή ιζήματος, το οποίο και επαναδιαλύονταν σε φυσιολογικό ορό (0,5% κ.ο. NaCl). Η συγκέντρωση των κονιδίων προσδιορίζονταν με τη χρήση αιματοκυτόμετρου.

## 2.5. Συνθήκες ανάπτυξης των φυτών ντομάτας

Σπόροι ντομάτας (*Lycopersicon esculentum*, ποικιλίας ACE 55) απολυμαίνονταν επιφανειακά με εμβάπτιση τους σε 5% NaClO. Στη συνέχεια οι σπόροι ξεπλένονταν σχολαστικά με άφθονο αποστειρωμένο νερό. Ακολούθησε φύτευση τους σε φυτοδοχεία χωρητικότητας 300 cm<sup>3</sup> (επτά σπόροι ανά γλάστρα) στα οποία είχε προστεθεί τύρφη. Το pH της τύρφης είχε προηγουμένως ρυθμιστεί στην τιμή 6,5, με την προσθήκη CaCO<sub>3</sub> σε τελική συγκέντρωση 6% κ.β. Πριν τη σπορά έγινε η βασική λίπανση με την προσθήκη 0,32 g λιπάσματος (20-20-20) ανά φυτοδοχείο. Η ανάπτυξη των φυτών έγινε σε θάλαμο ανάπτυξης φυτών στους 25<sup>0</sup>C και φωτοπερίοδο 16 ωρών. Οι συνθήκες αυτές διατηρήθηκαν έως την μόλυνση των φυτών με το παθογόνο

Τα φυτοδοχεία ποτίζονταν καθημερινά με νερό στο αρχικό τους βάρος και μια φορά την εβδομάδα με θρεπτικό διάλυμα.



**ΕΙΚΟΝΑ 1.** Φυτά ντομάτας στον θάλαμο ανάπτυξης μετά την μόλυνση με το *Fusarium oxysporum* sp. *radicis lycopersici* (FORL) και την εκδήλωση των πρώτων συμπτωμάτων της ασθένειας.

## 2.6. Σχεδιασμός πειράματος

Χρησιμοποιήθηκε το πειραματικό σχέδιο των τυχαιοποιημένων πλήρων ομάδων. Η κάθε ομάδα αποτελούταν από πέντε γλαστράκια-επαναλήψεις με πέντε φυτά η ανά φυτοδοχείο.

Η πρώτη ομάδα φυτοδοχείων ποτίζονταν μόνο με νερό, και αποτελούσε πείραμα αναφοράς.

Η δεύτερη ομάδα ποτίζονταν με θρεπτικό διάλυμα PSM μια φορά την εβδομάδα ενώ τις υπόλοιπες ημέρες ποτιζόταν με νερό. Ο χειρισμός αυτός αποτελούσε το δεύτερο πείραμα αναφοράς.

Η τρίτη ομάδα ποτίστηκε μια φορά με το εξαντλημένο θρεπτικό υπόστρωμα (την πρώτη εβδομάδα μετά την φύτευση). Στην συνέχεια γινόταν πότισμα μια φορά την εβδομάδα με το PSM και καθημερινά με νερό.

Η τέταρτη ομάδα ποτίστηκε δυο φορές σε δυο διαδοχικές εβδομάδες με το εξαντλημένο θρεπτικό υπόστρωμα. Στην συνέχεια γινόταν πότισμα μια φορά την εβδομάδα με το PSM και καθημερινά με νερό.

Η πέμπτη ομάδα ποτίστηκε τρεις φορές σε τρεις διαδοχικές εβδομάδες με το εξαντλημένο θρεπτικό υπόστρωμα. Στην συνέχεια γινόταν πότισμα μια φορά την εβδομάδα με το PSM και καθημερινά με νερό.

Η έκτη ομάδα ποτίστηκε τέσσερις φορές σε τέσσερις διαδοχικές εβδομάδες το εξαντλημένο θρεπτικό υπόστρωμα. Στην συνέχεια γινόταν πότισμα μια φορά την εβδομάδα με το PSM και καθημερινά με νερό.

Η έβδομη ομάδα ποτίστηκε πέντε φορές σε πέντε διαδοχικές εβδομάδες με το εξαντλημένο θρεπτικό υπόστρωμα. Στη συνέχεια μια φορά την εβδομάδα με PSM και καθημερινά με νερό.

Τέλος, η όγδοη ομάδα ποτίστηκε έξι φορές σε έξι διαδοχικές εβδομάδες με το εξαντλημένο θρεπτικό υπόστρωμα.

**ΠΙΝΑΚΑΣ 1. Πότισμα των φυτών καθ' όλη τη διάρκεια της πειραματικής μελέτης**

ΟΜΑΔΑ	Βασικό πότισμα	Αριθμός ποτισμάτων	Υπόλοιπα ποτίσματα
1.	H <sub>2</sub> O	καθημερινά	-
2.	PSM	Μια φορά (κάθε εβδομάδα)	Νερό καθημερινά
3.	Extra Enterobacter	Μια φορά	PSM και νερό καθημερινά
4.	Extra Enterobacter	2 φορές (δυο διαδοχικές εβδομάδες)	PSM και νερό καθημερινά
5.	Extra Enterobacter	3 φορές (τρεις διαδοχικές εβδομάδες)	PSM και νερό καθημερινά
6.	Extra Enterobacter	4 φορές (τέσσερις διαδοχικές εβδομάδες)	PSM και νερό καθημερινά



7.	Extra Enterobacter	5 φορές (πέντε διαδοχικές εβδομάδες)	PSM και νερό καθημερινά
8.	Extra Enterobacter	6 φορές (έξι διαδοχικές εβδομάδες)	PSM και νερό καθημερινά

Ένα μήνα σχεδόν μετά τη φύτευση των φυτών ντομάτας και μια φορά την εβδομάδα ποτιζόντουσαν με βασικό θρεπτικό διάλυμα φυτών γιατί η τύρφη δεν μπορούσε να καλύψει τις ανάγκες των φυτών λόγω του ότι είναι φτωχό θρεπτικό υπόστρωμα.

### 2.7. Μόλυνση των φυτών με *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis lycopersici* (FORL)

Η μόλυνση των φυτών ντομάτας έγινε στο στάδιο του πρώτου πραγματικού φύλλου, σχεδόν 12 ημέρες μετά τη φύτευση τους. Το υπόστρωμα ανάπτυξης των φυτών ντομάτας (τύρφη) εμβολιάστηκε με την προσθήκη κονιδίων του παθογόνου μύκητα FORL (τελική συγκέντρωση  $10^5$  κονίδια/cm<sup>3</sup> τύρφης).

Από τη στιγμή που έγινε η μόλυνση η θερμοκρασία του θαλάμου ανάπτυξης των φυτών ρυθμίστηκε στους 17 °C η οποία και αποτελεί την ιδανική θερμοκρασία για την εκδήλωση της φουζαρίωσης από το FORL. Τα πρώτα συμπτώματα της ασθένειας παρατηρήθηκαν 17 μέρες μετά την μόλυνση οπότε πραγματοποιήθηκε και η πρώτη μέτρηση.

**ΠΙΝΑΚΑΣ 2. Σύσταση θρεπτικών υλικών που χρησιμοποιήθηκαν για την καλλιέργεια των μικροοργανισμών και των φυτών ντομάτας.**

1.	Υγρό θρεπτικό υλικό PSM ανά lt	Σακχαρόζη 10gr γλυκερόλη 10gr Casammino acid 5gr NaH <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 1gr MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O 1gr K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> Sarcosyne trimethoprim 20mg
2.	Στερεό θρεπτικό υλικό PSM	Υγρό θρεπτικό PSM Υπόστρωμα + 1,5 % άγαρ
3	PDB ανά lt	Potato dextrose broth 24 g
4.	PDA	PDB <sup>3</sup> + 1,5 % άγαρ
5.	Θρεπτικό διάλυμα φυτών ανά lt	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O 0,5g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> KNO <sub>3</sub> K <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> 0,5 (ή 0,7Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> + 4 FeEDTA 25mg Διάλυμα ιχνοστοιχείων 0,15ml
5.	Διάλυμα ιχνοστοιχείων περιεκτικότητα ανά 450ml	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> 7,5g MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O 6,75g CuCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O 0,37g MoO <sub>3</sub> 0,15g ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O 1,18g

### ΠΙΝΑΚΑΣ 3. Μέσα για την ανάπτυξη των φυταρίων

Η λίπανση των φυτών γινόταν με τα ακόλουθα διαλύματα:

<b>ΒΑΣΙΚΟ ΘΡΕΠΤΙΚΟ ΔΙΑΛΥΜΑ</b> (περιεκτικότητα ενός λίτρου.)	
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,5g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,27g
KNO <sub>3</sub>	0,2g
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,1g
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	0,5g [ή 0,7g Ca (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O]
Fe EDTA	25mg(0,025g)
Διάλυμα ιχνοστοιχείων	0,015ml (150λ)
Απιονισμένο νερό	Μέχρι συμπλήρωσης 1 λίτρου.
<b>ΔΙΑΛΥΜΑ ΙΧΝΟΣΤΟΙΧΕΙΩΝ</b> (περιεκτικότητα σε 450ml.)	
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	7,5g
MnCl·4H <sub>2</sub> O	6,75g
CuCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,37g
MoO <sub>3</sub>	0,15g
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1,18g
<b>ΑΡΔΕΥΣΗ</b>	
Απιονισμένο νερό	Μια φορά την εβδομάδα, 10ml σε κάθε γλαστράκι.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3<sup>ο</sup>

### Αποτελέσματα – Συζήτηση

#### 3.1. Εισαγωγή

Στην παρούσα εργασία επιχειρήθηκε να μελετηθεί ο τρόπος δράσης ενός βακτηρίου το οποίο έχει βρεθεί ότι δρα κατασταλτικά έναντι φυτοπαθογόνων μυκήτων του εδάφους (Καβρουλάκης, αδημοσίευτα αποτελέσματα) το βακτήριο αυτό, το οποίο απομονώθηκε από κατασταλτικό compost εμφανίζει επισχετική δράση έναντι του μύκητα *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis lycopersici* στην ντομάτα. Μετά από προσδιορισμό της ακολουθίας του 16S rDNA γονιδίου βρέθηκε ότι αυτό είναι το *Enterobacter cloacae*.

Στη συγκεκριμένη εργασία εξετάστηκε η πιθανότητα να σχετίζεται η φυτοπροστατευτική δράση του συγκεκριμένου μικροοργανισμού με την έκκριση κάποιων μεταβολιτών. Οι ουσίες αυτές θα μπορούσαν:

- ✓ να έχουν άμεση αντιμυκητιακή δράση. Για παράδειγμα να είναι κάποια αντιβιοτική ουσία ή να έχουν υδρολυτική δράση ή/και
- ✓ να σχετίζονται με επαγωγή ενδογενών μηχανισμών άμυνας του φυτού. Είναι η περίπτωση της επαγόμενης ανθεκτικότητας (Induced Systemic Resistance) των φυτών.

Για το σκοπό αυτό ελέγχθηκε κατά πόσο η εφαρμογή (*in planta*) σε φυτά ντομάτας εξαντλημένου θρεπτικού υποστρώματος (ε.θ.υ.) με τακτικά ποτίσματα είναι ικανή να επιφέρει παρόμοια αποτελέσματα, όσον αφορά την προστασία των φυτών, με το ίδιο το βακτήριο. Η μεθοδολογία που ακολουθήθηκε καθώς και τα συμπεράσματα που προκύπτουν θα αναλυθούν παρακάτω.

### 3.2. Επίδραση της εφαρμογής εξαντλημένου θρεπτικού υποστρώματος του *Enterobacter cloacae* στην καταστολή της Φουζαρίωσης, η οποία προκαλείται από τον μύκητα FORL.

Προκειμένου να εξεταστεί η ύπαρξη κατασταλτικής δράσης του εξαντλημένου θρεπτικού υποστρώματος του βακτηρίου *Enterobacter cloacae* ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία:

Κωνικές φιάλες οι οποίες περιείχαν υγρό θρεπτικό υλικό PSM εμβολιάστηκαν με το απομονωμένο στέλεχος *Enterobacter cloacae*. Ακολούθησε επώαση όπως αναφέρεται στο κεφάλαιο των υλικών και μεθόδων. Το ε.θ.υ. παραλαμβάνονταν με φυγοκέντρηση για την απομάκρυνση των βακτηριακών κυττάρων. Ακολουθούσε αποστείρωση του σε αυτόκαυστο για την θανάτωση τυχόν εναπομεινάντων βακτηρίων. Η μέθοδος αυτή αποστείρωσης επιλέχθηκε για πρακτικούς λόγους αν και είχε το μειονέκτημα των αυξημένων πιθανοτήτων καταστροφής των τυχόν υπάρχοντων μεταβολιτών. Η χρήση άλλων μεθόδων (π.χ. φιλτράρισμα) δεν μπορούσε να γίνει λόγω του μεγάλου όγκου του υλικού το οποίο έπρεπε να αποστειρωθεί. Η διαδικασία παρασκευής του υλικού επαναλαμβάνονταν κάθε φορά που ποτίζονταν, με αυτό, τα φυτά ντομάτας γιατί υπήρχε ο κίνδυνος οξείδωσης και καταστροφής των υποτιθέμενων εκρινόμενων μεταβολιτών.

Σ' αυτό το πείραμα εφαρμόστηκε το σχέδιο των τυχαιοποιημένων πλήρων ομάδων. Στο σύνολο τους τα γλαστράκια ήταν 40 όπου είχαν χωριστεί σε ομάδες των 5 και ποτίζόντουσαν διαφορετικά σε κάθε ομάδα.

Για παράδειγμα η πρώτη ομάδα φυτοδοχείων ποτίζονταν μόνο με νερό και ήταν η ομάδα που αποτελούσε το μάρτυρα του πειράματος. Η δεύτερη ομάδα ποτίζόταν μια φορά κάθε εβδομάδα με PSM και καθημερινά με νερό. Η τρίτη ομάδα ποτίστηκε μόνο μια φορά με ε.θ.υ. ενώ στη συνέχεια ποτίζόταν μια φορά κάθε εβδομάδα με PSM και καθημερινά με νερό. Η τέταρτη ομάδα ποτίστηκε δύο φορές σε διαδοχικές εβδομάδες με ε.θ.υ. και στη συνέχεια μια φορά κάθε εβδομάδα με PSM και καθημερινά με νερό. Η πέμπτη ομάδα ποτίστηκε τρεις φορές σε διαδοχικές εβδομάδες με ε.θ.υ. και έπειτα μια φορά την εβδομάδα με PSM και καθημερινά με νερό. Η έκτη ομάδα ποτίστηκε τέσσερις φορές σε διαδοχικές εβδομάδες με ε.θ.υ. ενώ τον υπόλοιπο καιρό ποτίζόταν κάθε μια φορά την εβδομάδα με PSM και καθημερινά με νερό. Η

έβδομη ομάδα ποτίστηκε πέντε διαδοχικές εβδομάδες με ε.θ.υ. και στη συνέχεια μια φορά κάθε εβδομάδα με PSM και καθημερινά με νερό. Η όγδοη ομάδα ποτίστηκε έξι διαδοχικές φορές με ε.θ.υ. και στη συνέχεια μία φορά κάθε εβδομάδα με PSM και καθημερινά με νερό.

Η μόλυνση των φυτών με τον φυτοπαθογόνο μύκητα *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis lycopersici* πραγματοποιήθηκε όταν τα φυτά της ντομάτας βρίσκονταν στο στάδιο του πρώτου πραγματικού φύλλου. Στο στάδιο αυτό τα φυτά βρίσκονται περίπου δύο εβδομάδες μετά την φύτευση των σπόρων.

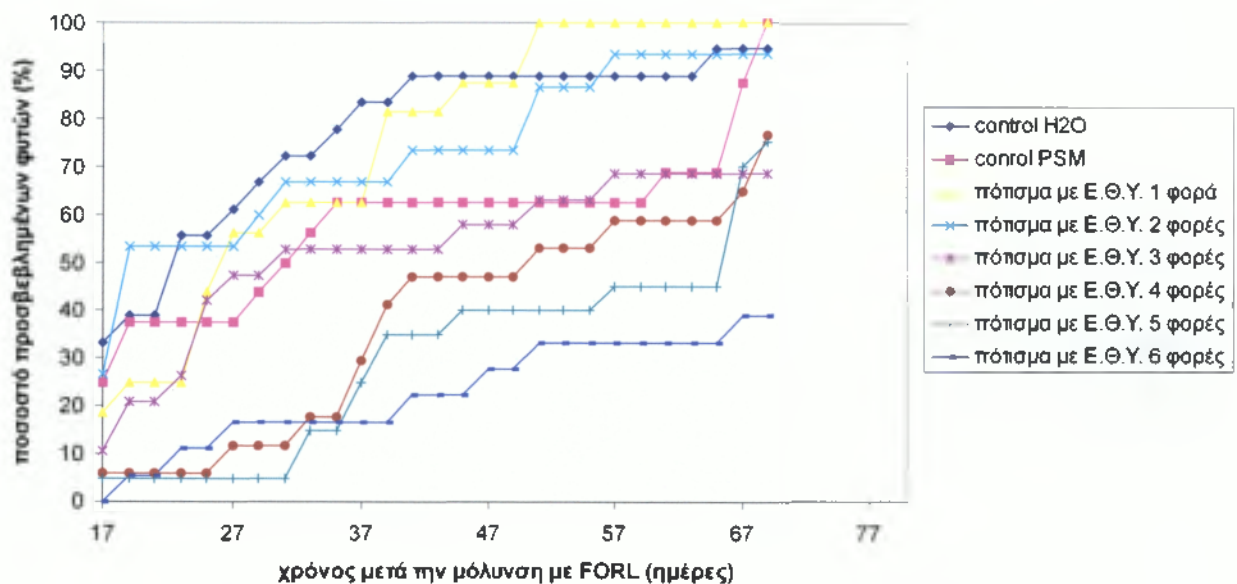
Ακολούθησε καταγραφή των θανάτων των φυτών ανά δύο ημέρες. Οι πρώτοι θάνατοι φυτών παρατηρήθηκαν 17 ημέρες μετά την μόλυνση με το παθογόνο.

Όπως φαίνεται στο σχήμα 1 δεν παρατηρούνται στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των επεμβάσεων ελέγχου (control) και των δύο πρώτων ομάδων που δέχτηκαν εξαντλημένο θρεπτικό υπόστρωμα. Με άλλα λόγια εφαρμογή ε.θ.υ. από καλλιέργεια *Enterobacter cloacae* για δύο εβδομάδες δεν είναι ικανή να προστατεύσει τα φυτά ντομάτας από το *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis lycopersici* σε επίπεδα που να διαφέρουν στατιστικά σημαντικά από τα περάματα ελέγχου. Είναι αξιοσημείωτο ότι, όπως φαίνεται και στο σχεδιάγραμμα, η ομάδα των φυτών που δέχονταν πότισμα με σκέτο θρεπτικό υλικό PSM εμφανίζεται περισσότερο ευάλωτη στον παθογόνο μύκητα. Μια πιθανή εξήγηση για την παρατήρηση αυτή είναι ότι αυτό καθαυτό το θρεπτικό υλικό επιδρά και αυξάνει την ανάπτυξη του φυτοπαθογόνου.

Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι οι υπόλοιπες επεμβάσεις (3, 4, 5 και 6) έχουν επίδραση στον ρυθμό θανάτων και είναι ικανές να μειώσουν την ένταση της ασθένειας. Μάλιστα η μείωση αυτή αυξάνεται με την αύξηση των εφαρμογών του εξαντλημένου θρεπτικού υποστρώματος. Θα πρέπει βέβαια να σημειωθεί ότι σύμφωνα με την στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων Tukeys, η οποία όμως θεωρείται σχετικά αυστηρή, σημαντική είναι μονάχα η διαφοροποίηση που παρατηρείται μονάχα στις επεμβάσεις 5 και 6.

Ένα αρχικό συμπέρασμα το οποίο θα μπορούσε να εξαχθεί από το παρόν πείραμα είναι ότι το ε.θ.υ. της καλλιέργειας του *Enterobacter cloacae* είναι ικανό να επηρεάσει την ένταση και την συχνότητα των συμπτωμάτων της ασθένειας η οποία προκαλείται από το FORL. Με άλλα λόγια το *Enterobacter*

*cloacae* πρέπει να προστατεύει τα φυτά ντομάτας με μηχανισμό ο οποίος σχετίζεται με την έκκριση μεταβολιτών. Δεν μπορεί βέβαια να διευκρινισθεί εάν αυτές οι ουσίες δρουν άμεσα πάνω στο φυτοπαθογόνο (π.χ. έχουν αντιβιοτική δράση) ή εάν σχετίζονται με επαγωγή ενδογενών άμυνας του φυτού. Αυτό που μπορεί όμως με σιγουριά να ειπωθεί, είναι ότι η φυτοπροστατευτική δράση του *Enterobacter cloacae* δεν σχετίζεται με ανταγωνισμό θρέψης με το φυτοπαθογόνο μύκητα. Υπενθυμίζεται ότι ανταγωνισμός θρέψης έχει προταθεί προκειμένου να εξηγηθεί η δράση του *Enterobacter cloacae* έναντι ωομυκήτων βαμβακιού (Van Dijk & Nelson,2000).



**ΓΡΑΦΗΜΑ 1:** Επίδραση του εξαντλημένου θρεπτικού υποστρώματος (Ε.Θ.Υ.) από την καλλιέργεια του *Enterobacter cloacae* σε φυτά ντομάτας τα οποία μολύνθηκαν με τον μύκητα *Fusarium oxysporum* f.sp. *radisis lycopersici*. Κάθε μια από τις καμπύλες αντιπροσωπεύει μια συγκεκριμένη επέμβαση. Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν με Tukey's test. Τα σημεία των επεμβάσεων που φέρουν κοινά γράμματα δεν παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Anjaiah V, Koedam N, Nowak-Thompson B, Loper JE, Hofte M, Tambong JT & Cornelis P (1998). Involvement of phenazines and anthranilate in the antagonism of *Pseudomonas aeruginosa* PNA1 and Tn 5 derivatives toward *Fusarium spp.* and *Pythium spp.* Mol. Plant-Microbe Interact. 11:847-854.

Αντωνίου Π.Π., 1995. Συμβολή της ηλιοαπολύμανσης του εδάφους στην αντιμετώπιση φυτοπαθογόνων μικροοργανισμών και η επίδραση της στην ανταγωνιστική μικροχλωρίδα του εδάφους. Διδακτορική Διατριβή, Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας Γ.Π.Α.

Baker R., 1968. Mechanisms of biological control of soil-borne pathogens. Annual Review of Phytopathology 6:263-294.

Bangera MG & Thomashow LS (1999) Identification and characterization of a gene cluster for synthesis of the polyketide antibiotic 2,4-diacetylphloroglucinol from *Pseudomonas fluorescens* Q2-87. J. Bacteriol. 181:3155-3166.

Berg G., Knaape C., Ballin G. & Seider., 1994. Biological control of *Verticillium dahliae* kleb. By natural occurring rhizosphere bacteria. Arch. Phytopathologie Pflanz., 249-262.

Bochow, H. 1992. Phytosanitary effects of *Bacillus subtilis* as biocontrol agent. Mededeligen van de faculteit Landbouwwetenschappen Universiteit Gent. 57:387-393.

Charest, P.M., Ouellette, G.B. & Pauze F.J., 1984. Cytological observations of early infection process by *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopercici* in tomato plants. Canadian Journal of Botany 62:1232-1244.

Chet I., Ordentlich A., Sapira R. & Oppenheim A., 1990. Mechanisms of biocontrol of soil-borne plant pathogens by rhizobacteria. Plant and Soil 129: 85-92.

Chin-A-Woeng TFC, Bloemberg GV, Van der Bij Aj, Van der Drift KMG, Schripsema J, Kroon B, Scheffer RJ, Keel C, Bakker PAHM, De Bruijn FJ, Thomas-Oates JE & Lugtenberg BJJ (1998). Biocontrol by phenazine-1-carboxamide producing *Pseudomonas chlororaphis* PCL 1391 of tomato root rot caused by *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici*. Mol. Plant-Microbe Interact. 10:79-86

Cook J.R., 1985. Biological control of plant pathogens: Theory to application. Phytopathology, 75:25-29.

Cook J.R., Thomashow L.S., Weller D.M., Fujimoto D., Mazzola M., Bangera G. & Kim D-S., 1995. Molecular mechanisms of defence by rhizobacteria against root disease. Proceedings of the National Academic of Sciences 92: 4197-4201.



Cook., R.J., 1993. Making greater use of introduced microorganisms for biological control of plant pathogens. *Annu . Rev. Phytopathol.* 31:53-80.

Gamlier A. & Stapleton J.J., 1993. Characterization of antifungal volatile compounds involved from solarized soil amended with cabbage residues. *Phytopathology* 83:899 -905.

Γραβάνης Θ. Φώτιος Ph.D. Γεωπόνος-Φυτοπαθολόγος Καθηγητής ΤΕΙ Λάρισας. Ειδική φυτοπροστασία, φυτά μεγάλης καλλιέργειας. Λάρισα 2001 τμήμα Φυτικής Παραγωγής.

Cronin D, Monne Loccoz Y, Fenton A, Dunne C, Dowling DN & OGara F (1997) Role of 2,4 diacetylphloroglucinol in the interactions of the biocontrol pseudomonad strain F113 with the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:1357-1361.

Datnoff, L.E., Nemecek, S., & Pernezny, K. 1995. Biological control of *Fusarium* crown and root rot of tomato in Florida using *Trichoderma harzianum* and *Glomus intraradices*. *Biological Control* 5: 427-431.

Δημόπουλος Β. Δρ. Γεωπόνος. Φυτοπροστατευτικά προϊόντα. Αθήνα 1998.

Duffy BK & Defago G (1999). Environmental factors modulating antibiotic and siderophore biosynthesis by *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strains. *Appl. Environ. Microbiol* 65:2429-2438.

Duijf, J.B., Pouhair, D., Olivain, C., Alabouvette, C. & Lemanceau, Ph.1998. Implication of systemic induced resistance in the suppression of *Fusarium* wilt of tomato by *Pseudomonas fluorescens* WCS 417r and by non-pathogenic *Fusarium oxysporum* Fo47. *European Journal of Plant Pathology* 104:35-47.

Duijf, J.B. Recorbet, Ch., Bakker, A.H.M., Peter, Loper, E., Joyce & Lemanceau, Ph. 1999. Microbial antagonism at the root level is involved in the suppression of *Fusarium* wilt by the combination of non pathogenic *Fusarium oxysporum* Fo47 and *Pseudomonas putida* WCS358. *Phytopathology* 89:1073-1079.

Ebel J., 1986. Phytoalexin synthesis: The biochemical analysis of the induction process: *Annual Review of Phytopathology* 24:235-264.

Ebel J & Mithofer A., 1998. Early events in the elicitation of plant defence. *Plant* 206:335-348.

Elad Y., Katan J & Chet I., 1980. Physical, biological and chemical integrated for soilborne diseases in potatoes. *Phytopathology* 70:418-422.

Fravel DR., 1988. Role of antibiosis in the biocontrol of plants diseases. *Annual Review of phytopathology* 26:75-91.

Fravel D.R., 1991. Efficient delivery of biocontrol agents to soil. In: Biological control of plant diseases. Progress and challenges for the future. Eds: Tjamos E.C., Papavizas G.C. & Cook R.J. NATO ASI Series A., Life Sciences, Plenum Press.

Fravel D.R., Olivain, C. & Alabouvette, C., 2003. *Fusarium oxysporum* and its biocontrol. New Phytologist 157:493-502.

Fray RG, Throup JP, Daykin M, Wallace A, Williams P, Stewart GSAB & Grierson D (1999). Plants genetically modified to produced *N*-acylhomoserine lactones communicate with bacteria. Nat. Biotech 7:1017-1020.

Gaffney TD, Lam ST, Ligon JM, Gates K, Frazelle A, Dimaio J, Hill S, Goodwin S, Torkewitz N, Allshouse AM, Kempf HJ & Beker JO (1994) Global regulation of expression of antifungal factors by a *Pseudomonas fluorescens* biological control strain. Mol. Plant-Microbe Interact. 7:455-463.

Georgakopoulos D, Hendson M, Panopoulos NJ & Schroth MN (1994) Cloning of a phenazine biosynthetic locus of *Pseudomonas aureofaciens* PGS12 and analysis of its expression *in vitro* with the ice nucleation report gene. Appl. Environ. Microbiol. 60:2931-2938.

Hammer PE, Hill DS, Lam St, Van Pee KH & Ligon JM (1997). Four genes from *Pseudomonas fluorescens* that encode the biosynthesis of pyrrolnitrin. Appl. Environ. Microbiol. 63:2147-2154.

Handilsman J. & Stabb E.V., 1996. Biocontrol of soilborne plant pathogens. Plant Cell 8:1855-1869.

Herrera-Estrella L., Rosales L.S & Rivera-Bustamante., 1996. Transgenic plants for disease control. In: Plant-microbe interactions Vol 1. Eds: Stacy G, Keen N.T.

Heungens K & Parke JL (2001). Postinfection biological control of oomycete pathogens of pea by *Burkholderia cepacia* AMMDR1. Phytopathology 91:383-391.

Ηλιόπουλος Γ. Αναστασίου. Γεωπόνος-Φυτοπαθολόγος Επίκουρος Καθηγητής ΤΕΙ. Φυτοπροστασία Ι στοιχεία φυτοπαθολογίας. Καλαμάτα 1999.

Howell CR & Stipanovic RD (1979). Control of *Rhizoctonia solani* on cotton seedlings with *Pseudomonas fluorescens* and with an antibiotic produced by the bacterium. Phytopathology 69:480-482.

Howell, C.R. 2003. Mechanisms Employed by *Trichoderma* Species in the Biological Control of Plant Diseases: The History and Evolution of Current Concepts. Plant Disease/ Vol. 87 No.1.

Jarvis, W.R., 1988. *Fusarium* crown and root rot of tomatoes. Phytoprotection 69:49-64.

Kageyama, K. & Nelson, E.B. 2002. Differential Inactivation of Seed Exudate Stimulation of *Pythium ultimum* Sporangium Germination by *Enterobacter cloacae* Influences Biological Control Efficacy on Different Plant Species. Applied and Environmental Microbiology, Feb. 2003, p.1114-1120.

Kang YW, Carlson R, Tharpe W & Schell MA (1998) Characterization of genes involved in biosynthesis of a novel antibiotic from *Burkholderia cepacia* BC11 and their role in biological control of *Rhizoctonia solani*. Appl. Environ Microbiol. 64:3939-3947.

Keel C, Wirthner P, Oberhansli T, Voisard C, Burger, Haas D & Deffago G (1990). *Pseudomonas* as antagonists of plant-pathogens in the rhizosphere-role of the antibiotic 2,4 diacetylphloroglucinol in the suppression of black root-rot of tobacco. Symbiosis 9:327-341.

Keel C, Weller DM, Natsch A, Deffago G, Cook RJ & Thomashow LS (1996). Conservation of the 2,4 diacetylphloroglucinol biosynthesis locus among fluorescent *Pseudomonas* strains from diverse geographic locations. Appl. Environ. Microbiol. 62:552-563.

Kerr A. & Tale M.E., 1984. Agrocins and the biological control of crown gall. Microbiological Sciences 1:1-4.

Kuc J., 1990. Compounds from plants that regulates or participate in disease resistance, In: Bioactive Compounds from Plants. Ciba Foundation Symposium 154, J. Willey and sons, Chichester. 213-224.

Kuc J., 1995. Phytoalexins, stress, metabolism and disease resistance in plants. Annual Review of Phytopathology 33:275-297.

Leary J.V. & Chum W.W.C., 1998. The *Bacillus* In: Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria, 2<sup>nd</sup> edition Eds: Schaad N.W., AP Press, St. Paul M.N., 120.

Leong J., 1986. Siderophores: Their biochemistry and possible role in the biocontrol of plant pathogens. Annual Review of Phytopathology 24:187-209.

Lorito, M., Di Pietro, A., Hayes, C.K., Woo, S.L & Harman, G.E. 1993. Antifungal, synergistic interaction between chitinolytic enzymes from *Trichoderma harzianum* and *Enterobacter cloacae*.

Lyon G.D., Reglinski T. & Newton A.C., 1995. Novel disease control compounds: the potential to "immunize" plants against infections. Plant Pathology 44:407-427.

Mavrodi DV., Ksenzenko VN, Bonsall RF, Cook RJ, Boronin AM & Thomashow LS (1998). A seven-gene locus for synthesis of phenazine-1-carboxylic acid by *Pseudomonas fluorescens* 2-79. J. Bacteriol 180:2541-2548.

Menzies, J.G., Koch, C. & Seywerd, F. 1990. Additions to the host range of *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. Plant Disease 74: 569-572.

McSpadden-Gardener BB, Schroeder KL, Kaloger SE, Raaijmakers JM, Thomashow LS & Weller DM (2000) Genotypic and phenotypic diversity of pH1D-containing *Pseudomonas* isolated from the rhizosphere of wheat. Appl. Environ. Microbiol. 66:1939-1946.

Milner JL, Silo-Suh L, Lee JC, He HY, Clardy J & Handelsman J (1996) Production of kanosamine by *Bacillus cereus* UW85. Appl Environ. Microbiol. 62:3061-3065.

Mishaghi I.J. & Donndelinger C.R., 1990. Endophytic bacteria in symptom-free cotton plants. Phytopathology 80:808-811.

Nakayama T, Homma Y, Hashidoko Y, Mizutani J, & Tahara S (1999). Possible role of xanthobaccins produced by *Stenotrophomonas* sp strain SB-K88 in suppression of sugar beet damping-off disease. Appl. Environ. Microbiol 55:4334-4339.

Ownley BH, Weller DM & Thomashow LS (1992). Influence of *in situ* and *in vitro* pH on suppression of *Gaeumannomyces graminis* var. *triciti* by *Pseudomonas fluorescens* 2-79. Phytopathology 82:178-184.

Παναγόπουλος Χ.Γ., 1993. Ασθένειες καρποφόρων δένδρων και αμπέλου. Εκδόσεις Σταμούλης, Αθήνα , 169-178.

Paravizas G.C. & Lumsden R.D., 1980. Biocontrol control of soilborne fungal propagules. Annual Review of Phytopathology 18: 389-413

Phae C.G., Shoda M. & Kubota H., 1990. Suppressive effect of *Bacillus subtilis* and its products of phytopathogenetic microorganism. Journal of Fermentation and Bioengineering 69:1-7

Pierson LS, Gaffney T, Lam S & Gong F (1995). Molecular analysis of genes encoding phenazine biosynthesis in the biological control bacterium *Pseudomonas aureofaciens* 30-84. FEMS Microbiol. Lett. 134:299-307

Pieterse C.M.J., Van Pelt J.A., Ton J., Parchann S., Mueller M.J., Buchala A.J., Mettraux J-P. & Van Loon L.C., 2000. Rhizobacteria-mediated induced systemic resistance (ISR) in *Arabidopsis* requires sensitivity to jasmonate and ethylene but is not accompanied by an increase in their production. Physiological and Molecular Plant Pathology 57:123-134

Roberts, D.P., Lohrke, S.M. 2003. United States Department of Agriculture-Agricultural Research Service research programs in biological control of plant diseases. Pest Manag. Sci. 59:654-664.

Saringuet A, Kraus J, Henkels MD, Muehlchen AM & Loper JE (1995). The sigma factors sigma (S) affects antibiotic production and biological control

activity of *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:12255-12259.

Sequiera L., 1983. Mechanisms of induced resistance in plants. Annual review of Microbiology, 37:51-79.

Shanahan P, O'Sullivan DJ, Simpson P, Glennon JD & O'Gara F (1992) Isolation of 2,4 diacetylphloroglucinol from a *fluorescent pseudomonas* and investigation of physiological parameters influencing its production Appl. Environ. Microbiol 58:353-358.

Sharifi-Tehrani A, Zala M, Natsch A, Moenne-Loccoz Y & Defago G (1998). Biocontrol of soil-borne fungal plant diseases by 2-4-diacetylphloroglucinol-producing *fluorescent pseudomonas* with different restriction profiles of amplified 16S rDNA. Eur. J. Plant. Pathol 104:631-643.

Silo-Suh LA, Lethbridge BJ, Raffel SI, He HY, Clardy J & Handelsman J (1994). Biological-activities of 2 fungistatic antibiotics produced by *Bacillus cereus* UW85. Appl. Environ. Microbiol. 60:2023-2030.

Slininger PJ & Jackson MA (1992). Nutritional factors regulating growth and accumulation of phenazine-1-carboxylic acid by *Pseudomonas fluorescens* 2-79. Appl. Microbiol. Biotechnol. 37:388-392.

Smith KP, Handelsman J & Goodman RM (1999) Genetic basis in plants for interactions with disease-suppressive bacteria. Proc. Nat. Ac. Sciences USA 96:4786-4790.

Stabb EV, Jacobson LM & Handelsman J (1994) Zwittermycin A-producing strains of *Bacillus cereus* from diverse soils. Appl. Environ. Microbiol. 60:4404-4412.

Stohl EA, Milner JL & Handelsman J (1999) Zwittermicin a biosynthetic cluster. Gene 237:403-411.

Τζαμος Ε.Κ., 1989. Η ηλιοαπολύμανση ως εναλλακτική μέθοδος απολυμάνσεως του εδάφους. Δελτίο Ελληνικής Εταιρίας, 23:138-157.

Τζαμος Σ.Ε., 2001. Βιοχημικοί παράγοντες ανταγωνιστικών ριζοσφαιρικών βακτηρίων που υπεισέρχονται στη βιολογική αντιμετώπιση των αδρομυκώσεων στα φυτά. Μεταπτυχιακή μελέτη, Γ.Π.Α.

Thomma B.P.H.T., Eggermont K., Penninx I.A.M.A., Mauch-Mani B., vegelsang R., Camme B.P.A. & Broekaert W.F., 1998. Separate jasmonate-dependent and salicylate-dependent defense-response pathways in Arabidopsis are essential for resistance to distinct microbial pathogens. Proceedings of the National Academic of Sciences 95:15107-15111.

Thomashow LS & Weller DM (1996). Current concepts in the use of introduced bacteria for biological disease control: mechanisms and antifungal metabolites.

In: Stacey G & Keen NT (Eds), Plant-microbe Interactions, Vol. 1, (pp 187-236). Chapman & Hall, New York.

Thomashow, L.S. & Weller D.M. 1996. Current concepts in the use of introduced bacteria for biological disease control: Mechanisms and antifungal metabolites. In: plant-microbe interactions Vol 1 Eds: Stacy G, Keen N.T.

Thomashow LS, Bonsall RF & Weller DM (1997) Antibiotic production by soil and rhizosphere microbes *in situ*. In: Hurst CJ, Knudsen GR, McInerney MJ, Stetzenbach LD & Walter MV (Eds) Manual of Environmental Microbiology, (pp 493-499). ASM Press, Washington, DC.

Vance C.P., Kirk. T.K. & Sherwood R.T., 1980. Signification as a mechanism of disease resistance. Annual Review of Phytopathology 18: 259-288.

Van Dijk, K. & Nelson, E.B. 2000. Fatty Acid Competition as a Mechanism by Which *Enterobacter cloacae* Suppresses *Pythium ultimum* Sporangium Germination and Damping-Off. Applied and Environmental Microbiology, Dec. 2000, p.5340-5347.

Vincent MN, Harrison LA, Brackin JM, Kovacevich PA, Murkerji P, Weller DM & Pierson EA (1991). Genetic analysis of the antifungal activity of a soilborne *Pseudomonas aureofaciens* strain. Appl. Environ. Microbiol. 57: 2928-2934.

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

Weller, D.M., 1988. Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. Annu. Rew Phytopathol 26: 379-407.

Wood DW, Gong F, Daykin Mm, Williams P & Pierson LS (1997) N-Acyl-homoserine lactone-mediated regulation of phenazine gene expression by *Pseudomonas aureofaciens* 30-84 in the wheat rhizosphere. J.Bacteriol. 179: 7663-7670.