

**ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ (ΤΕΙ)
ΚΑΛΑΜΑΤΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ**

**ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΑΠΟΜΟΝΩΣΕΩΝ ΤΟΥ
ΜΥΚΗΤΑ *ALTERNARIA SOLANI* Sorauer ΑΠΟ ΦΥΤΑ
ΤΟΜΑΤΑΣ ΚΑΙ ΠΑΤΑΤΑΣ**

**Πτυχιακή εργασία
της σπουδάστριας Σηφακάκη Φωτεινής**

Καλαμάτα, Σεπτέμβριος 2003

**ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ (ΤΕΙ)
ΚΑΛΑΜΑΤΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ**

**ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΑΠΟΜΟΝΩΣΕΩΝ ΤΟΥ
ΜΥΚΗΤΑ *ALTERNARIA SOLANI* Sorauer ΑΠΟ ΦΥΤΑ
ΤΟΜΑΤΑΣ ΚΑΙ ΠΑΤΑΤΑΣ**

**Πτυχιακή εργασία
της σπουδάστριας Σηφακάκη Φωτεινής**

Επιβλέπων Καθηγητής: Ηλιόπουλος Αναστάσιος

Καλαμάτα, Σεπτέμβριος 2003

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ	1
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	2
ΜΕΡΟΣ ΠΡΩΤΟ	
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑΣ	3
1.1. ΞΕΝΙΣΤΕΣ	3
1.1.1. Ιστορικό.....	3
1.1.1.1. Πατάτα	3
1.1.1.2. Τομάτα	3
1.1.2. Ταξινόμηση	4
1.1.3. Η καλλιέργεια της πατάτας στη χώρα μας	4
1.1.4. Η καλλιέργεια της τομάτας στη χώρα μας	6
1.2. ΠΑΘΟΓΟΝΟ.....	8
1.2.1. Ταξινόμηση.....	8
1.2.2. Περιγραφή-Μορφολογία.....	8
1.3. ΒΙΟΛΟΓΙΑ	15
1.3.1. Βλάστηση κονιδίων.....	15
1.3.2. Παραγωγή κονιδίων	17
1.3.3. Διασπορά κονιδίων	19
1.3.4. Διαχείμαση-Επιβίωση	21
1.3.5. Παραγωγή τοξινών.....	22
1.3.6. Κύκλος ξενιστών.....	23
1.3.7. Διαφοροποίηση ειδών του γένους <i>Alternaria</i> με τη χρήση μοριακών μεθόδων.....	23
1.4. ΑΣΘΕΝΕΙΑ	28
1.4.1. Γεωγραφική εξάπλωση	28
1.4.2. Συμπτωματολογία	28
1.4.3. Επιδημιολογία	33
1.4.4. Αντιμετώπιση.....	35
1.4.4.1. Καλλιεργητικά μέτρα.....	36
1.4.4.2. Βιολογικά μέτρα.....	36
1.4.4.3. Χημικά μέτρα	37
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	39
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	41

ΜΕΡΟΣ ΔΕΥΤΕΡΟ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΓΕΝΙΚΑ ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	43
2.1. Θρεπτικά υλικά ανάπτυξης	43
2.2. Απομονώσεις του μύκητα	44
2.3. Διατήρηση των απομονώσεων.....	44
2.4. Παραγωγή μονοκονιδιακών απομονώσεων	46
2.5. Στατιστική ανάλυση.....	47
ΠΕΙΡΑΜΑ ΠΡΩΤΟ: Σύγκριση απομονώσεων του μύκητα <i>A. solani</i> από φυτά τομάτας και πατάτας με τη χρήση μεθόδων κλασικής Φυτοπαθολογίας.....	48
Σκοπός	48
Υλικά και Μέθοδοι.....	48
1. Γραμμική αύξηση μυκηλίου	48
2. Μορφολογία αποικιών	49
3. Παραγωγή κονιδίων <i>in vitro</i>	49
4. Διαστάσεις κονιδίων	51
Αποτελέσματα.....	51
1. Γραμμική αύξηση μυκηλίου	51
2. Μορφολογία αποικιών	53
3. Παραγωγή κονιδίων <i>in vitro</i>	56
4. Διαστάσεις κονιδίων	58
ΠΕΙΡΑΜΑ ΔΕΥΤΕΡΟ : Διαφοροποίηση απομονώσεων του μύκητα <i>A. solani</i> με τη χρήση μεθόδων μοριακής βιολογίας.	62
Σκοπός	62
Υλικά	62
1. Παραγωγή μυκηλίου	62
2. Απομόνωση του DNA	63
3. Μέθοδος RAPD-PCR.....	63
4. Ηλεκτροφόρηση	64
Μέθοδοι	65
1. Απομονώσεις του μύκητα	65
2. Παραγωγή μυκηλίου	65
3. Απομόνωση DNA	66
4. Μέθοδος RAPD-PCR.....	67
5. Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR	67

Αποτελέσματα.....	67
ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	71
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	75
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	86

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα εργασία έγινε στο Εργαστήριο Μυκητολογίας του Μπενακείου Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου.

Το περιεχόμενο της εργασίας χωρίζεται σε δύο μέρη από τα οποία το πρώτο αναφέρεται στα στοιχεία της Διεθνούς Βιβλιογραφίας, που αφορούν κυρίως την ταξινόμηση, περιγραφή και βιολογία του μύκητα *Alternaria solani* καθώς και την επιδημιολογία της ασθένειας που προκαλεί ο παραπάνω μύκητας στις καλλιέργειες της τομάτας και πατάτας. Επίσης αναφέρονται τα μέτρα (καλλιεργητικά, βιολογικά, χημικά) που συνιστώνται διεθνώς για την αντιμετώπιση της συγκεκριμένης ασθένειας. Τέλος γίνεται αναφορά στις μεθόδους μοριακής βιολογίας και συγκεκριμένα στην τεχνική RAPD-PCR που εφαρμόζεται τα τελευταία χρόνια διεθνώς για τη διαφοροποίηση των διαφόρων γενών και ειδών μυκήτων. Το δεύτερο μέρος, το πειραματικό, περιλαμβάνει δύο κεφάλαια τα οποία αντιστοιχούν στα δύο πειράματα που διενεργήθηκαν στην παρούσα εργασία. Στο πρώτο πείραμα έγινε σύγκριση των απομονώσεων του μύκητα *A. solani* από φυτά τομάτας με εκείνες από φυτά πατάτας εφαρμόζοντας τεχνικές και μεθόδους κλασικής Φυτοπαθολογίας. Στο δεύτερο πείραμα χρησιμοποιήθηκαν σύγχρονοι μέθοδοι μοριακής βιολογίας (RAPD-PCR) για τον εντοπισμό τυχόν γενετικών διαφορών μεταξύ των απομονώσεων του μύκητα *A. solani* από φυτά τομάτας και εκείνων από φυτά πατάτας.

Στο τέλος της εργασίας υπάρχει κατάλογος των βιβλιογραφικών αναφορών στις οποίες βασίστηκε η παρούσα μελέτη.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Αισθάνομαι την ανάγκη να ευχαριστήσω όλους εκείνους που με βοήθησαν για την πραγματοποίηση της πτυχιακής μου μελέτης.

Ειδικότερα θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον Καθηγητή της Φυτοπαθολογίας του Τεχνολογικού Εκπαιδευτικού Ιδρύματος Καλαμάτας κ. Αναστάσιο Ηλιόπουλο για την έγκριση του θέματος της πτυχιακής μελέτης και την κριτική ανάγνωση και διόρθωση της.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να απευθύνω στην Δρα Ειρήνη Βλουτόγλου, Ερευνήτρια Γ', του Εργαστηρίου Μυκητολογίας του Μπενακειού Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου, για την επίβλεψη της παρούσας πτυχιακής εργασίας, τις πολύτιμες συμβουλές και υποδείξεις της κατά τη διάρκεια των πειραμάτων καθώς και για την ανεκτίμητη βοήθεια που μου προσέφερε για τη συγγραφή και την καλύτερη παρουσίασή της. Επιπλέον θα ήθελε να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον Δρ Ιωάννη Ασπρόμουγκο Ερευνητή Δ', του Εργαστηρίου Μυκητολογίας του Μπενακειού Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου, για τις πολύτιμες συμβουλές που μου προσέφερε κατά τη διάρκεια των πειραμάτων που αφορούσαν τη χρήση μεθόδων μοριακής βιολογίας.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλο το προσωπικό του Εργαστηρίου Μυκητολογίας και της Βιβλιοθήκης του Μπενακειού Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου για τη βοήθεια που μου προσέφερε κατά τη διάρκεια της πτυχιακής μου μελέτης.

ΜΕΡΟΣ ΠΡΩΤΟ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑΣ

1.1. ΞΕΝΙΣΤΕΣ

1.1.1. Ιστορικό

1.1.1.1. Πατάτα

Η καλλιεργούμενη πατάτα κατάγεται από τα υψίπεδα των Άνδεων της Νότιας Αμερικής (Περού, Κολομβία, Ισημερινός, Βολιβία) και μεταφέρθηκε για πρώτη φορά στην Ευρώπη από τους Ισπανούς εξερευνητές το 1537 (Ολύμπιος, 1994). Στην Ελλάδα η εισαγωγή της πατάτας έγινε το 1830. Σήμερα η πατάτα κατέχει τη σημαντικότερη θέση μεταξύ των πέντε κυριότερων καλλιεργούμενων φυτικών ειδών για τη διατροφή του ανθρώπου (τα άλλα τέσσερα είδη είναι δημητριακά).

Από διαιτητικής άποψης η πατάτα είναι σημαντική τροφή για τον άνθρωπο αφού είναι πλούσια σε βιταμίνες C και D, υδατάνθρακες (20,8%), ενώ είναι πτωχή σε πρωτεΐνες (2,1%) και προβιταμίνη A. Εκτός από τη χρήση της στη διατροφή του ανθρώπου, χρησιμοποιείται στην κτηνοτροφία αλλά και στη βιομηχανία, όπως για την παραγωγή οινοπνεύματος, αμύλου, κ.λ.π. (Ολύμπιος, 1994).

1.1.1.2. Τομάτα

Η καλλιεργούμενη τομάτα έχει χώρα καταγωγής το Μεξικό και ειδικότερα την περιοχή Vera Cruz-Puebla, από όπου αρχικά μεταφέρθηκε τον 16^ο αιώνα αρχικά στην Ευρώπη και στη συνέχεια σε άλλες περιοχές της γης (Ολύμπιος, 2001). Στην Ελλάδα η εισαγωγή της έγινε το 1818. Σε διεθνή κλίμακα, η καλλιέργεια της τομάτας καταλαμβάνει την τρίτη σε έκταση θέση μετά την πατάτα και γλυκοπατάτα, ενώ στην Ελλάδα η επιτραπέζια τομάτα καταλαμβάνει τη δεύτερη θέση μετά την πατάτα.

Η τομάτα είναι το σπουδαιότερο λαχανικό καθώς εφοδιάζει τον ανθρώπινο οργανισμό με βιταμίνες και ιδίως με την βιταμίνη C, έχει ελκυστικό χρώμα και

ιδιαίτερο άρωμα, γεγονός που την καθιστά ένα από τα σημαντικότερα λαχανικά στη διατροφή του ανθρώπου (Ολύμπιος, 2001).

1.1.2. Ταξινόμηση

Η πατάτα (*Solanum tuberosum* L.) και η τομάτα (*Lycopersicon esculentum* Mill) ανήκουν στην Οικογένεια Solanaceae.

1.1.3. Η καλλιέργεια της πατάτας στη χώρα μας

Η καλλιέργεια της πατάτας καταλαμβάνει την πρώτη θέση στη χώρα μας με καλλιεργούμενη έκταση γύρω στα 450.000 στρέμματα, με μικρές αυξομειώσεις από έτος σε έτος (Πιν. 1).

Στην Ελλάδα οι κυριότερες περιοχές στις οποίες γίνεται συστηματική καλλιέργεια πατάτας είναι η Πελοπόννησος, η Κρήτη, η Εύβοια, η Βοιωτία, η Δράμα, οι Σέρρες και οι Κυκλάδες (Νάξος). Σήμερα οι πιο διαδεδομένες ποικιλίες τόσο στη χώρα μας όσο και διεθνώς είναι οι: Sprunta, Marfona, Liseta, Hermes και Novita, από τις οποίες η ποικιλία Sprunta καταλαμβάνει τη μεγαλύτερη έκταση (Πιν. 1).

Το ύψος των αποδόσεων των φυτών επηρεάζεται από την εποχή φύτευσης, την περιοχή και την ποικιλία. Συγκεκριμένα, η ανοιξιάτικη καλλιέργεια εμφανίζει υψηλότερες αποδόσεις (μέση απόδοση ανά στρέμμα 3,7 τόνοι) σε σχέση με τη φθινοπωρινή (μέση απόδοση ανά στρέμμα 2,2 τόνοι) (Ολύμπιος, 1994).

Όσον αφορά την καλλιέργεια της πατάτας που προορίζεται για σποροπαραγωγή στη χώρα μας το κυριότερο κέντρο της καλοκαιρινής καλλιέργειας είναι η Νάξος, ενώ της ανοιξιάτικης καλλιέργειας οι Σέρρες, η Δράμα, τα Ιωάννινα, η Τρίπολη και η Θεσσαλονίκη. Το 30% του πατατόσπορου που διατίθεται στους παραγωγούς της χώρας μας είναι εγχώριας παραγωγής και αντιστοιχεί σε 8.000 έως 9.000 τόνους σε μια έκταση 40.000 στρεμμάτων, ενώ το υπόλοιπο 70% είναι εισαγόμενος και αντιστοιχεί σε 19.000 τόνους. Η καλοκαιρινή καλλιέργεια προέρχεται μόνο από την εγχώρια παραγωγή και αντιστοιχεί σε 6.000 έως 7.000 τόνους (Υπουργείο Γεωργίας, 2003).

Στον Πίνακα 1 παρατίθενται στατιστικά στοιχεία που αφορούν την έκταση και την παραγωγή της καλλιεργούμενης πατάτας στη χώρα μας κατά την περίοδο 1999-2001 (Υπουργείο Γεωργίας, 2003).

Πίνακας 1. Στατιστικά στοιχεία για την καλλιέργεια της πατάτας στην Ελλάδα κατά την περίοδο 1999-2001.

ΕΤΟΣ	ΑΝΟΙΞΙΑΤΙΚΗ	ΚΑΛΟΚΑΙΡΙΝΗ	ΦΘΙΝΟΠΩΡΙΝΗ	ΣΥΝΟΛΟ
1. ΕΚΤΑΣΗ (στρέμματα)				
1999	187.614	153.653	149.863	491.130
2000	177.528	184.686	104.090	466.304
2001	163.260	170.095	122.734	456.089
2. ΠΑΡΑΓΩΓΗ (τόνοι)				
1999	348.813	344.560	284.231	977.596
2000	318.345	324.081	240.863	883.289
2001	356.450	380.870	199.383	936.703

(Πηγή: Υπουργείο Γεωργίας, 2003)

1.1.4. Η καλλιέργεια της τομάτας στη χώρα μας

Σε διεθνή κλίμακα, η καλλιέργεια της τομάτας καταλαμβάνει την τρίτη σε έκταση θέση μετά την πατάτα και γλυκοπατάτα, ενώ στην Ελλάδα η επιτραπέζια τομάτα καταλαμβάνει τη δεύτερη σε έκταση θέση μετά την πατάτα με καλλιεργούμενη έκταση γύρω στα 200.000 στρέμματα, με μικρές αυξομειώσεις από έτος σε έτος (Πιν. 2).

Στην Ελλάδα οι κυριότερες περιοχές στις οποίες γίνεται συστηματική καλλιέργεια τομάτας είναι η Κρήτη, η Πελοπόννησος, η Δυτική Στερεά και η Δυτική και Κεντρική Μακεδονία. Σήμερα οι πιο διαδεδομένες ποικιλίες τόσο στη χώρα μας όσο και διεθνώς είναι οι: Baya, Belladonna, Electra και Noa.

Το ύψος των αποδόσεων των φυτών επηρεάζεται από τον τρόπο καλλιέργειας και τον προορισμό (βιομηχανική, επιτραπέζια). Από την συνολική έκταση, το 53,8% καλλιεργείται με τομάτες που προορίζονται για μεταποίηση (βιομηχανική τομάτα), το 39,8% είναι υπαίθρια καλλιέργεια για νωπή κατανάλωση και το 6,4% της έκτασης είναι καλλιέργεια σε θερμοκήπια και χαμηλά σκέπαστρα (Ολύμπιος, 2001).

Σχεδόν ολόκληρη η ποσότητα τομάτας που παράγεται στα θερμοκήπια προορίζεται για την εσωτερική αγορά και μόνο μια μικρή ποσότητα (1,2%) εξάγεται (Πιν. 2).

Στον Πίνακα 2 παρατίθενται στατιστικά στοιχεία που αφορούν την έκταση και την παραγωγή της καλλιεργούμενης τομάτας στη χώρα μας κατά την περίοδο 1999-2001 (Υπουργείο Γεωργίας, 2003).

Πίνακας 2. Στατιστικά στοιχεία για την καλλιέργεια της τομάτας στην Ελλάδα κατά την περίοδο 1999-2001.

ΕΤΟΣ	ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΗ	ΕΠΙΤΡΑΠΕΖΙΑ		ΣΥΝΟΛΟ
		ΥΠΑΙΘΡΙΑ	ΘΕΡΜΟΚΗΠΙΑΚΗ	
1. ΕΚΤΑΣΗ (στρέμματα)				
1999	269.184	160.680	31.936	461.800
2000	249.002	158.683	32.770	440.455
2001	201.560	145.879	38.998	386.437
2. ΠΑΡΑΓΩΓΗ (τόνοι)				
1999	1.389.883	482.198	255.010	2.127.091
2000	1.332.058	502.005	223.121	2.057.184
2001	1.140.410	430.064	249.449	1.819.923

(Πηγή: Υπουργείο Γεωργίας, 2003)

1.2. ΠΑΘΟΓΟΝΟ

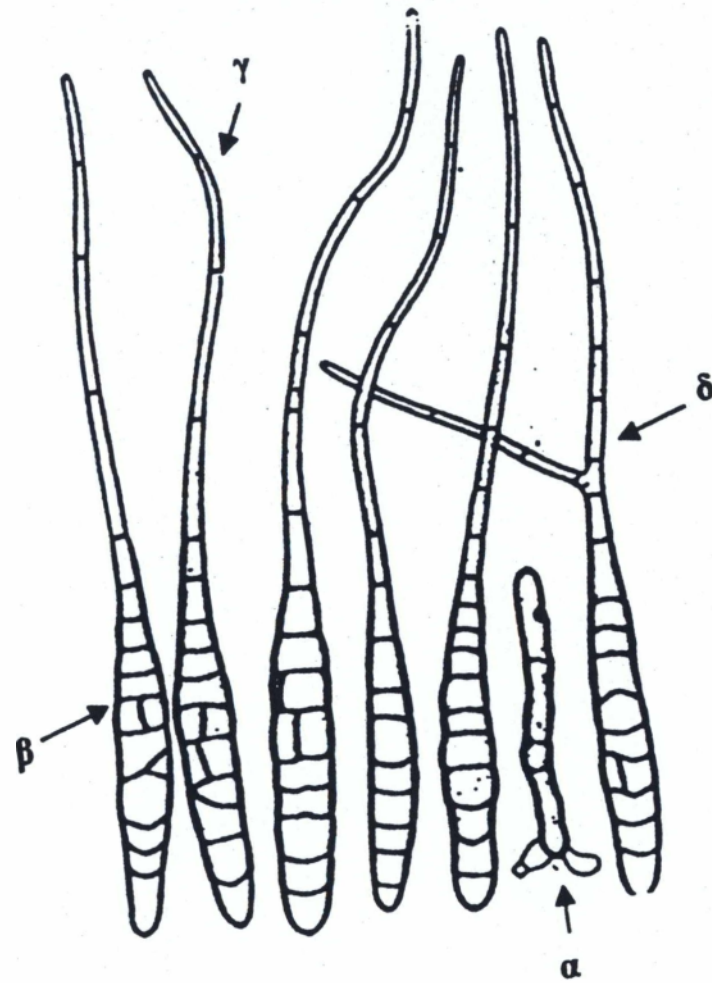
1.2.1. Ταξινόμηση

Ο μύκητας *Alternaria solani* Sorauer (συν. *Macrosporium solani*) ανήκει στην Οικογένεια Dematiaceae, στην Τάξη Hyphomycetales, στην Κλάση Hyphomycetes και στην Υποδιαίρεση Deuteromycotina.

1.2.2. Περιγραφή-Μορφολογία

Οι αποικίες του μύκητα *A. solani* σχηματίζουν πυκνό, εναέριο, πολυκύτταρο μυκήλιο χρώματος γκριζοκάστανου έως μαύρου (Ellis & Gibson, 1975). Οι κονιδιοφόροι εμφανίζονται μεμονωμένοι ή σε μικρές δέσμες, είναι ευθείς ή κεκαμμένοι με διαφράγματα (septa), έχουν χρώμα ανοιχτό καστανό, διάμετρο 6-10μm και μήκος μέχρι 100μm (Εικ. 1). Τα κονίδια είναι σκούρου καστανού χρώματος, δικτυοσπόρια και σχηματίζονται κατά κανόνα μεμονωμένα ή σε μικρές αλυσίδες των δύο κονιδίων (Εικ. 2). Τα κονίδια αποτελούνται : α) από το κυρίως σώμα, που έχει σχήμα ελλειψοειδές, επίμηκες και είναι ελαφρώς διογκωμένο στο σημείο πρόσφυσής του με τον κονιδιοφόρο, και β) από το ράμφος, το οποίο έχει πολύ συχνά το ίδιο ή και μεγαλύτερο μήκος από εκείνο του κυρίως σώματος του κονιδίου. Τα κονίδια έχουν συνολικό μήκος 150-300 μm, μέγιστο πάχος 15-19 μm και εμφανίζουν 9-11 εγκάρσια και λίγα ή καθόλου επιμήκη διαφράγματα. Το ράμφος των κονιδίων είναι κεκαμμένο, χρώματος ανοιχτού κίτρινου και πάχους 2,5-5 μm, ενώ σε μερικές περιπτώσεις διακλαδίζεται κοντά στο σημείο ένωσής του με το κυρίως σώμα του κονιδίου (Ellis & Gibson, 1975) (Εικ. 2).

Πρόσφατα όμως ο Simmons (2000), μελετώντας τους μορφολογικούς χαρακτήρες και τις διαστάσεις των κονιδίων απομονώσεων του μύκητα *A. solani* από φυτά τομάτας και πατάτας από διάφορες περιοχές, κατέταξε την ομάδα των απομονώσεων που προσβάλλει τα φυτά της πατάτας αποκλειστικά στο είδος *A. solani* Sorauer. Αντίθετα, στην ομάδα των απομονώσεων του μύκητα που προσβάλλουν τα φυτά της τομάτας διέκρινε τρία νέα είδη, τα: *A. tomatophila* Simmons sp. nov., *A. subcylindrica* Simmons & Roberts sp. nov. ή *A. cretica* Simmons & Vakalounakis sp. nov. τα οποία περιέγραψε ως εξής:



Εικόνα 1. Κονιδιοφόρος (α), σώμα κονιδίου (β), ράμφος (beak) (γ) και διακλάδωση του ράμφους (δ) στο σημείο πρόσφυσής του στο κυρίως σώμα κονιδίου του μύκητα *A. solani* (Ellis & Gibson, 1975).



Εικόνα 2. Κονίδια του μύκητα *A. solani* από φυσικά μολυσμένα φύλλα τομάτας με μονό και διπλό ράμφος (x 400).

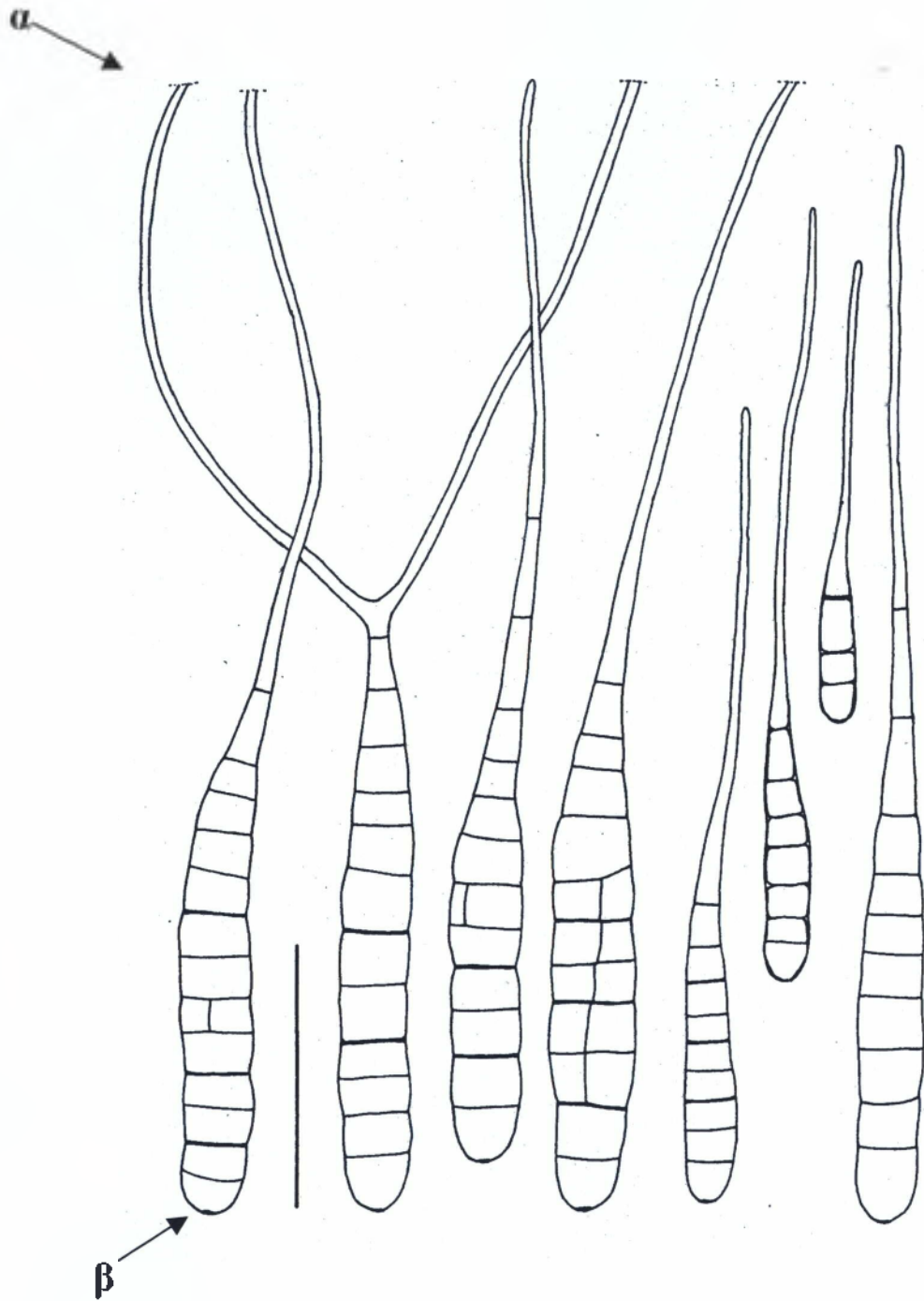
1. *Alternaria tomatophila*: Οι αποικίες του μύκητα *A. tomatophila* σχηματίζουν εναέριο μυκήλιο χρώματος γκριζου (Simmons, 2000). Ο μύκητας δεν παράγει *in vitro* άφθονα κονίδια, ενώ ο αριθμός τους είναι μεγαλύτερος στην περιφέρεια της αποικίας. Τα κονίδια είναι ανοιχτού καστανού χρώματος και αποτελούνται : α) από το κυρίως σώμα, που έχει σχήμα ελλειψοειδές με πολλά ευδιάκριτα διαφράγματα, και β) από το ράμφος. Τα νεαρά κονίδια παράγουν μονό ράμφος το οποίο επεκτείνεται από το κυρίως σώμα, ενώ τα μεγαλύτερης ηλικίας κονίδια εμφανίζουν διπλό ή τριπλό ράμφος. Το σώμα των κονιδίων έχει μήκος 80-117μm, μέγιστο πάχος 16-23μm και εμφανίζει 8-12 διαφράγματα, ενώ το ράμφος των κονιδίων έχει μήκος 99-217μm (Εικ. 3).

2. *Alternaria subcylindrica*: Οι κονιδιοφόροι εμφανίζονται μεμονωμένοι με διάμετρο 8 μm και μήκος 50-200μm. Τα νεαρά κονίδια είναι μακριά, στενά και έχουν σχήμα ελλειψοειδές. Τα κονίδια αποτελούνται: α) από το κυρίως σώμα με μήκος 84-109μm και μέγιστο πάχος 13-18μm, και β) από το ράμφος και έχει μήκος 122-269μm το οποίο σχηματίζεται κατά το αρχικό στάδιο ανάπτυξης των κονιδίων (Εικ. 4).

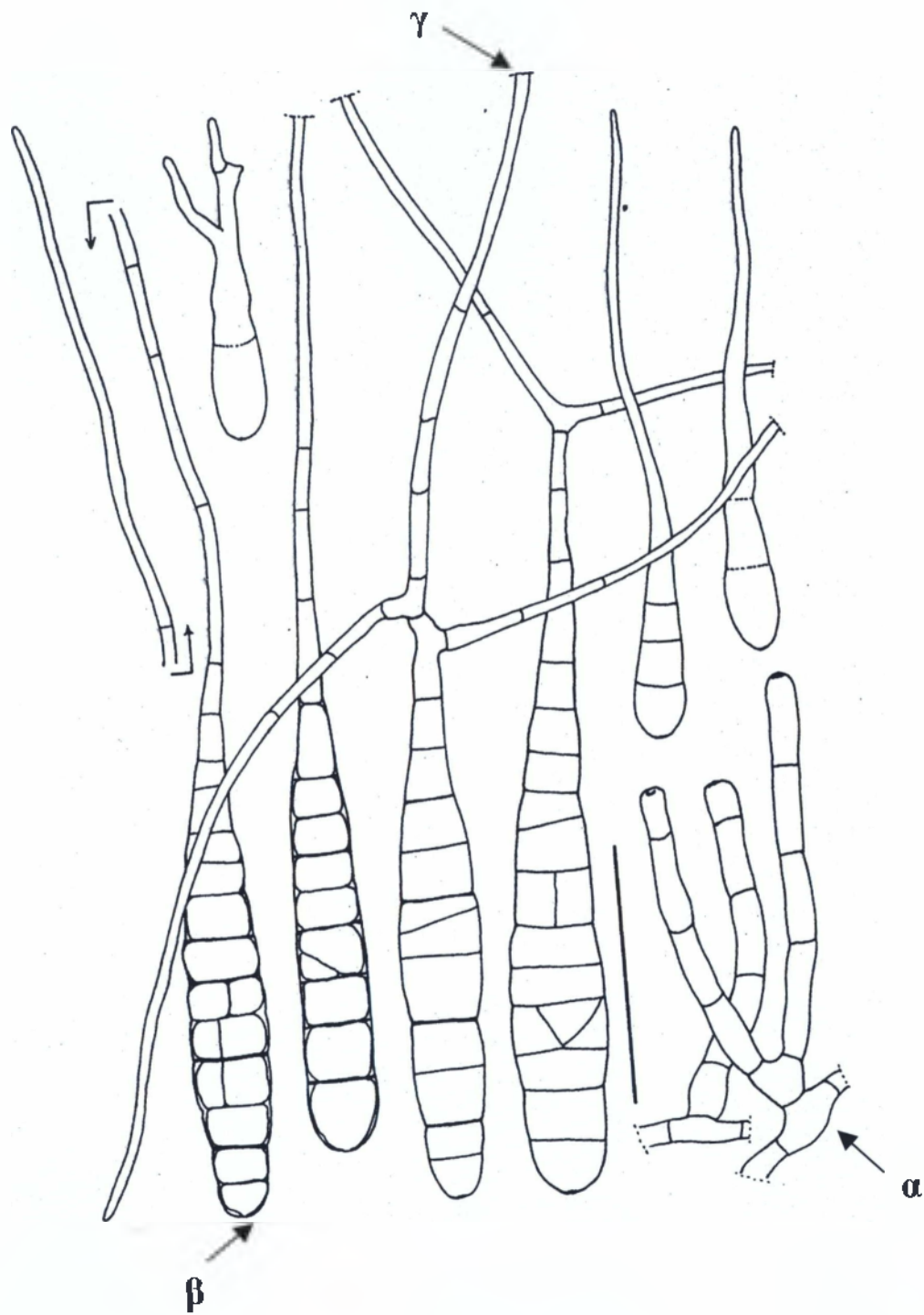
3. *Alternaria cretica*: Οι αποικίες του μύκητα *A. cretica* σχηματίζουν εναέριο μυκήλιο. Παρόλο που το σχήμα και τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των κονιδίων του μύκητα *A. cretica* είναι παρόμοια με αυτά του μύκητα *A. tomatophila* η παραγωγή κονιδίων διαφέρει. Ο μύκητας *A. cretica* παράγει άφθονα κονίδια ακόμη και στο αρχικό στάδιο ανάπτυξης της αποικίας. Τα κονίδια είναι ανοιχτού κίτρινου χρώματος και αποτελούνται: α) από το κυρίως σώμα, το οποίο είναι στενό και έχει σχήμα ελλειψοειδές στο μεγαλύτερο ποσοστό του πληθυσμού και β) από το ράμφος, το οποίο σε μερικές περιπτώσεις διακλαδίζεται κοντά στο σημείο ένωσής του με το κυρίως σώμα του κονιδίου και έχει ευδιάκριτα διαφράγματα. Τα κονίδια έχουν μήκος κυρίως σώματος 83-110μm , μέγιστο πάχος 13-26μm και μήκος ράμφους 134-225μm (Εικ. 5).



Εικόνα 3. Κονιδιοφόρος (α), κυρίως σώμα κονιδίου (β) και ράμφος (beak) (γ) του μύκητα *A. tomatophila* (Simmons, 2000).



Εικόνα 4. Ράμφος (beak) (α) και κυρίως σώμα κονιδίου (β) του μύκητα *A. subcylindrica* (Simmons, 2000).



Εικόνα 5. Κονιδιοφόρος (α), κυρίως σώμα κονιδίου (β) και ράμφος (beak) (γ) του μύκητα *A. cretica* (Simmons, 2000).

1.3. ΒΙΟΛΟΓΙΑ

1.3.1. Βλάστηση κονιδίων

Σύμφωνα με τον Rotem (1994), η θερμοκρασία, η σχετική υγρασία, η διάρκεια διύγρανσης των φυτικών επιφανειών, η ένταση και η διάρκεια του φωτός είναι μερικοί από τους περιβαλλοντικούς παράγοντες που επηρεάζουν τη βλάστηση των κονιδίων του μύκητα *A. solani*, όπως και άλλων ειδών του γένους *Alternaria*.

Στα περισσότερα είδη του γένους *Alternaria* η άριστη θερμοκρασία για τη βλάστηση των κονιδίων είναι περίπου 25°C, ενώ η μέγιστη 35°C (Rotem,1994). Όπως αναφέρεται όμως στη διεθνή βιβλιογραφία, το εύρος των θερμοκρασιών βλάστησης των κονιδίων των διαφόρων ειδών του γένους *Alternaria* είναι αρκετά μεγάλο. Πιο συγκεκριμένα, ο Norse (1973) διαπίστωσε ότι η βλάστηση των κονιδίων και η αύξηση της μυκηλιακής υφής των ειδών του γένους *Alternaria* ευνοούνται από ένα αρκετά μεγάλο εύρος θερμοκρασιών και ότι η βλάστηση των κονιδίων του μύκητα *A. alternata* *in vivo* και *in vitro* πραγματοποιείται σε εύρος θερμοκρασιών πολύ μεγαλύτερο από ό,τι η αύξηση του μυκηλίου.

Σύμφωνα με τον Παναγόπουλο (2000), τα κονίδια του μύκητα *A. solani* βλαστάνουν εντός 1-2h μέσα στο νερό σε θερμοκρασίες που κυμαίνονται μεταξύ 6-34°C και εντός 35-45min στην άριστη θερμοκρασία των 28-30°C. Οι Horsfall & Lukens (1971) αναφέρουν ότι η άριστη θερμοκρασία για τη βλάστηση των κονιδίων του μύκητα *A. solani* *in vivo* και *in vitro* ήταν 28°C.

Ένας από τους σημαντικότερους παράγοντες που επηρεάζουν τη βλάστηση των κονιδίων του μύκητα *A. solani*, είναι η σχετική υγρασία. Πιο συγκεκριμένα για τη βλάστηση των κονιδίων του παθογόνου απαιτείται η παρουσία υψηλής σχετικής υγρασίας (Stevenson & Pennypacker, 1988). Σε πειράματα που έγιναν *in vitro* διαπιστώθηκε ότι σε θερμοκρασία 25°C και σχετική υγρασία μεγαλύτερη από 96% τα κονίδια του μύκητα *A. solani* βλάστησαν εξαιρετικά γρήγορα, ενώ κανένα κονίδιο του μύκητα δε βλάστησε όταν η σχετική υγρασία ήταν μικρότερη από 92%. Ακόμη, φαίνεται ότι εκτός από την παρουσία υψηλής σχετικής υγρασίας, η παρουσία σταγόνων νερού στις φυτικές επιφάνειες είναι απαραίτητη προϋπόθεση για τη βλάστηση των κονιδίων του μύκητα *A. solani* (Stevenson & Pennypacker,1988).

Όσον αφορά την επίδραση του φωτός, η βλάστηση των κονιδίων του μύκητα *A. solani* παρεμποδίζεται από το φως. Έχει διαπιστωθεί ότι τα μήκη κύματος που είναι

υπεύθυνα για αυτή την παρεμπόδιση κυμαίνονται από 300 έως 500nm, ενώ μεγαλύτερα μήκη κύματος (750nm) δεν έχουν καμία επίδραση στη βλάστηση των κονιδίων του μύκητα (Stevenson & Pennypacker, 1988).

Εκτός από τους παραπάνω παράγοντες, η *in vitro* βλάστηση των κονιδίων του μύκητα *A. solani* επηρεάζεται και από διάφορες παρεμποδιστικές ουσίες. Σύμφωνα με τον Rotem (1963), κονίδια του μύκητα που τοποθετήθηκαν σε θρεπτικό υλικό δε βλάστησαν εξαιτίας της ποσότητας των ανασχετικών ουσιών που παράχθηκαν από τα ίδια κονίδια του μύκητα. Όταν όμως τέτοιες ουσίες παράγονται από ένα μόνο κονίδιο, δεν προκαλούν αναστολή της βλάστησης του κονιδίου καθώς η παραγόμενη ποσότητα είναι πολύ μικρή. Για το λόγο αυτόν η αναστολή της βλάστησης των κονιδίων από παρεμποδιστικές ουσίες μπορεί να παρατηρηθεί μόνο όταν τα κονίδια βρίσκονται συγκεντρωμένα σε ομάδες. Οι Waggoner & Parlange (1977) προσδιόρισαν μια ουσία την antimycin A, η οποία επιβράδυνε τη βλάστηση των κονιδίων, ενώ σε συνδυασμό με μια άλλη ουσία το salicyl hydroxamic acid (SHAM), προκάλεσε μεγαλύτερη επιβράδυνση. Όταν το SHAM χρησιμοποιήθηκε μόνο του δεν είχε καμία επίδραση στη βλάστηση κονιδίων.

Η *in vivo* βλάστηση των κονιδίων του μύκητα αρχίζει κατά τη διάρκεια της πρώτης υγρής νύχτας, σταματάει την επόμενη ξηρή ημέρα και συνεχίζεται κατά τη διάρκεια της δεύτερης υγρής νύχτας (Bashi & Rotem, 1974). Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται μέχρις ότου οι μυκηλιακές υφές εισέλθουν στον ξενιστή και τον μολύνουν.

Η είσοδος του μύκητα εντός των ιστών γίνεται σε θερμοκρασίες 10-25°C από τα στομάτια ή με απ' ευθείας διάτρηση της εφυμενίδας (Πανογόπουλος, 1995). Για τη διάτρηση της επιδερμίδας των κονδύλων της πατάτας από το μύκητα *A. solani* απαιτείται συνήθως θερμοκρασία 15°C, ενώ για τη διάτρηση της επιδερμίδας των καρπών της τομάτας 20°C (Horsfall & Lukens, 1971).

Υπό ελεγχόμενες συνθήκες, η μόλυνση του ξενιστή από το μύκητα *A. solani* λαμβάνει χώρα σε ένα ευρύ φάσμα θερμοκρασιών, με ελάχιστη θερμοκρασία τους 10°C και μέγιστη τους 35°C (Rotem, 1994). Ο ίδιος ερευνητής διαπίστωσε ότι η ελάχιστη περίοδος σχετικής υγρασίας που απαιτείται για την εγκατάσταση του παθογόνου στον ξενιστή κυμαίνεται από 3 έως 72h. Σύμφωνα με τους Waggoner & Parlange (1974), η βλάστηση των κονιδίων του μύκητα *A. solani* έγινε σε 2-3h από τη μόλυνση παρουσία υψηλής σχετικής υγρασίας και σε θερμοκρασίες 16-35°C. Σε θερμοκρασία 10°C απαιτούνται 12h για τη μόλυνση του ξενιστή, σε θερμοκρασία 15°C

απαιτούνται 8h, ενώ σε θερμοκρασία 22°C απαιτούνται μόνο 3h (Παναγόπουλος, 2000).

1.3.2. Παραγωγή κονιδίων

Ο Leach (1967) κατατάσσει τα είδη του γένους *Alternaria* στην κατηγορία εκείνη των μυκήτων που παράγουν κονίδια σε συνθήκες εναλλαγής φωτός και σκότους (diurnal sporulators). Η κατηγορία αυτή των μυκήτων χαρακτηρίζεται από την παρουσία ενός μηχανισμού φωτοσπορογένεσης με δύο διακριτές φάσεις: την αρχική, η οποία οδηγεί στο σχηματισμό των κονιδιοφόρων και την τελική που οδηγεί στο σχηματισμό των κονιδίων. Οι ανάγκες σε θερμοκρασία και φως των δύο αυτών φάσεων είναι διαφορετική.

Σύμφωνα με τον Rotem (1994) όμως, οι κονιδιοφόροι των ειδών του γένους *Alternaria* σχηματίζονται ακόμη και στο σκοτάδι, ενώ η διαδικασία της παραγωγής των κονιδίων διακρίνεται σε τρεις φάσεις: α) την αρχική φάση κατά την οποία παράγονται οι κονιδιοφόροι, β) την επαγωγική φάση κατά την οποία διεγείρεται ο μηχανισμός σχηματισμού κονιδίων, και γ) την τελική φάση κατά την οποία παράγονται τα κονίδια.

Όσον αφορά την παραγωγή κονιδίων *in vitro*, ο Charlton (1953) αναφέρει ότι συνεχείς μεταφορές του μύκητα *A. solani* σε θρεπτικά υλικά έχουν ως αποτέλεσμα τη μείωση ή την απώλεια της ικανότητάς του για παραγωγή κονιδίων.

Ο Aragaki (1961) διαπίστωσε ότι η διαδικασία σχηματισμού κονιδίων πάνω στους κονιδιοφόρους εξαρτάται από το φως και ειδικότερα από τη διάρκεια της φωτοπερίόδου. Συγκεκριμένα ο αριθμός των παραγόμενων κονιδίων αυξάνεται όταν η φωτοπερίοδος είναι 0-15h και μειώνεται όταν αυτή είναι μεγαλύτερη από 16h. (Aragaki, 1964). Επιπλέον διαπιστώθηκε ότι όταν το μήκος κύματος της ακτινοβολίας είναι 390-515nm δεν παρατηρείται σχηματισμός κονιδίων (Aragaki, 1962).

Ο Douglas (1972) διαπίστωσε ότι καθώς η θερμοκρασία μειωνόταν η επίδραση της φωτοπερίόδου ήταν λιγότερο σημαντική στην παραγωγή κονιδίων του μύκητα *A. solani*. Πιο συγκεκριμένα στους 10°C δεν υπήρχε σημαντική διαφορά στην παραγωγή κονιδίων μεταξύ των φωτοπερίοδων 16h φως /8h σκότος και 8h φως /16h σκότος. Ο μέγιστος όμως αριθμός παραγόμενων κονιδίων, ανεξάρτητα από τη φωτοπερίοδο, διαπιστώθηκε σε θερμοκρασία 25°C. Επιπλέον ο ίδιος ερευνητής διαπίστωσε ότι οι

αποικίες του μύκητα που αναπτύχθηκαν σε θερμοκρασία 20°C με φωτοπερίοδο 16h φως /8h σκοτάδι παράγαγαν το μεγαλύτερο αριθμό κονιδίων.

Ένας άλλος παράγοντας που επηρεάζει την παραγωγή κονιδίων είναι η θερμοκρασία. Το εύρος των θερμοκρασιών που ευνοούν την παραγωγή κονιδίων *in vitro* από το μύκητα *A. solani* είναι μικρότερο από εκείνο για την ανάπτυξη του μυκηλίου του μύκητα (Rotem,1994). Η άριστη θερμοκρασία για την παραγωγή κονιδίων είναι σύμφωνα με τους Lukens & Horsfall (1969) 28°C, ενώ σύμφωνα με τον Rotem (1994), η παραγωγή κονιδίων και κονιδιοφόρων έλαβε χώρα σε θερμοκρασίες που κυμαίνονταν από 19 έως 23°C, ενώ σε θερμοκρασία μεγαλύτερη των 32°C διαπιστώθηκε παρεμπόδιση σχηματισμού των κονιδιοφόρων. Επιπλέον, η θερμοκρασία μπορεί να επηρεάσει το σχηματισμό των κονιδίων του μύκητα *A. solani* κυρίως μέσα από τις αλληλεπιδράσεις της με την ακτινοβολία και την υγρασία (Rotem,1994).

Ο Rotem (1994) διαπίστωσε ότι τα είδη του γένους *Alternaria* μπορούν να παράγουν κονίδια *in vitro* τόσο κατά τη διάρκεια μεγάλων περιόδων υγρασίας όσο και κατά τη διάρκεια μικρών υγρών περιόδων που διακόπτονται από ξηρές περιόδους.

Οι Waggoner & Horsfall (1969) διαπίστωσαν ότι η προσθήκη γλυκόζης στο θρεπτικό υλικό ανάπτυξης αύξησε τον αριθμό των κονιδιοφόρων που σχηματίζονται *in vitro* από το μύκητα *A. solani*, αλλά εμπόδισε την παραγωγή κονιδίων.

Ο αριθμός των σχηματιζόμενων κονιδιοφόρων και κονιδίων από το μύκητα *A. solani* αυξάνεται με την παρουσία οξυγόνου και αναστέλλεται από το διοξείδιο του άνθρακα. Επιπρόσθετα η διαδικασία σχηματισμού κονιδίων είναι ευαίσθητη στο άζωτο και στο θείο αλλά δεν παρουσιάζει την ίδια ευαισθησία στο κυάνιο και το φωσφόρο (Lukens & Horsfall, 1972).

Όσον αφορά τους παράγοντες που επηρεάζουν το σχηματισμό κονιδίων του μύκητα *A. solani* πάνω σε φυτικούς ιστούς (*in vivo*) ο Rotem (1994) διαπίστωσε ότι η υπεριώδης ακτινοβολία προάγει την παραγωγή κονιδίων. Σύμφωνα με τον Vakalounakis (1991) η χρησιμοποίηση ενός ειδικού πλαστικού που απορροφά μέρος της υπεριώδους ακτινοβολίας είχε ως αποτέλεσμα την παρεμπόδιση σχηματισμού κονιδίων από το μύκητα *A. solani* μέχρι και 50% πάνω στις επιφάνειες των προσβεβλημένων φυτικών ιστών.

Στα φύλλα πατάτας οι κονιδιοφόροι του μύκητα *A. solani* παράγονται σε ένα μεγαλύτερο εύρος θερμοκρασιών (5-30°C) και σε ένα υψηλότερο άριστο (27,5°C) από ότι τα κονίδια (22,5°C), ενώ θερμοκρασίες μεγαλύτερες από 27°C αναστέλλουν την παραγωγή κονιδίων (Douglas,1972).

Σημαντικό ρόλο στην παραγωγή κονιδίων *in vivo* από το μύκητα *A. solani*, εκτός από την υπεριώδη ακτινοβολία και την θερμοκρασία, παίζει και η σχετική υγρασία. Σύμφωνα με τους Bashi & Rotem (1975b), ενώ μεγάλες περιόδοι υγρασίας ευνοούν την παραγωγή κονιδίων, αρκετές μικρότερης διάρκειας περιόδοι υγρασίας είναι ικανές να αντικαταστήσουν τις μεγάλες περιόδους. Κάτω από αυτές τις συνθήκες και ιδιαίτερα όταν το βράδυ η περίοδος υγρασίας αυξηθεί από 8 σε 16h και η θερμοκρασία νύχτας/ημέρας αυξηθεί από 10/20°C σε 15/25°C ή 20/30°C τότε παρατηρείται αύξηση των παραγομένων *in vivo* κονιδίων. Για να παράγει κονίδια *in vivo* ο μύκητας *A. solani* απαιτεί συνήθως την παρουσία υγρασίας στις φυτικές επιφάνειες για 48h τουλάχιστον. Επειδή όμως σε συνθήκες αγρού δεν παρατηρούνται τόσες μεγάλες περιόδοι υγρασίας ο μύκητας *A. solani* μπορεί να παράγει κονίδια ακόμη και σε μικρότερες περιόδους υγρασίας που διακόπτονται από περιόδους ξηρασίας (Bashi & Rotem, 1974). Πιο συγκεκριμένα η διακοπή της περιόδου υγρασίας με ξηρασία για 1-3 ημέρες, είχε ως αποτέλεσμα να παραχθούν άφθονα κονίδια από το μύκητα *A. solani* σε φυτά τομάτας, ιδίως όταν κατά την τελευταία ημέρα της υγρασίας η διάρκεια φωτός ήταν 12h (Rotem & Bashi, 1969).

Σύμφωνα με τους Bashi & Rotem (1975a) η παραγωγή των κονιδίων του μύκητα *A. solani* ήταν μεγαλύτερη σε νεκρούς φυτικούς ιστούς τομάτας και πατάτας απ' ότι σε ζωντανούς φυτικούς ιστούς.

1.3.3. Διασπορά κονιδίων

Τα κονίδια του μύκητα *A. solani* και των περισσότερων ειδών του γένους *Alternaria* διασπείρονται με τη βοήθεια του ανέμου (air-borne conidia) και με τις σταγόνες νερού (splash-dispersed conidia) (Rotem, 1994). Οι μύκητες του γένους *Alternaria* ανήκουν στην κατηγορία εκείνη των μυκήτων που τα κονιδιά τους μεταφέρονται και παθητικά, κυρίως από ισχυρούς ανέμους. Ο άνεμος παρουσία χαμηλής υγρασίας είναι ο κύριος παράγοντας απελευθέρωσης των κονιδίων από την επιφάνεια των φύλλων πάνω στις οποίες σχηματίζονται. Επειδή δε η αποτελεσματικότητα της διασποράς των κονιδίων εξαρτάται από την σταθερή επαφή των κονιδίων των μυκήτων αυτών με τους κονιδιοφόρους, για την απελευθέρωση των κονιδίων των μυκήτων του γένους *Alternaria* απαιτούνται πολύ ισχυροί άνεμοι (Aylor, 1990).

Ο Strandberg (1992) αναφέρει ότι τα κονίδια των ειδών του γένους *Alternaria* μπορούν να μεταφερθούν με τη βοήθεια του ανέμου τόσο σε μικρές αποστάσεις λίγων χιλιομέτρων όσο και σε μεγαλύτερες (εκατοντάδες χιλιόμετρα).

Σύμφωνα με τον Rotem (1994) η διασπορά των κονιδίων των μυκήτων του γένους *Alternaria* ακολουθεί εποχιακή και ημερήσια περιοδικότητα. Η εποχιακή διασπορά επηρεάζεται από τα στάδια ανάπτυξης του ξενιστή και από τις κλιματολογικές συνθήκες, όπως τη βροχόπτωση και τη θερμοκρασία.

Σύμφωνα με τους Datar & Mayee (1982), η μέγιστη διασπορά των κονιδίων του μύκητα *A. solani* παρατηρήθηκε στο τελευταίο στάδιο της ασθένειας και συνεχίστηκε και όταν τα φυτά είχαν νεκρωθεί. Οι Harrison *et al.* (1965b) και Madden *et al.* (1978) διαπίστωσαν τη μέγιστη διασπορά των κονιδίων του μύκητα *A. solani* στο μέσο της καλλιεργητικής περιόδου μετά από μια περίοδο 7-15h δροσιάς και σε θερμοκρασίες που κυμαίνονταν από 8 έως 14°C.

Η διασπορά των κονιδίων του μύκητα *A. solani* ακολουθεί εκτός από εποχιακή και ημερήσια περιοδικότητα. Ο μεγαλύτερος αριθμός των κονιδίων που διασπάρθηκαν διαπιστώθηκε τις μεσημβρινές ώρες και θεωρείται ότι σχετίζεται με την πιο θερμή και ξηρή περίοδο της ημέρας και την μεγαλύτερη ταχύτητα του ανέμου (Gregory, 1973). Σύμφωνα με τον Rotem (1964), η ημερήσια διασπορά των κονιδίων του μύκητα *A. solani* εμφάνισε τη μέγιστη τιμή στις 11 π.μ., ενώ η ταχύτητα του ανέμου ήταν ο κύριος παράγοντας που καθόρισε τον αριθμό των κονιδίων που διασπάρθηκαν.

Οι Vloutoglou *et al.* (1995) αναφέρουν ότι ο αριθμός των κονιδίων του μύκητα *A. linicola* που διασπείρονταν κατά τη διάρκεια της ημέρας πάνω από καλλιέργειες λιναριού αυξανόταν αυξανόμενης της σχετικής υγρασίας, ενώ το μέγιστο των διασπειρομένων κονιδίων παρατηρήθηκε μεταξύ 12:00 και 13:00.

Επιπλέον, η μικρή ταχύτητα του ανέμου και η υψηλή σχετική υγρασία κατά τη διάρκεια της νύχτας, εμποδίζουν τη διασπορά των κονιδίων του μύκητα *A. solani* (Rotem, 1994). Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι η παρουσία δρόσου στις φυτικές επιφάνειες και η μικρή σχετικά ταχύτητα του ανέμου κατά τη διάρκεια της νύχτας περιορίζουν σε μεγάλο βαθμό την απελευθέρωση των κονιδίων από τους κονιδιοφόρους. Η απότομη όμως αύξηση του αριθμού των διασπειρομένων κονιδίων τις πρώτες πρωινές ώρες οφείλεται στο γεγονός ότι τα φύλλα αρχίζουν να στεγνώνουν, η υγρασία μειώνεται ενώ παράλληλα η θερμοκρασία και η ταχύτητα του ανέμου αυξάνονται (Rotem, 1994). Επιπλέον, διαπιστώθηκε ότι μερικά κονίδια που σχηματίζονται κατά τη διάρκεια μιας υγρής νύχτας δεν διασπείρονται την επόμενη

ημέρα αλλά παραμένουν προσκολλημένα πάνω στα φύλλα. Τα κονίδια αυτά σχηματίζουν ένα απόθεμα μέρος του οποίου διασπείρεται τις επόμενες ημέρες. Το απόθεμα αυτό αυξάνεται μετά από συνεχείς νύκτες με υγρασία κατά τη διάρκεια των οποίων ευνοείται η παραγωγή κονιδίων και μετά από ημέρες χωρίς ισχυρούς ανέμους όπου ο αριθμός των διασπειρομένων κονιδίων είναι μικρός (Rotem,1994). Διαπιστώθηκε ότι λίγα κονίδια παράχθηκαν όταν τα φύλλα ήταν στεγνά και η σχετική υγρασία υψηλή ενώ η θερμοκρασία και η ένταση του ανέμου ήταν σε χαμηλά επίπεδα. Αύξηση των κονιδίων όμως παρατηρήθηκε όταν τα φύλλα υγράθηκαν, μειώθηκε η σχετική υγρασία ενώ η θερμοκρασία και η ταχύτητα του ανέμου αυξήθηκαν (Langenberg *et al.*, 1977).

Η διασπορά των κονιδίων του μύκητα *A. solani* εκτός των άλλων επιτυγχάνεται σε μικρότερο όμως βαθμό με το νερό της άρδευσης ή της βροχής, τη διενέργεια καλλιεργητικών εργασιών και ίσως με διάφορα έντομα π.χ. κολεόπτερα (Παναγόπουλος, 2000).

1.3.4. Διαχείμαση-Επιβίωση

Ο μύκητας *A. solani* διαχειμάζει σε μολυσμένα φυτικά υπολείμματα, τα οποία παραμένουν στο έδαφος μετά τη συγκομιδή των καλλιεργειών, σε ζιζάνια ή σε φυτά εθελοντές, κυρίως της Οικογένειας Solanaceae (Παναγόπουλος, 2000).

Σύμφωνα με τον Basu (1971), ο μύκητας *A. solani* επιβιώνει στις παραπάνω πηγές μολυσμάτων με τη μορφή γλαμυδοσπορίων στα κύτταρα των μυκηλιακών υφών και των κονιδίων του. Συγκεκριμένα έχει διαπιστωθεί ότι τα γλαμυδοσπόρια παραμένουν στο έδαφος για περισσότερους από 12 μήνες διατηρώντας τη μολυσματικότητά τους (Patterson, 1991).

Ο Rotem (1968) διαπίστωσε ότι το μυκήλιο του μύκητα *A. solani* παρουσιάζει μεγαλύτερη αντοχή στις υψηλές θερμοκρασίες, την υγρασία και την ξηρασία σε σχέση με τα κονίδια. Πιο συγκεκριμένα, το μυκήλιο μπορεί να επιβιώσει για 24h σε θερμοκρασία 88°C και σχετική υγρασία 14-38%. Αντίθετα σε θερμοκρασία 5°C και σχετική υγρασία μεγαλύτερη από 38% το μυκήλιο μπορεί να επιβιώσει για 10 χρόνια (Rotem, 1968). Η επιβίωση του μυκηλίου κάτω από αυτές τις συνθήκες είναι αντιστρόφως ανάλογη με τη σχετική υγρασία του εδάφους. Σε ένα άλλο πείραμα που διεξήγαγε ο ίδιος ερευνητής, το μυκήλιο του μύκητα επιβίωσε για 16 μήνες σε

θερμοκρασία εδάφους 40°C, ενώ στην ίδια θερμοκρασία τα κονίδια επιβίωσαν μόνο για 10 μήνες.

Η επιβίωση του μύκητα *A. solani* στο έδαφος επηρεάζεται από κλιματολογικούς, εδαφικούς και βιοτικούς παράγοντες οι σημαντικότεροι των οποίων είναι η σχετική εδαφική υγρασία, οι μικροβιακοί παράγοντες του εδάφους και η ατμοσφαιρική θερμοκρασία (Rotem, 1994). Η ηλιακή ακτινοβολία δεν επηρεάζει σε σημαντικό βαθμό την επιβίωση του παθογόνου στο έδαφος γιατί αυτό προστατεύεται από το ίδιο το έδαφος, από τα φυτικά υπολείμματα ή τους ιστούς των σπόρων και από το σκούρο χρωματισμό του μυκηλίου και των κονιδίων του (Rotem & Aust, 1991; Rotem, 1994). Επιπλέον, ο χρόνος επιβίωσης του μύκητα *A. solani* στα φυτικά υπολείμματα είναι μεγαλύτερος όταν αυτά βρίσκονται στη επιφάνεια του εδάφους από ότι όταν αυτά είναι παραχωμένα (Rotem, 1968). Πιο συγκεκριμένα διαπιστώθηκε ότι το παθογόνο επιβίωσε καλύτερα (έως και 8 μήνες) στα υπολείμματα φυτών πατάτας και τομάτας που βρίσκονταν στην επιφάνεια του εδάφους παρά σε εκείνα που ήταν θαμμένα. Η διαφορά αυτή πιθανόν να οφείλεται σε εδαφικούς και μικροβιακούς παράγοντες (Rotem, 1994).

1.3.5. Παραγωγή τοξινών

Τα περισσότερα είδη του γένους *Alternaria* παράγουν τοξίνες, οι οποίες μπορούν να προκαλέσουν χλώρωση και νέκρωση των φυτών, όταν εισαχθούν τεχνητά σε αυτά (Rotem, 1994). Τέτοιες ουσίες είναι οι: zinniol, alternaric acid, alternariol, alternariol methyl ether, tenuazonic acid, radiciniol, radiciniol και tentoxin.

Όπως σε άλλα είδη του γένους *Alternaria* έτσι και στην περίπτωση του μύκητα *A. solani* έχει αναφερθεί παραγωγή τοξινών (Rotem, 1994). Μια από τις τοξίνες αυτές απομονώθηκε από νεκρωτικούς ιστούς φυτού τομάτας καθώς και από διήθημα καλλιέργειας του μύκητα. Η κυριότερη τοξίνη που σχετίζεται με την παθογένεια είναι η alternaric acid (Brian *et al.*, 1952; Langsdorf *et al.*, 1990). Πιο συγκεκριμένα, η εισαγωγή της τοξίνης αυτής στο αγγειακό σύστημα των φυτών τομάτας και πατάτας προκάλεσε την εμφάνιση κηλίδων, χλωρώσεων και νεκρώσεων στα φύλλα ή ακόμα και τη νέκρωση ολόκληρων φυτών, συμπτώματα δηλαδή όμοια με αυτά που προκαλεί ο μύκητας *A. solani* όταν μολύνει φυτά τομάτας και πατάτας. Επιπλέον το παθογόνο παράγει και άλλες τοξίνες όπως τις zinniol, alternasol A και C και solanapyrone A και C (Holestein & Stoessl, 1983; Rotem, 1994).

Οι Holestein & Stoessl (1983) απομόνωσαν από το μύκητα *A. solani* ένα μεταβολίτη, τον tetrahydroanthraquinone altrenasol A, ο οποίος διαπιστώθηκε ότι προκαλεί φυτοτοξικότητα. Από πειράματα που έγιναν σε θερμοκήπιο, διαπιστώθηκε ότι 50μg/ml διαλύματος του παραπάνω μεταβολίτη προκάλεσαν χλώρωση, νέκρωση και σήψη των φύλλων φυτών πατάτας.

1.3.6. Κύκλος ξενιστών

Σύμφωνα με τον Rotem (1994), ο μύκητας *A. solani* προσβάλλει κυρίως την τομάτα (*Lycopersicon esculentum* Mill) και την πατάτα (*Solanum tuberosum* L.). Επιπλέον, έχει διαπιστωθεί ότι προσβάλλει, σε μικρότερο όμως βαθμό, την πιπεριά (*Capsicum annuum* L.), τη μελιτζάνα (*Solanum melangena* L.), τον καπνό (*Nicotiana tabacum* L.) και πολλά είδη καλλιεργούμενων ή μη φυτών που ανήκουν στην Οικογένεια Solanaceae, όπως τα: *Atropa belladonna*, *Cyphomandra betacea*, *Hyoscyamus albus*, *H. niger*, *Lycopersicon glandulosum*, *L. hirsutum*, *L. peruviaum*, *Nicotiana affinis*, *Solanum andigenum*, *S. aviculare*, *S. carolinense*, *S. demissum*, *S. dulcamare*, *S. niger* και *S. wendlandii*. Τέλος, έχει αναφερθεί ότι ο μύκητας προσβάλλει και είδη των Οικογενειών Compositae, Moraceae και Cruciferae (Rotem, 1994).

1.3.7. Διαφοροποίηση ειδών του γένους *Alternaria* με τη χρήση μοριακών μεθόδων.

Τα τελευταία 20 χρόνια έχουν μελετηθεί νέες πηγές δεικτών με βάση τις τεχνικές ανάλυσης σε μοριακό επίπεδο, οι μοριακοί δείκτες όπως ονομάζονται (Michelmore & Hulbert, 1987). Με τη χρήση των μοριακών δεικτών εντοπίζονται διαφορές που υπάρχουν σε μοριακό-γενετικό επίπεδο (αλληλουχία των βάσεων του DNA ή στις πρωτεΐνες που το DNA κωδικοποιεί) και γίνεται προσπάθεια στατιστικής συσχέτισης των διαφορών αυτών με φαινοτυπικούς χαρακτήρες π.χ ανθεκτικότητα ενός φυτού σε κάποια ασθένεια ή ανθεκτικότητα ενός παθογόνου μύκητα σε κάποιο μυκητοκτόνο. Στους μοριακούς δείκτες περιλαμβάνονται δείκτες πρωτεϊνών (ισοένζυμα) καθώς και δείκτες νουκλεϊκών οξέων. Για το διαχωρισμό των πρωτεϊνών εφαρμόζονται διάφορες τεχνικές όπως η ηλεκτροφόρηση και η χρωματογραφία, ενώ για το διαχωρισμό των νουκλεϊκών οξέων εφαρμόζονται οι τεχνικές RFLP (Restriction

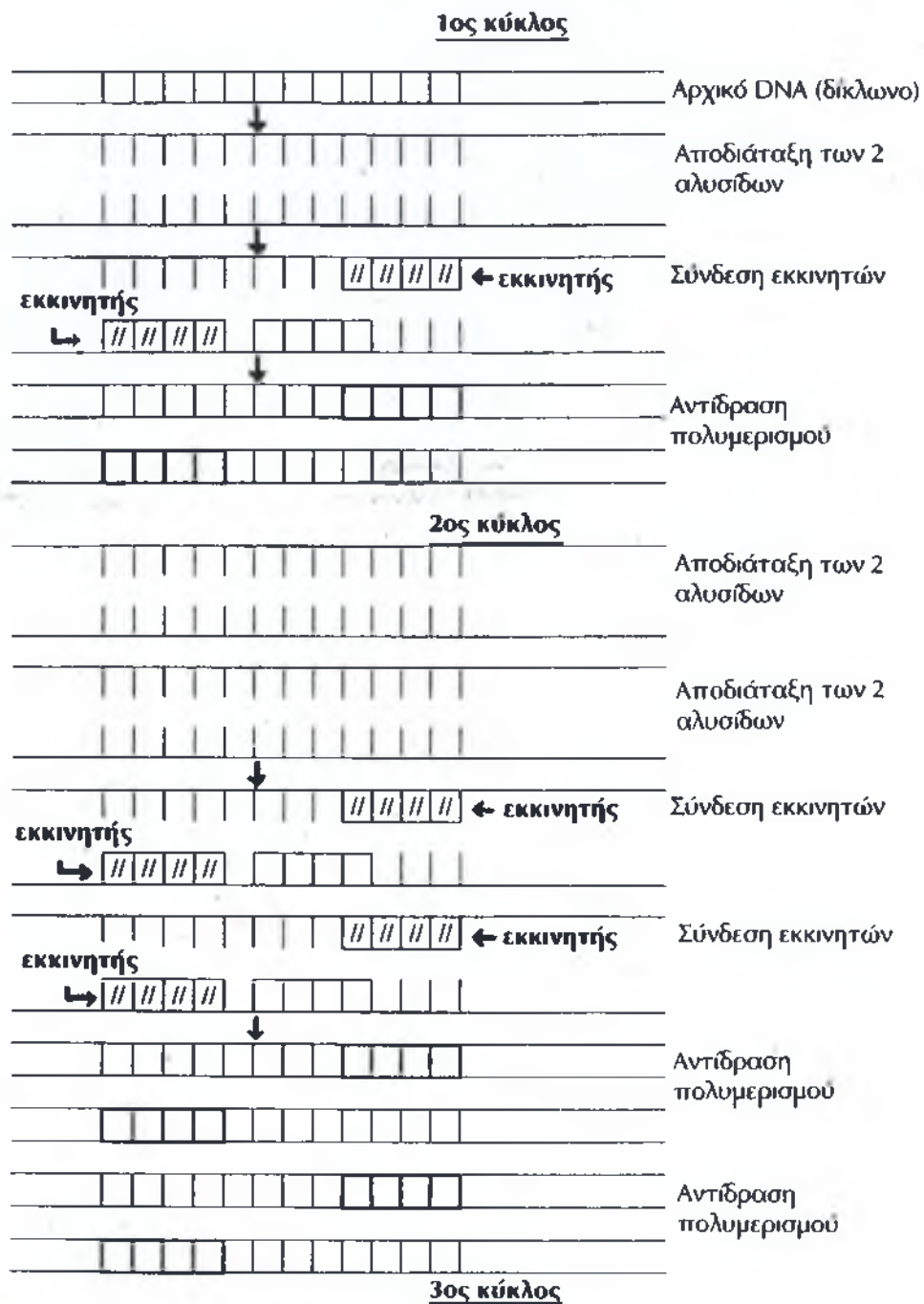
Fragment Length Polymorphism) και RAPD-PCR (Random Amplified Polymorphic DNA ή PCR).

Η τεχνική RAPD-PCR επιτρέπει τη μελέτη της δομής του πληθυσμού μικροοργανισμών (μυκήτων, βακτηρίων) οι οποίοι έχουν λίγα διακριτά μορφολογικά χαρακτηριστικά ή είναι σε μερικές περιπτώσεις δύσκολο να χαρακτηριστούν με τη χρήση των κλασικών μεθόδων της φυτοπαθολογίας (Williams *et al.*, 1990). Επιπλέον η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται για την ανίχνευση γενετικών διαφορών ανάμεσα στα γένη (Adams & Demeke, 1993) ή και στα είδη διαφόρων μυκήτων (Brummer *et al.*, 1995). Μια σημαντική εφαρμογή της τεχνικής RAPD-PCR είναι και η δημιουργία φυλογενετικού χάρτη του είδους, με κριτήριο την ανθεκτικότητα που παρουσιάζει σε κάποια ασθένεια (Haley *et al.*, 1993).

Η RAPD-PCR είναι παραλλαγή της μεθόδου PCR. Στην πρωταρχική μορφή της η τεχνική PCR επιτυγχάνει τον ενζυματικό πολλαπλασιασμό ορισμένων τμημάτων του DNA μέσα από επανειλημμένους κύκλους αποδιάταξης και διαχωρισμού του DNA σε μονές αλυσίδες και στη συνέχεια του πολυμερισμού των αλυσίδων αυτών (Εικ. 6). Η τεχνική PCR στηρίζεται στην ικανότητα μιας προεπιλεγμένης περιοχής του DNA να πολλαπλασιάζεται εφόσον είναι γνωστές οι αλληλουχίες των άκρων της περιοχής αυτής (Annamma *et al.*, 1995). Για τον πολλαπλασιασμό μιας προεπιλεγμένης περιοχής του DNA χρησιμοποιούνται εκκινητές (primers) που προσκολλώνται στα δύο άκρα της περιοχής αυτής. Οι εκκινητές αυτοί, που είναι μικρά τμήματα μονής αλυσίδας DNA, συνήθως μεγέθους 15-20 νουκλεοτιδίων τα οποία είναι συμπληρωματικά του στόχου στο 5' και 3' άκρο του αντίστοιχα, είναι απαραίτητοι για να αρχίσει η αντιγραφή της αλυσίδας από την ουσία DNA πολυμεράση (Stoflet *et al.* 1988).

Κατά την εφαρμογή της τεχνικής PCR ακολουθείται η εξής διαδικασία:

- α) Αρχικά γίνεται αποδιάταξη και διαχωρισμός του DNA σε δύο μονές αλυσίδες, με θέρμανση στους 95°C περίπου.
- β) Στη συνέχεια η θερμοκρασία της αντίδρασης μειώνεται σε βαθμό που εξαρτάται από το μέγεθος των εκκινητών και από την περιεκτικότητά τους σε Αδενίνη ή Θυμίνη και Κυτοσίνη ή Γουανίνη ώστε να γίνει υβριδισμός των εκκινητών με τα ομόλογα (συμπληρωματικά) τμήματά τους στις μονές αλυσίδες.
- γ) Τέλος αυξάνεται και πάλι η θερμοκρασία για να γίνει η διάσπαση των δεσμών υδρογόνου ανάμεσα στις δύο αλυσίδες του DNA (Εικ. 6).



Εικόνα 6. Η βασική αρχή της Αλυσιδωτής Αντίδρασης της Πολυμεράσης (PCR) (Φανουράκης, 1999).

Στην μέθοδο PCR τα τρία παραπάνω στάδια συνθέτουν ένα κύκλο. Ο ίδιος κύκλος πολυμερισμού επαναλαμβάνεται πολλές φορές. Σε κάθε κύκλο όλα τα αντίγραφα του τμήματος-στόχου DNA που έχουν δημιουργηθεί ως τότε, χρησιμεύουν ως πρωτότυπα για τον επόμενο κύκλο με αποτέλεσμα ο αριθμός των αντιγράφων να αυξάνεται εκθετικά μετά από κάθε κύκλο (Εικ. 6). Μετά από επανειλημμένους κύκλους πολυμερισμού γίνεται ηλεκτροφόρηση σε πήγμα αγαρόζης ή πολυακρυλαμίδης αφού προηγουμένως οι πολλαπλασιασμένες περιοχές DNA βαφτούν σε διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου. Με τον τρόπο αυτόν οι περιοχές αυτές του DNA εμφανίζονται ως φωτεινές ζώνες (μπάντες) κάτω από υπεριώδη φωτισμό (Annama *et al.*, 1995). Για να αποφευχθεί η καταστροφή της ουσίας DNA πολυμεράσης κατά τη διάρκεια της θέρμανσης που γίνεται σε κάθε κύκλο πολυμερισμού, χρησιμοποιείται η ουσία Taq DNA πολυμεράση. Η πολυμεράση αυτή έχει απομονωθεί από το θερμόφιλο βακτήριο *Thermus aquaticus* και είναι ανθεκτική στην υψηλή θερμοκρασία. Με αυτόν τον τρόπο αποφεύγεται η προσθήκη νέας ποσότητας DNA πολυμεράσης μετά από κάθε κύκλο πολυμερισμού.

Σε αντίθεση με τη βασική PCR που περιγράφεται παραπάνω, όπου ο υβριδισμός των εκκινητών είναι απόλυτα εξειδικευμένος για το 5' και 3' άκρο του DNA-στόχου, στην παραλλαγή της μεθόδου δηλ. την τεχνική RAPD-PCR, επιζητείται ο μη εξειδικευμένος υβριδισμός, συνήθως ενός δεκαμερούς (δέκα νουκλεοτίδια) σε περισσότερες θέσεις και σε ολόκληρο το γονίωμα. Αυτό επιτυγχάνεται με το μικρό μέγεθος του χρησιμοποιούμενου εκκινητή και τη χαμηλή, μη εξειδικευμένη θερμοκρασία υβριδισμού που εφαρμόζεται (35-40°C). Υπό αυτές τις συνθήκες, ο εκκινητής υβριδίζει σε περισσότερες θέσεις με την αλυσίδα του DNA με αποτέλεσμα στη φάση της επέκτασης της DNA πολυμεράσης να προκύπτουν προϊόντα τμημάτων αλυσίδας DNA διαφορετικού μεγέθους. Με αυτόν τον τρόπο και χρησιμοποιώντας την ίδια σύσταση του μίγματος αντίδρασης με εκείνη της PCR και εναλλαγή θερμοκρασιών στον θερμικό κυκλοποιητή αναπαράγεται σταθερά η ίδια ομάδα τμημάτων DNA που αντιστοιχούν σε μια συγκεκριμένη απομόνωση ενός μύκητα. Έτσι αν θέλουμε να εφαρμόσουμε τη μέθοδο RAPD-PCR για να διαχωρίσουμε μια ομάδα απομονώσεων ενός μύκητα ως προς μια ιδιότητά τους π.χ απομονώσεις ενός μύκητα που προέρχονται από διαφορετικό είδος φυτού, δοκιμάζουμε ένα μεγάλο αριθμό εκκινητών (screening) και επιλέγουμε εκείνους που δίνουν για τις απομονώσεις του μύκητα που προέρχονται από διαφορετικό ξενιστή, διαφορετικού μεγέθους τμήματα DNA (μπάντες).

Τα αποτελέσματα γίνονται ορατά μετά από οριζόντια ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR σε πήγμα αγαρόζης, βάψιμο του πήγματος με βρωμιούχο αιθίδιο, έκθεσή του σε UV φωτισμό και φωτογράφησή του. Στη συνέχεια, τα αποτελέσματα αναλύονται στατιστικά με τη χρήση ειδικών προγραμμάτων για ηλεκτρονικούς υπολογιστές, όπου εμφανίζονται υπό τη μορφή δενδρογράμματος με τη βοήθεια του οποίου γίνεται η τελική εκτίμηση των τυχόν γενετικών διαφορών μεταξύ των απομονώσεων του μύκητα.

Στη Διεθνή Βιβλιογραφία υπάρχουν αρκετές αναφορές για τη χρησιμοποίηση μοριακών δεικτών με σκοπό τη διαφοροποίηση ειδών του γένους *Alternaria*. Πιο συγκεκριμένα οι Cooke *et al.* (1998) χρησιμοποιώντας έξι εκκινητές και εφαρμόζοντας την τεχνική RAPD-PCR διαφοροποίησαν γενετικά 13 φυτοπαθογόνα είδη του γένους *Alternaria*. Οι ίδιοι ερευνητές διαπίστωσαν ότι υπήρχαν αρκετές ομοιότητες σε μοριακό επίπεδο μεταξύ των απομονώσεων του είδους *A. brassicae*, διαφορετικής γεωγραφικής προέλευσης γεγονός το οποίο δεν παρατηρήθηκε σε άλλα είδη του γένους *Alternaria*. Επιπλέον, οι Sharma & Tewari (1998) διαφοροποίησαν με την τεχνική RAPD-PCR τρία είδη του γένους *Alternaria*, τα *A. brassicae*, *A. brassicicola* και *A. raphani* που προσβάλλουν τα σταυρανθή χρησιμοποιώντας πέντε εκκινητές. Στην ίδια μελέτη διαπιστώθηκαν διαφορές και μεταξύ των απομονώσεων του ίδιου είδους. Οι Pryor & Gilbertson (2002) χρησιμοποιώντας την τεχνική RAPD-PCR διαφοροποίησαν το είδος *A. petroselini* από τα *A. radicina* και *A. carotiincultae* που προσβάλλουν φυτά της Οικογένειας Umbelliferae. Στην ίδια εργασία μάλιστα αναφέρεται ότι πιθανόν οι μύκητες *A. radicina* και *A. carotiincultae* να ανήκουν το ίδιο είδος. Σύμφωνα με τους Morris *et al.* (2000) διαπιστώθηκε μεγάλη γενετική ανομοιομορφία μεταξύ 69 απομονώσεων του μύκητα *A. alternata*. Πιο συγκεκριμένα με τη βοήθεια της μεθόδου RAPD και χρησιμοποιώντας 29 εκκινητές διαφοροποιήθηκαν δύο ομάδες απομονώσεων, μια που περιελάμβανε 55 απομονώσεις και μια δεύτερη που αποτελείτο από 14 απομονώσεις. Επιπλέον, διαπιστώθηκε ότι οι γενετικές διαφορές που εντοπίστηκαν μεταξύ των δύο ομάδων απομονώσεων ήταν ανεξάρτητες από τη γεωγραφική προέλευση των απομονώσεων. Σε ότι αφορά το μύκητα *A. solani* μοναδική αναφορά γίνεται από τους Weir *et al.* (1998) οι οποίοι μελετώντας 35 απομονώσεις του μύκητα *A. solani* από φυτά τομάτας και πατάτας και εφαρμόζοντας την τεχνική RAPD-PCR διαπίστωσαν διαφορές σε γενετικό επίπεδο μεταξύ των απομονώσεων ανάλογα με την προέλευσή τους και υπέθεσαν ότι οι διαφορές αυτές πιθανόν να οφείλονται στην εξειδίκευση των απομονώσεων ως προς τον ξενιστή.

1.4. ΑΣΘΕΝΕΙΑ

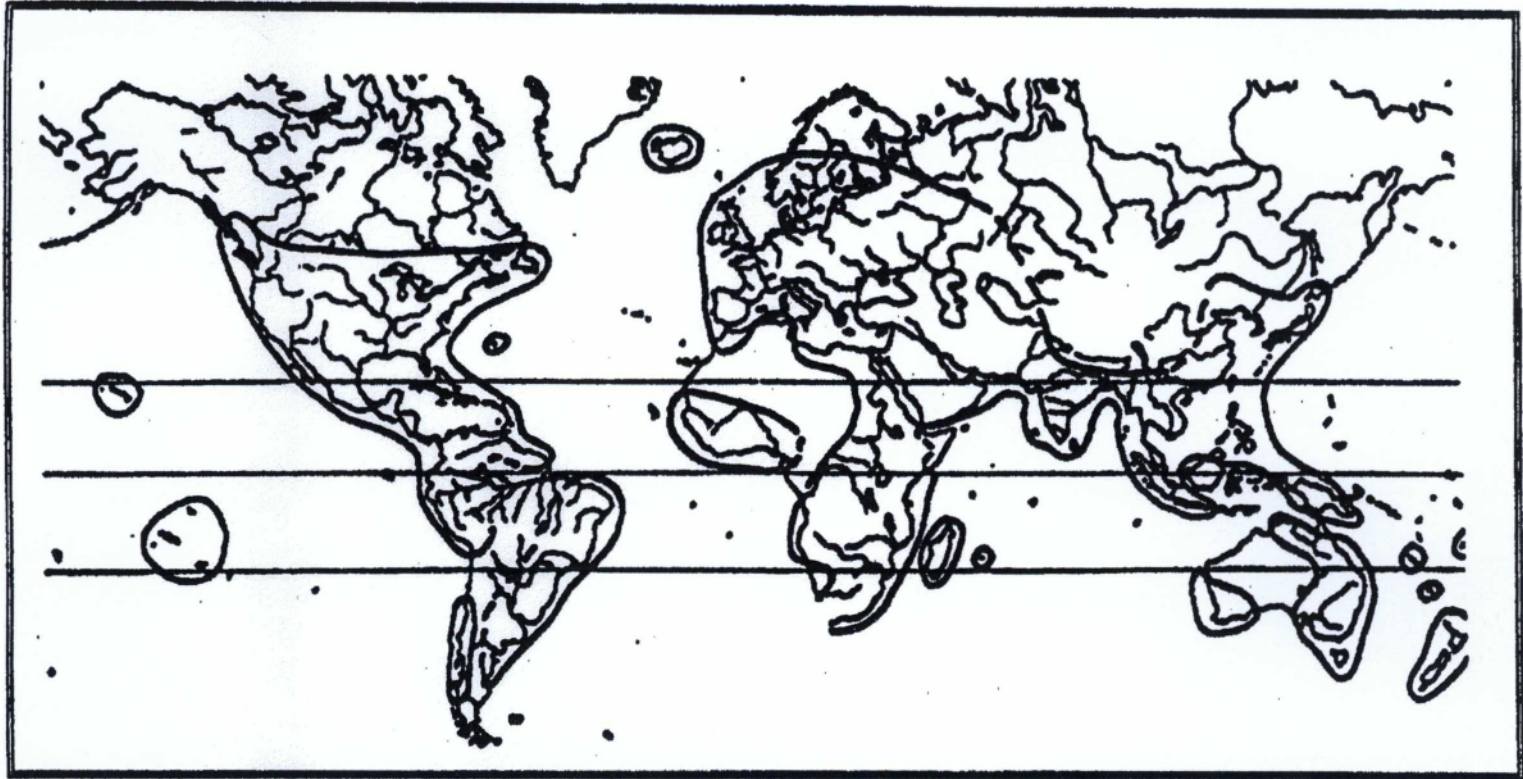
1.4.1. Γεωγραφική εξάπλωση

Η ασθένεια που προκαλεί ο μύκητας *A. solani* στην πατάτα και τομάτα έχει διαπιστωθεί σε πολλές περιοχές του κόσμου (Εικ. 7) (CMI, 1983). Πιο συγκεκριμένα, η ασθένεια εξαπλώνεται από την Ισλανδία έως τις περιοχές του Ισημερινού στην Νότια Αμερική και Αφρική και ακόμη νοτιότερα στα ψυχρά μέρη της Χιλής και Αργεντινής, καθώς και στην Ασία και Νέα Ζηλανδία. Η ασθένεια παρατηρείται κυρίως σε περιοχές με ήπια κλίματα χωρίς υπερβολική ζέστη ή κρύο, είναι όμως πιθανό να παρατηρηθεί και σε περιοχές με ζεστά και υγρά κλίματα (Rotem, 1994).

1.4.2. Συμπτωματολογία

Η ασθένεια που προκαλεί ο μύκητας *A. solani* στην πατάτα και τομάτα είναι γνωστή και ως πρώιμος περονόσπορος (early blight) καθώς τα συμπτώματά της μοιάζουν με αυτά που προκαλεί ο μύκητας *Phytophthora infestans* στην τομάτα και πατάτα (Παναγόπουλος, 2000).

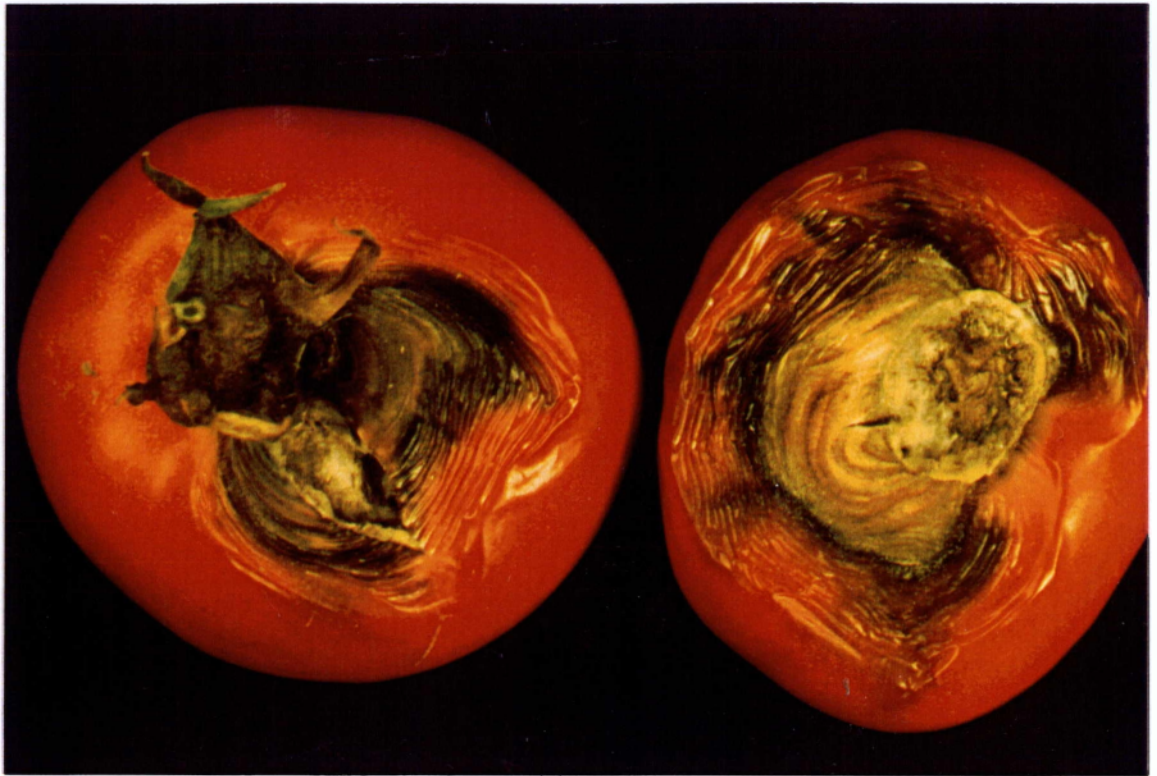
Η ασθένεια μπορεί να προσβάλει όλα τα υπέργεια μέρη του φυτού (φύλλα, στελέχη, άνθη και καρπούς) και τα φυτά είναι ευπαθή στο παθογόνο σε όλα τα στάδια ανάπτυξής τους (Παναγόπουλος, 2000). Ο μύκητας προσβάλλει τα φυτάρια στο σπορείο προκαλώντας προφυτρωτικές και μεταφυτρωτικές τήξεις. Στα νεαρά φυτάρια μετά τη μεταφύτευσή τους εμφανίζονται σκοτεινές καστανές περιοχές στη βάση του στελέχους κοντά στην επιφάνεια του εδάφους (Εικ.8). Αυτές εξελίσσονται προς τα πάνω και γύρω από το στέλεχος και προκαλούν την αποξήρανση του φυτού. Στα ανεπτυγμένα φυτά παρατηρούνται κυκλικές ή γωνιώδεις, καστανές ή μελανές κηλίδες με συγκεντρικούς κύκλους (συγκεντρικές ζώνες) διαμέτρου 3-10mm. Παρόμοιες κηλίδες, που συνήθως παραμένουν μικρές και έχουν τη χαρακτηριστική ζωνωτή εμφάνιση, σχηματίζονται στα στελέχη, τους μίσχους και τους καρπούς κυρίως στα ώριμα φυτά. Οι κηλίδες στα όργανα αυτά είναι συχνά, ιδίως στους καρπούς, λίγο βυθισμένες, ενώ πάνω τους σχηματίζεται μαύρη εξάνθηση (Εικ.9). Σε έντονη προσβολή συχνά παρατηρείται πρόωρη καρπόπτωση. Στους κονδύλους της πατάτας η προσβολή αρχίζει από κάποιο μικρό τραύμα ή σχισμή, στη συνέχεια αυξάνεται σε μέγεθος και έχει δερματώδη υφή. Στα παλαιότερα φύλλα εμφανίζονται κηλίδες οι



Εικόνα 7. Γεωγραφική εξάπλωση του μύκητα *A. solani* Sorauer
(Πηγή: CMI Description Maps of Plant Diseases Map No 89. Edition 5, 1983)



Εικόνα 8. Συμπτώματα προσβολής στελέχους νεαρών φυταρίων τομάτας από το μύκητα *A. solani* (φυσική μόλυνση).



Εικόνα 9. Συμπτώματα προσβολής καρπών τομάτας από το μύκητα *A. solani* (φυσική μόλυνση).



Εικόνα 10. Συμπτώματα προσβολής σε φύλλα τομάτας και πατάτας από το μύκητα *A. solani* (φυσικές μολύνσεις).

οποίες συχνά περιβάλλονται από χλωρωτική άλω (Εικ.10). Τα παλαιότερα φύλλα προσβάλλονται πρώτα, ενώ τα νεότερα αργότερα με την εξέλιξη της ασθένειας. Οι προσβεβλημένοι ιστοί γίνονται τελικά μαύροι, νεκρώνονται και τα έντονα προσβεβλημένα φύλλα ξεραίνονται και πέφτουν πρόωρα. Σε τελικό στάδιο ολόκληρα τα φυτά νεκρώνονται (Παναγόπουλος, 2000).

1.4.3. Επιδημιολογία

Οι πηγές πρωτογενών μολυσμάτων της ασθένειας που προκαλεί ο μύκητας *A. solani* στην τομάτα και πατάτα είναι οι προσβεβλημένες καλλιέργειες, το έδαφος, οι αυτοφυείς ξενιστές (ζιζάνια) κυρίως της Οικογένειας Solanaceae, ο μολυσμένος σπόρος και τα υπολείμματα της καλλιέργειας. Ο μύκητας επιβιώνει στις παραπάνω πηγές ως κονίδια, μυκήλιο και πιθανώς με τη μορφή γλαμυδοσπορίων (Παναγόπουλος, 2000).

Ένας από τους σημαντικότερους παράγοντες του περιβάλλοντος που επηρεάζουν την εμφάνιση της ασθένειας είναι η υγρασία (Rotem, 1994). Οι κύριες πηγές υγρασίας είναι η υψηλή σχετική υγρασία, η βροχή, η δρόσος, η άρδευση και η υγρασία του εδάφους. Ο Rotem (1969) διαπίστωσε ότι η υψηλή εδαφική υγρασία είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της ευπάθειας του ξενιστή στη μόλυνση του παθογόνου. Επιπλέον η αυξημένη σπαργή των φύλλων των φυτών πατάτας, λόγω της ποσότητας του νερού που απορρόφησε το φυτό, μπορεί να προκαλέσει αύξηση της ευπάθειας του ξενιστή στο παθογόνο, ανεξάρτητα από την ποσότητα του νερού που κατακρατεί το έδαφος (Rotem, 1969).

Σύμφωνα με τη Διεθνή Βιβλιογραφία, τα είδη του γένους *Alternaria* αναπτύσσονται καλύτερα σε ζεστά και υγρά περιβάλλοντα και για αυτό το λόγο σοβαρές επιδημίες εμφανίζονται όταν η ημερήσια θερμοκρασία κυμαίνεται από 28-32°C παρουσία υψηλής ατμοσφαιρικής υγρασίας (Rotem, 1994).

Ο Rotem (1965) αναφέρει ότι στο Ισραήλ η ένταση της ασθένειας σε καλλιέργειες τομάτας και πατάτας ήταν μικρότερη το καλοκαίρι, όπου επικρατούσαν οι άριστες συνθήκες για την εμφάνιση της ασθένειας από ότι το χειμώνα, την άνοιξη ή το φθινόπωρο. Το φαινόμενο αυτό οφειλόταν: α) στη μικρότερη πυκνότητα των φυτών στον αγρό κατά την διάρκεια του καλοκαιριού, β) στην επικράτηση μικρότερων περιόδων δροσιάς κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού, και γ) στη συχνή εμφάνιση

θυελλωδών ανέμων κατά τη διάρκεια του φθινοπώρου, που προκαλούσαν τραυματισμούς στα φύλλα των φυτών.

Για τη βλάστηση των κονιδίων και την πραγματοποίηση των μολύνσεων είναι απαραίτητο τα φυτά να είναι βρεγμένα. Η ασθένεια ευνοείται ιδιαίτερος όταν επικρατεί υγρός καιρός επί μερικές ημέρες μετά από μια βροχή. Με ξηρό και θερμό καιρό η ασθένεια παύει να αναπτύσσεται. Η βλάστηση των κονιδίων και η είσοδος του παθογόνου στους φυτικούς ιστούς ευνοείται από χαμηλότερες θερμοκρασίες (άριστη θερμοκρασία 22°C) από ότι η ανάπτυξη του μύκητα (άριστη θερμοκρασία 28°C).

Σύμφωνα με τους Venette & Harrison (1973), οι κόνδυλοι της πατάτας μολύνθηκαν από το παθογόνο μέσω πληγών που δημιουργήθηκαν κατά τη διάρκεια της συγκομιδής γεγονός το οποίο δεν παρατηρήθηκε σε καλλιέργειες που έτυχαν προσεκτικής μεταχείρισης και στις οποίες τηρήθηκαν συνθήκες υγιεινής. Οι ίδιοι ερευνητές διαπίστωσαν μόλυνση τραυματισμένων κονδύλων από το παθογόνο, ανεξάρτητα από το βάθος του εδάφους στο οποίο βρίσκονταν οι κόνδυλοι. Η μόλυνση των κονδύλων πατάτας από το μύκητα *A. solani* μπορεί να μειωθεί με την εφαρμογή χημικών ουσιών πάνω στην επιφάνεια του εδάφους (Venette & Harrison, 1973).

Γενικά ο βιολογικός κύκλος του παθογόνου (βλάστηση κονιδίων, μόλυνση, παραγωγή κονιδιοφόρων και κονιδίων, διασπορά κονιδίων, βλάστηση κονιδίων), κάτω από ευνοϊκές περιβαλλοντικές συνθήκες, είναι πολύ σύντομος με αποτέλεσμα να επαναλαμβάνεται πολλές φορές κατά τη διάρκεια της καλλιεργητικής περιόδου (Rotem, 1994). Σύμφωνα με τον ίδιο ερευνητή όλα τα φυτικά όργανα είναι ευπαθή σε μολύνσεις από το μύκητα *A. solani* και κάτω από ευνοϊκές συνθήκες θερμοκρασίας και υγρασίας, συμπτώματα της ασθένειας μπορεί να εμφανιστούν σε αυτά καθ'όλη τη διάρκεια της καλλιεργητικής περιόδου.

1.4.4. Αντιμετώπιση

Για την αντιμετώπιση της ασθένειας που προκαλεί ο μύκητας *A. solani* στην τομάτα και πατάτα εφαρμόζονται καλλιεργητικά, βιολογικά και χημικά μέτρα.

1.4.4.1. Καλλιεργητικά μέτρα

Σύμφωνα με τον Παναγόπουλο (2000), ένα πολύ σημαντικό καλλιεργητικό μέτρο είναι η απομάκρυνση από τον αγρό ή το θερμοκήπιο και η καταστροφή με κάψιμο των μολυσμένων υπολειμμάτων της καλλιέργειας. Το μέτρο αυτό συμβάλλει αποτελεσματικά στη μείωση των πρωτογενών μολυσμάτων του παθογόνου. Επιπλέον θα πρέπει να αποφεύγεται η συγκαλλιέργεια της πατάτας ή τομάτας με άλλους ξενιστές του παθογόνου όπως με μελιτζάνα, πιπεριά ή καπνό. Ένα εξίσου σημαντικό καλλιεργητικό μέτρο είναι η καταστροφή των ζιζανίων, ιδίως εκείνων της Οικογένειας Solanaceae. Ένα άλλο μέτρο που συμβάλλει στη μείωση των πηγών των πρωτογενών μολυσμάτων είναι η εναλλαγή (αμειψισπορά) των παραπάνω καλλιεργειών με φυτά που δεν είναι ξενιστές του παθογόνου όπως π.χ. σιτηρά.

Οι Lima *et al.* (1997) μελέτησαν διάφορες καλλιεργητικές τεχνικές, όπως εφαρμογή χημικών λιπασμάτων, οργανική λίπανση και χρησιμοποίηση μικροοργανισμών για την αντιμετώπιση του πρώιμου περονόσπορου. Η συνδυασμένη εφαρμογή οργανικής λίπανσης και μικροοργανισμών ήταν πολύ αποτελεσματική, ενώ ο συνδυασμός χημικών λιπασμάτων και μικροοργανισμών δεν έδωσε ικανοποιητικά αποτελέσματα.

Οι Nolte & Ojala (1992) διαπίστωσαν ότι η αποθήκευση των κονδύλων πατάτας αμέσως μετά τη συγκομιδή σε συνθήκες υψηλής σχετικής υγρασίας (90%) και σε θερμοκρασίες 4-10°C, επιτάχυνε την ωρίμανσή τους καθιστώντας τους κονδύλους περισσότερο ανεκτικούς στις προσβολές του μύκητα *A. solani*. Οι ίδιοι ερευνητές επισημαίνουν ότι οι αποθήκες θα πρέπει να καθαρίζονται και να απολυμαίνονται καλά, ώστε να καταστρέφεται κάθε εστία μόλυνσης των κονδύλων. Επιπλέον θα πρέπει οι τραυματισμένοι κόνδυλοι να απομακρύνονται καθώς οι πληγές αποτελούν πηγή εισόδου για το παθογόνο.

Σημαντικό ρόλο στην εμφάνιση και εξάπλωση της ασθένειας αποτελεί και ο χρόνος και ο τρόπος άρδευσης της καλλιέργειας. Η άρδευση θα πρέπει να εφαρμόζεται κατά τη διάρκεια των θερμών ωρών της ημέρας ώστε το φύλλωμα των φυτών να στεγνώνει σε σύντομο χρονικό διάστημα (Nolte & Ojala, 1992).

Τέλος, διαπιστώθηκε ότι η χρησιμοποίηση σε καλλιέργειες θερμοκηπίου τομάτας ενός ειδικού πλαστικού κάλυψης που απορροφά ένα μεγάλο μέρος της υπεριώδους ακτινοβολίας, μείωσε σε σημαντικό ποσοστό την παραγωγή κονιδίων του

μύκητα *A. solani* περιορίζοντας με αυτό τον τρόπο την εξάπλωση της ασθένειας (Vakalounakis, 1991).

1.4.4.2. Βιολογικά μέτρα

Όσον αφορά την αντιμετώπιση του μύκητα *A. solani* με ανταγωνιστικούς μικροοργανισμούς, οι Das & Anima (1968) αναφέρουν ότι η *in vitro* ανάπτυξη του παθογόνου παρεμποδίστηκε σε σημαντικό βαθμό από το μύκητα *Rhizopus stolonifer* και σε μικρότερο βαθμό από τους μύκητες *Trichoderma viride* και *Fusarium equiseti*. Πιο συγκεκριμένα, κατά την καλλιέργεια του μύκητα *A. solani* σε θρεπτικό υπόστρωμα που περιείχε μεταβολίτες του *R. stolonifer*, παρατηρήθηκε ανασχεση της ανάπτυξης του μύκητα καθώς επίσης και παρεμπόδιση της παραγωγής κονιδίων. Όταν και οι δύο μύκητες αναπτύσσονταν μαζί σε τριβλίο Petri, ο βαθμός παρεμπόδισης της ανάπτυξης του μύκητα *A. solani* από το μύκητα *R. stolonifer* ήταν αντιστρόφως ανάλογος της απόστασης μεταξύ των δύο μυκήτων. Το φαινόμενο αυτό αποδόθηκε στην ταχύτατη ανάπτυξη του *R. stolonifer* και την παραγωγή από το μύκητα αυτόν μιας μυκοστατικής ουσίας, που πιθανόν να είναι παράγωγο της κουμαρίνης.

Οι Salgado *et al.* (1999) κατόρθωσαν να απομονώσουν από το έδαφος της επαρχίας Gramma της Κούβας ένα είδος του γένους *Trichoderma* και να μελετήσουν την ανταγωνιστική του δράση ενάντια στο μύκητα *A. solani*. Η ανταγωνιστική δράση αυτής της απομόνωσης συγκρίθηκε με εκείνη της εμπορικής απομόνωσης του μύκητα *Trichoderma harzianum* (A-34) ως προς την αποτελεσματικότητά της στον περιορισμό της ανάπτυξης τριών απομονώσεων του μύκητα *A. solani*. Η κουβανέζικη απομόνωση του μύκητα *Trichoderma* sp. ήταν αποτελεσματική ενάντια στο παθογόνο επηρεάζοντας τόσο την ανάπτυξη του μυκηλίου του όσο και το μεταβολισμό του.

Σύμφωνα με τους Brame & Flood (1983), δύο απομονώσεις του μύκητα *Aureobasidium pullulans* είχαν παρεμποδιστική δράση στην ανάπτυξη του μύκητα *A. solani*. Οι Basin & Katircioglu (1990) μελέτησαν την ανταγωνιστική δράση του βακτηρίου *B. subtilis* μολύνοντας με 12 απομονώσεις του βακτηρίου τις αποικίες επτά παθογόνων μυκήτων εκ των οποίων ένας ήταν και ο μύκητας *A. solani*. Διαπίστωσαν ότι οι απομονώσεις AB-2 και AB-27 του βακτηρίου ήταν οι πλέον ανταγωνιστικές ενάντια όλων των μυκήτων που δοκιμάστηκαν, μειώνοντας την ανάπτυξή τους.

Επίσης, σημαντική παρεμποδιστική δράση στην ανάπτυξη του μύκητα *A. solani* έχουν βακτήρια του γένους *Streptomyces* (El-Abyad *et al.*, 1993).

Παρεμποδιστική δράση στην ανάπτυξη του μύκητα *A. solani* εμφανίζουν όμως και διάφορες ουσίες που απομονώθηκαν από φυτά. Οι Sinden *et al.* (1973) αναφέρουν ότι διάφορα αλκαλοειδή της πατάτας, όπως οι σολανίνη και σολαδίνη, αναστέλλουν σε θρεπτικό υπόστρωμα PDA την ανάπτυξη του παθογόνου.

1.4.4.3. Χημικά μέτρα

Στη Διεθνή Βιβλιογραφία δεν υπάρχουν πολλές αναφορές για την χρησιμοποίηση μυκητοκτόνων ως επενδυτικών των σπόρων με σκοπό την προστασία των νεαρών φυτών από το μύκητα *A. solani*. Αντίθετα υπάρχουν πολλές αναφορές για τη δράση πολλών μυκητοκτόνων κατά του παθογόνου όταν αυτά εφαρμόζονται με ψεκάσμο των φυτών σε συνθήκες αγρού (Rotem, 1994).

Σύμφωνα με τον Παναγόπουλο (2000), για την αντιμετώπιση της ασθένειας συνιστώνται προληπτικοί ψεκάσμοι ανά 7-10 ημέρες με chlorothalonil, dichlofluanid, iprodione, cymoxanil+maneb, folpet, mancozeb, propineb, propineb+cymaxanil, zineb, ziram, metiram ή διθειοκαρβαμιδικά. Τα μυκητοκτόνα της ομάδας των βενζιμιδαζολικών διαπιστώθηκε ότι δεν είναι αποτελεσματικά στην αντιμετώπιση της ασθένειας αφού φαίνεται ότι ο μύκητας εμφανίζει ανθεκτικά στελέχη σε αυτά.

Σε πειράματα που έγιναν από τους Barclay *et al.* (1973) διαπιστώθηκε ότι η υψηλή νιτρική ή η χαμηλή φωσφορική λίπανση που εφαρμόστηκε σε καλλιέργεια τομάτας μείωσε σημαντικά την εμφάνιση της ασθένειας, ενώ ο συνδυασμός τους είχε ως αποτέλεσμα να μηδενιστεί η πιθανότητα εμφάνισης της ασθένειας.

Σύμφωνα με πειράματα που πραγματοποίησαν οι Shtienberg *et al.* (1996), κατά τη σύγκριση της αποτελεσματικότητας δύο ομάδων μυκητοκτόνων δηλ. chlorothalonil και mancozeb (πρώτη ομάδα) και tebuconazole και difenoconazole (δεύτερη ομάδα) για την αντιμετώπιση της ασθένειας σε καλλιέργεια πατάτας, διαπιστώθηκε ότι τα μυκητοκτόνα της δεύτερης ομάδας ήταν πολύ πιο αποτελεσματικά από αυτά της πρώτης. Επιπλέον διαπιστώθηκε ότι το tebuconazole μείωσε σημαντικά την προσβολή των φύλλων της πατάτας σε σχέση με το chlorothalonil.

Όσον αφορά τη δυνατότητα πρόβλεψης της ασθένειας, οι Waggoner & Horsfall (1969) ανέπτυξαν ένα μοντέλο πρόγνωσης εμφάνισης της ασθένειας σε καλλιέργεια

τομάτας το οποίο ονομάζεται EPIDEM. Το EPIDEM βασίζεται στο βιολογικό κύκλο του μύκητα *A. solani* και συνδέει με ένα συστηματικό τρόπο τα βιολογικά χαρακτηριστικά του μύκητα με τις μεταβολές των κλιματολογικών παραγόντων.

Οι Madden *et al.* (1978) ανέπτυξαν και αυτοί ένα μοντέλο πρόγνωσης εμφάνισης της ασθένειας σε καλλιέργεια τομάτας το οποίο ονομάστηκε FAST και μπορούσε να επεξεργαστεί δύο εμπειρικά μοντέλα που βασίζονταν: α) στη μέγιστη και ελάχιστη θερμοκρασία του αέρα, β) στη διάρκεια της σχετικής υγρασίας άνω του 90%, γ) στη βροχόπτωση, και δ) στη μέγιστη και ελάχιστη θερμοκρασία κατά την διάρκεια της περιόδου διύγρανσης των φύλλων. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη σύγκριση των ψεκασμών με βάση το σύστημα FAST και τους ψεκασμούς που ξεκινούσαν δύο και τέσσερις εβδομάδες μετά τη μεταφύτευση, έδειξαν ότι δεν υπήρχαν σημαντικές διαφορές στην εμφάνιση και εξάπλωση της ασθένειας.

Οι Shtienberg *et al.* (1989) ανέπτυξαν ένα μοντέλο προσομοίωσης της ασθένειας του πρώιμου περονόσπορου της πατάτας που βασιζόταν : α) στον καιρό, β) στο στάδιο ανάπτυξης του ξενιστή, γ) στην ανθεκτικότητα της καλλιέργειας στην ασθένεια και δ) στις εφαρμογές των μυκητοκτόνων σε διαφορετικά στάδια ανάπτυξης της καλλιέργειας. Σε πείραμα που διεξήγαγαν οι παραπάνω ερευνητές, διαπιστώθηκε ότι οι εφαρμογές των μυκητοκτόνων κατά τις περιόδους όπου η ασθένεια είχε τις περισσότερες πιθανότητες να εκδηλωθεί, ήταν πολύ πιο αποτελεσματικές από τις εφαρμογές των μυκητοκτόνων στην αρχή ή στο τέλος της καλλιεργητικής περιόδου (Shtienberg *et al.*, 1989).

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα μελέτη συγκρίθηκαν 9 απομονώσεις του μύκητα *Alternaria solani* που προέρχονταν από φυτά τομάτας με 11 απομονώσεις του ίδιου μύκητα από φυτά πατάτας ως προς τη γραμμική αύξηση του μυκηλίου τους, τη μορφολογία των αποικιών τους, την ικανότητα παραγωγής κονιδίων *in vitro* και τον αριθμό των παραγομένων κονιδίων. Πιο συγκεκριμένα διαπιστώθηκε ότι τόσο η γραμμική αύξηση του μυκηλίου όσο και η μορφολογία των αποικιών των απομονώσεων του μύκητα *A. solani* εξαρτιόταν από την προέλευση των απομονώσεων. Οι απομονώσεις του μύκητα που προέρχονταν από φυτά τομάτας εμφάνισαν μεγαλύτερη γραμμική αύξηση μυκηλίου συγκριτικά με τις απομονώσεις του μύκητα από φυτά πατάτας. Επιπλέον διαπιστώθηκαν διαφορές και ως προς τους μορφολογικούς χαρακτήρες των αποικιών του μύκητα. Όλες οι απομονώσεις του μύκητα από φυτά τομάτας εμφάνισαν γκριζό έως μαύρο χρωματισμό, συγκεντρικούς δακτυλίους και έρπον μυκήλιο ενώ οι απομονώσεις από φυτά πατάτας σχημάτισαν αποικίες με υπόλευκο έως γκριζό χρωματισμό και εναέριο μυκήλιο. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, στο θρεπτικό υλικό V-8 άγαρ όλες οι απομονώσεις από φυτά τομάτας παρήγαγαν κονίδια ο αριθμός κυμαινόταν από 8.300 έως 92.200 κονίδια/cm² ενώ ο αντίστοιχος των τριών απομονώσεων από φυτά πατάτας που σχημάτισαν κονίδια ήταν 1.200 κονίδια/cm². Στο θρεπτικό υλικό S-medium όλες οι απομονώσεις ανεξάρτητα προέλευσης σχημάτισαν κονίδια ο αριθμός των οποίων κυμαινόταν από 11.800- 37.900 κονίδια/cm² (φυτά τομάτας) και από 1.200- 17.800 κονίδια/cm² (φυτά πατάτας). Επιπλέον, διαπιστώθηκε ότι οι διαστάσεις των κονιδίων των απομονώσεων του μύκητα από φυτά τομάτας ήταν μεγαλύτερες σε σχέση με τις διαστάσεις των κονιδίων των απομονώσεων του ίδιου μύκητα από φυτά πατάτας. Πιο συγκεκριμένα, στο θρεπτικό υλικό V-8 άγαρ το συνολικό μήκος των κονιδίων των απομονώσεων από φυτά τομάτας ήταν 179-255,2μm, το μήκος ράμφους 100,6-150,8μm και το μέγιστο πλάτος 12,5-14,6μm. Στο θρεπτικό υλικό S-medium το συνολικό μήκος των κονιδίων των απομονώσεων του μύκητα από φυτά τομάτας κυμαινόταν από 199-266,6μm, το μήκος του ράμφους κυμαινόταν από 121-170,4μm, ενώ το μέγιστο πλάτος του σώματος των κονιδίων κυμαινόταν από 15,3-19,2 μm. Σε ότι αφορά τις απομονώσεις του μύκητα από φυτά πατάτας το συνολικό μήκος των κονιδίων κυμαινόταν από 121,2-194 μm, το μήκος του ράμφους κυμαινόταν από 52,8-98,6 μm, ενώ το μέγιστο πλάτος των κονιδίων

κυμαινόταν από 16-19 μπ. Στην παρούσα μελέτη εντοπίστηκαν και γενετικές διαφορές μεταξύ των απομονώσεων του μύκητα από φυτά τομάτας και εκείνων από φυτά πατάτας με τη βοήθεια της μοριακής τεχνικής RAPD-PCR.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο μύκητας *Alternaria solani* Sorauer, που προσβάλλει κυρίως την τομάτα (*Lycopersicon esculentum* Mill) και την πατάτα (*Solanum tuberosum* L.), περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1882 από τους Ellis & Martin ως *Macrosporium solani*. Ο Sorauer λίγο αργότερα (1896) κατέταξε το μύκητα στο γένος *Alternaria* και στο είδος *Alternaria solani*.

Η ασθένεια που προκαλεί ο μύκητας *A. solani* στις καλλιέργειες της πατάτας και τομάτας διαπιστώθηκε για πρώτη φορά το 1882 σε καλλιέργειες πατάτας στις ΗΠΑ, η πρώτη όμως περιγραφή των συμπτωμάτων της ασθένειας έγινε από τους Folsom & Bonde το 1925. Από τότε η ασθένεια έχει διαπιστωθεί σε πολλές χώρες του κόσμου όπου καλλιεργείται η τομάτα και η πατάτα (Jones *et al.*, 1993). Σύμφωνα με τον ίδιο ερευνητή η ασθένεια προκαλεί μεγάλες ζημιές στις καλλιέργειες τομάτας της Αγγλίας, Ινδίας, Αυστραλίας, Ισραήλ και ΗΠΑ. Ο Basu (1971) αναφέρει ότι οι απώλειες στην παραγωγή τομάτας στο Ισραήλ, λόγω της ασθένειας έφτασαν σε ποσοστό 34%, ενώ οι Datar & Mayee (1982) ανέφεραν ότι οι απώλειες στην παραγωγή τομάτας στην Ινδία το 1978 ήταν 78%. Η ασθένεια προκαλεί σημαντικές απώλειες και στην παραγωγή πατάτας των χωρών της Νότιας και Κεντρικής Αμερικής, Ευρώπης, Αφρικής και Ασίας (Bussey & Stevenson, 1991). Οι Stevenson *et al.* (1995) αναφέρουν ότι ο μύκητας *A. solani* είναι το κύριο αίτιο της πρόωρης φυλλόπτωσης των καλλιεργειών στο Ισραήλ όπου οι απώλειες της παραγωγής φτάνουν το 30%, ενώ στην Βραζιλία οι απώλειες της παραγωγής πατάτας φτάνουν μέχρι 73%. Οι Tolman *et al.* (1986) αναφέρουν ότι στην περιοχή Οντάριο του Καναδά η ασθένεια που προκαλεί ο μύκητας *A. solani* προκάλεσε απώλειες στην παραγωγή που έφτασαν μέχρι και 85% ιδίως σε οργανικά εδάφη.

Στη χώρα μας η ασθένεια διαπιστώθηκε για πρώτη φορά σε φυτά τομάτας κοντά στη λίμνη των Ιωαννίνων (Saregianni, 1936). Μέχρι σήμερα η ασθένεια έχει εμφανιστεί σε πολλές περιοχές όπου καλλιεργείται η τομάτα και η πατάτα (Ηλεία, Μεσσηνία, Κρήτη, Ξάνθη, Νευροκόπι, Καλάβρυτα, Δράμα, Εύβοια, Κω, Αιτωλικό, Πρέβεζα, κλπ) προκαλώντας σοβαρές ζημιές, ιδίως σε θερμοκηπιακές καλλιέργειες τομάτας (στοιχεία αρχείου Μπενακείου Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου).

Το παθογόνο προσβάλλει τα νεαρά φυτάρια τομάτας στο σπορείο προκαλώντας προφυτρωτικές και μεταφυτρωτικές τήξεις φυταρίων (Jones *et al.*, 1993). Επιπλέον

σύμφωνα με τον ίδιο ερευνητή εμφανίζονται έλκη στο λαιμό και στο στέλεχος και κηλίδες στα φύλλα και τους καρπούς. Στα φυτά της πατάτας ο μύκητας προσβάλλει επίσης τους κονδύλους προκαλώντας κηλιδώσεις και στη συνέχεια σήψεις, που συνήθως μειώνουν την ποιοτική και ποσοτική αξία του προϊόντος (Hooker, 1981).

Στη Διεθνή Βιβλιογραφία υπάρχουν αρκετές πληροφορίες που αφορούν τη βιολογία του παθογόνου (βλάστηση κονιδίων, είσοδος στο ξενιστή, παραγωγή κονιδίων *in vitro* και *in vivo*, διασπορά κονιδίων, διαχείμαση), την επιδημιολογία της ασθένειας καθώς και την αποτελεσματικότητα διαφόρων μυκητοκτόνων με σκοπό την αντιμετώπιση της ασθένειας στις καλλιέργειες της τομάτας και πατάτας. Επιπλέον, υπάρχουν αναφορές για την ύπαρξη φυλών στο φυσικό πληθυσμό του μύκητα *A. solani* που διαφέρουν στους καλλιεργητικούς και μορφολογικούς χαρακτήρες καθώς και στο βαθμό παθογένειας (Bonde, 1929; Henning & Alexander, 1959; Ivanyuk, 1979). Σε όλες τις παραπάνω εργασίες μελετήθηκαν απομονώσεις που είχαν κοινή προέλευση, δηλ. απομονώσεις του μύκητα από φυτά τομάτας ή απομονώσεις του μύκητα από φυτά πατάτας. Εντούτοις δεν έχει γίνει μέχρι σήμερα σύγκριση μεταξύ απομονώσεων του μύκητα *A. solani* από φυτά τομάτας και εκείνων από φυτά πατάτας ως προς τους μορφολογικούς και καλλιεργητικούς χαρακτήρες, την παραγωγή κονιδίων *in vitro* καθώς και τυχόν διαφοροποίηση των απομονώσεων του μύκητα από φυτά τομάτας από εκείνες από φυτά πατάτας με τη χρήση μοριακών μεθόδων.

Ως εκ τούτου, σκοποί της παρούσας μελέτης ήταν:

1. Η σύγκριση απομονώσεων του μύκητα *A. solani* που προέρχονται από φυτά τομάτας με εκείνες που προέρχονται από φυτά πατάτας ως προς τη γραμμική αύξηση του μυκηλίου τους, τη μορφολογία των αποικιών, την ικανότητα παραγωγής κονιδίων *in vitro* και τις διαστάσεις των κονιδίων τους.
2. Η τυχόν διαφοροποίηση των απομονώσεων του μύκητα όσον αφορά στην προέλευσή τους (απομονώσεις από φυτά τομάτας και απομονώσεις από φυτά πατάτας) με τη χρήση μοριακών μεθόδων.

ΔΕΥΤΕΡΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΓΕΝΙΚΑ ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Θρεπτικά υλικά ανάπτυξης

Στα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω θρεπτικά υλικά ανάπτυξης:

1. Plain Agar (PA)

Bacteriological Agar Type A (Biokar Diagnostics)..... 15g

Απεσταγμένο νερό 1lt

2. Potato Dextrose Agar (PDA)

Potato Dextrose Agar (Biokar Diagnostics) 39g

Απεσταγμένο νερό 1lt

3. Χυμός οκτώ λαχανικών με άγαρ (V-8 άγαρ)

Χυμός V-8 (χυμός οκτώ λαχανικών)..... 165ml

Calcium Carbonate (CaCO₃) (Sigma)..... 1g

Bacteriological Agar Type A (Biokar Diagnostics)..... 20g

Απεσταγμένο νερό 810ml

Πριν την αποστείρωση, το pH του παραπάνω υλικού ρυθμιζόταν σε 6,5-7,0 με προσθήκη 0,1M KOH (12,5ml KOH / lt υλικού).

4. S-medium (Shahin & Shepard, 1979)

Sucrose (Merck)..... 20g

Calcium Carbonate (CaCO₃) (Sigma)..... 30g

Bacteriological Agar Type A (Biokar Diagnostics)..... 20g

Απεσταγμένο νερό 1lt

pH = 7,4

Όλα τα παραπάνω θρεπτικά υλικά αποστειρώνονταν σε κλίβανο (1,05 kg/cm²) για 30 min και σε θερμοκρασία 120°C. Στη συνέχεια τοποθετούνταν κάτω από ασηπτικές συνθήκες σε πλαστικά τριβλία Petri (20ml/τριβλίο).

2.2. Απομονώσεις του μύκητα

Στα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν εννέα (9) μονοκονιδιακές απομονώσεις του μύκητα *A. solani* από τομάτα (AL 24, AL 25, AL 29, AL 61, AL 62, AL 94, AL 95, AL 96, AL 97) και έντεκα (11) μονοκονιδιακές απομονώσεις του μύκητα *A. solani* από πατάτα (AL 78α, AL 83, AL 85, AL 86, AL 87, AL 88, AL 89, AL 90, AL 91, AL 92, AL 93). Όλες οι απομονώσεις προέρχονταν από φυσικά μολυσμένα φυτά που εστάλησαν στο Εργαστήριο Μυκητολογίας του Μπενακείου Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου κατά την περίοδο 1997-1999 από διάφορες περιοχές της χώρας (Ηλεία, Μεσσηνία, Πρέβεζα, Καλάβρυτα). Για την απομόνωση του μύκητα από τα φυσικά μολυσμένα φυτά τομάτας και πατάτας εφαρμόστηκε η παρακάτω μέθοδος : φύλλα που παρουσίαζαν τυπικά συμπτώματα της ασθένειας, όπως νεκρωτικές κηλίδες, τοποθετήθηκαν σε υγρό θάλαμο (γυάλινα τριβλία διαμέτρου 9 cm στη βάση των οποίων είχαν τοποθετηθεί τρία διηθητικά φίλτρα Whatman No 1 εμποτισμένα με απεσταγμένο νερό). Τα τριβλία κλείστηκαν με Parafilm και τοποθετήθηκαν σε θερμοκρασία 21°C και συνθήκες εναλλαγής υπεριώδους ακτινοβολίας με σκότος (12h NUV-light/12h σκότος) για 24h με σκοπό την παραγωγή κονιδίων από το μύκητα. Μετά το τέλος του παραπάνω χρόνου επώασης οι κηλίδες εξετάστηκαν στο στερεοσκόπιο για την παρουσία κονιδίων του μύκητα. Στη συνέχεια κονίδια του μύκητα μεταφέρθηκαν ασηπτικά με τη βοήθεια μικροβιολογικής βελόνας σε δοκιμαστικούς σωλήνες που περιείχαν θρεπτικό υλικό ανάπτυξης Potato Dextrose Agar (PDA) (για την παρασκευή του υλικού βλέπε παράγραφο 2.1.) οι οποίοι επώαστηκαν σε θερμοκρασία 21°C στο σκοτάδι για την ανάπτυξη των αποικιών του μύκητα.

2.3. Διατήρηση των απομονώσεων

Είναι γνωστό ότι ο μύκητας *A. solani*, όπως και άλλα είδη του γένους *Alternaria*, χάνει την ικανότητα παραγωγής κονιδίων *in vitro* ή την παθογένεια του μετά από σειρά διαδοχικών μεταφορών του σε συνθετικά θρεπτικά υλικά. Ως εκ τούτου, για τη διατήρηση τόσο της ικανότητας παραγωγής κονιδίων όσο και της παθογένειας των απομονώσεων του μύκητα *A. solani* που χρησιμοποιήθηκαν στη παρούσα μελέτη (AL 24, AL 25, AL 29, AL 61, AL 62, AL 94, AL 95, AL 96, AL 97,

AL 78a, AL 83, AL 85, AL 86, AL 87, AL 88, AL 89, AL 90, AL 91, AL 92, AL 93) εφαρμόστηκε η παρακάτω μέθοδος: ένας μυκηλιακός δίσκος διαμέτρου 5 mm, που κόπηκε με τη βοήθεια φελλοτρυπητή από την περιφέρεια αποικίας της κάθε απομόνωσης του μύκητα *A. solani* τοποθετήθηκε ανεστραμμένος (το μυκήλιο σε επαφή με το υλικό) σε πλαστικό τριβλίο Petri (διαμέτρου 9mm) που περιείχε θρεπτικό υλικό V-8 άγαρ (για την παρασκευή του υλικού βλέπε παράγραφο 2.1.). Τα τριβλία κλείστηκαν με Parafilm και τοποθετήθηκαν σε θερμοκρασία 21°C και συνθήκες εναλλαγής υπεριώδους ακτινοβολίας με σκότος (12h NUV-light/12h σκότος) μέχρι την πλήρη ανάπτυξη των αποικιών (4 ημέρες περίπου). Στη συνέχεια μπουκαλάκια McCartney συμπληρώθηκαν κατά τα 2/3 του όγκου τους με μίγμα αργιλώδους εδάφους, κομπόστας και άμμου σε αναλογία 1:2:1. Σε κάθε μπουκαλάκι McCartney προστέθηκαν 5ml απεσταγμένου νερού και ακολούθησε διπλή αποστείρωση (διάστημα μεταξύ των δύο αποστειρώσεων 24h) σε θερμοκρασία 120°C για 30 min κάθε φορά. Εικοσιτέσσερις ώρες μετά την τελευταία αποστείρωση, σε κάθε μπουκαλάκι McCartney τοποθετήθηκαν, κάτω από ασηπτικές συνθήκες, δύο μυκηλιακοί δίσκοι διαμέτρου 5 mm ο καθένας, που είχαν προηγουμένως κοπεί με τη βοήθεια φελλοτρυπητή και κάτω από ασηπτικές συνθήκες από την περιφέρεια μιας αποικίας της κάθε απομόνωσης. Στη συνέχεια τα μπουκαλάκια McCartney επωάστηκαν σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι το μίγμα αργιλώδους εδάφους, κομπόστας και άμμου να εποικιστεί πλήρως (ανάπτυξη εναέριου μυκηλίου) από το μύκητα (4 ημέρες περίπου). Αμέσως μετά τα μπουκαλάκια McCartney με τις μονοκονιδιακές απομονώσεις του μύκητα τοποθετήθηκαν σε θερμοκρασία 4°C για περαιτέρω χρήση.

Η αναβίωση των μονοκονιδιακών απομονώσεων του μύκητα *A. solani* για τις ανάγκες των πειραμάτων γινόταν σύμφωνα με την παρακάτω διαδικασία: μια μικρή ποσότητα εποικισμένου με το μύκητα μίγματος εδάφους μεταφερόταν κάτω από ασηπτικές συνθήκες σε πλαστικά τριβλία Petri με θρεπτικό υλικό V-8 άγαρ. Στη συνέχεια τα τριβλία επωάζονταν σε θερμοκρασία 21°C και σε συνθήκες εναλλαγής υπεριώδους ακτινοβολίας με σκότος (12h NUV-light/12h σκότος) μέχρι την πλήρη ανάπτυξη των αποικιών (4 ημέρες περίπου).

2.4. Παραγωγή μονοκονιδιακών απομονώσεων

Για την παραγωγή μονοκονιδιακών απομονώσεων του μύκητα *A. solani* χρησιμοποιήθηκε η παρακάτω μέθοδος: από τις καλλιέργειες των απομονώσεων του μύκητα σε δοκιμαστικούς σωλήνες με θρεπτικό υλικό PDA, μεταφέρθηκαν μυκηλιακά τεμάχια και κάτω από ασηπτικές συνθήκες στο κέντρο τριβλίων με θρεπτικό υλικό V-8 άγαρ (ένα μυκηλιακό τεμάχιο ανά τριβλίο και απομόνωση). Στη συνέχεια τα τριβλία κλείστηκαν με Parafilm και επώαστηκαν σε θερμοκρασία 21°C και συνθήκες εναλλαγής υπεριώδους ακτινοβολίας με σκότος (12h NUV-light/12h σκότος) για 48h. Ακολούθως, μυκηλιακοί δίσκοι διαμέτρου 5 mm ο καθένας, που είχαν προηγουμένως κοπεί με τη βοήθεια φελλοτρυπητή και κάτω από ασηπτικές συνθήκες από την περιφέρεια της αποικίας της κάθε απομόνωσης, τοποθετήθηκαν, ανεστραμμένοι (το μυκήλιο σε επαφή με το υλικό) στο κέντρο πλαστικών τριβλίων Petri (διαμέτρου 9mm) που περιείχαν θρεπτικό υλικό V-8 άγαρ. Στη συνέχεια τα τριβλία επώαστηκαν σε θερμοκρασία 21°C και σε συνθήκες εναλλαγής υπεριώδους ακτινοβολίας με σκότος (12h NUV-light/12h σκότος) μέχρι την παραγωγή κονιδίων (4 ημέρες περίπου). Στη συνέχεια σε κάθε τριβλίο τοποθετήθηκαν 5ml απεσταγμένου, νερού στο οποίο είχαν προστεθεί 0,1 ml του διαβρεκτικού παράγοντα Tween 80 (0,01% polyethylene sorbitan monolaurate) για την αποφυγή δημιουργίας συσσωματωμάτων κονιδίων. Κατόπιν ακολούθησε, κάτω από ασηπτικές συνθήκες, με τη βοήθεια αποστειρωμένης γυάλινης κεκαμμένης ράβδου, απαλό τρίψιμο της επιφάνειας της αποικίας με σκοπό την απελευθέρωση των κονιδίων του μύκητα. Το αιώρημα κονιδίων που προέκυψε, αφού διηθήθηκε με σκοπό την απομάκρυνση των μυκηλιακών υφών, συγκεντρώθηκε ξεχωριστά για κάθε απομόνωση σε γυάλινους δοκιμαστικούς σωλήνες. Στη συνέχεια υπολογίστηκε με τη βοήθεια αιματοκυττομέτρου η συγκέντρωση κονιδίων της κάθε απομόνωσης και έγινε αναγωγή σε τελική συγκέντρωση 1×10^3 κονίδια/ml με διαδοχικές αραιώσεις με αποστειρωμένο, απεσταγμένο νερό. Ακολούθως, ποσότητα 0,1ml από το αιώρημα κονιδίων της κάθε απομόνωσης μεταφέρθηκε με τη βοήθεια μικρομετρικής πιπέτας και κάτω από ασηπτικές συνθήκες, σε τριβλία με θρεπτικό υλικό Plain Agar (PA) και ακολούθησε άπλωμα των κονιδίων στην επιφάνεια του θρεπτικού υλικού (plating) με τη βοήθεια αποστειρωμένης γυάλινης κεκαμμένης ράβδου. Με τον τρόπο αυτό σε κάθε τριβλίο τοποθετήθηκαν περίπου 100 κονίδια του μύκητα. Σε επόμενο στάδιο, τα τριβλία εξετάστηκαν στο στερεοσκόπιο (μεγέθυνση x400) με σκοπό τον εντοπισμό στην επιφάνεια του θρεπτικού υλικού μεμονωμένων

κονιδίων του μύκητα. Στη συνέχεια με τη βοήθεια αποστειρωμένης μικροβιολογικής βελόνας έγινε κάτω από ασηπτικές συνθήκες μεταφορά μεμονωμένων κονιδίων σε ισάριθμους γυάλινους δοκιμαστικούς σωλήνες που περιείχαν θρεπτικό υλικό PDA. Οι δοκιμαστικοί σωλήνες επώστηκαν σε θερμοκρασία 21°C για 4 ημέρες μέχρι την πλήρη ανάπτυξη των αποικιών του μύκητα. Οι μεμονωμένες αποικίες που προέκυψαν από κάθε απομόνωση αποτέλεσαν τις μονοκονιδιακές απομονώσεις του μύκητα, οι οποίες διατηρήθηκαν σε θερμοκρασία 4°C σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφεται παραπάνω (παράγραφος 2.3.).

2.5. Στατιστική ανάλυση

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων αναλύθηκαν με τη βοήθεια του στατιστικού προγράμματος για ηλεκτρονικούς υπολογιστές SPSS 9.0 εφαρμόζοντας ανάλυση παραλλακτικότητας (ANOVA) και διαχωρισμό των μέσων με τη δοκιμή κατά Duncan.

ΠΕΙΡΑΜΑ ΠΡΩΤΟ: Σύγκριση απομονώσεων του μύκητα *A. solani* από φυτά τομάτας και πατάτας με τη χρήση μεθόδων κλασικής Φυτοπαθολογίας.

Σκοπός

Σκοπός του πειράματος ήταν να συγκριθούν οι απομονώσεις του μύκητα *A. solani* που προέρχονται από φυτά τομάτας με εκείνες από φυτά πατάτας ως προς τη γραμμική αύξηση του μυκηλίου τους σε θρεπτικό υλικό V-8 άγαρ, τη μορφολογία των αποικιών, την ικανότητα παραγωγής κονιδίων *in vitro*, τον αριθμό των παραγομένων κονιδίων καθώς και τις διαστάσεις των κονιδίων τους με τη χρήση μεθόδων της κλασικής Φυτοπαθολογίας.

Υλικά και Μέθοδοι

1. Γραμμική αύξηση μυκηλίου

Για τη συγκριτική μελέτη της γραμμικής αύξησης του μυκηλίου σε θρεπτικό υλικό ανάπτυξης V-8 άγαρ χρησιμοποιήθηκαν εννέα (AL 24, AL 25, AL 29, AL 61, AL 62, AL 94, AL 95, AL 96, AL 97) και έντεκα (AL 78a, AL 83, AL 85, AL 86, AL 87, AL 88, AL 89, AL 90, AL 91, AL 92, AL 93) μονοκονιδιακές απομονώσεις του μύκητα *A. solani* που προέρχονταν από φυσικά μολυσμένα φυτά τομάτας και πατάτας, αντίστοιχα. Η παρασκευή του θρεπτικού υλικού έγινε σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφεται στα Γενικά Υλικά και Μέθοδοι (παράγραφο 2.1.). Η αναβίωση των καλλιεργειών των παραπάνω απομονώσεων από τη συλλογή στην οποία διατηρούνταν (μπουκαλάκια McCartney) έγινε σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφεται στα Γενικά Υλικά και Μέθοδοι (παράγραφο 2.3.). Για κάθε απομόνωση χρησιμοποιήθηκαν τρία τριβλία ως επαναλήψεις. Μυκηλιακοί δίσκοι διαμέτρου 5mm κόπηκαν με τη βοήθεια φελλοτρυπητή και τοποθετήθηκαν κάτω από ασηπτικές συνθήκες και ανεστραμμένοι (το μυκήλιο σε επαφή με το υλικό) στο κέντρο πλαστικών τριβλίων Petri που περιείχαν θρεπτικό υλικό V-8 άγαρ (20ml/τριβλίο, ένας μυκηλιακός δίσκος ανά τριβλίο). Τα τριβλία σφραγίστηκαν με Parafilm και επώστηκαν για 7 ημέρες σε θερμοκρασία 21°C

στο σκοτάδι. Μετά από 2, 4 και 7 ημέρες επώασης των τριβλίων στις παραπάνω συνθήκες, έγινε η πρώτη, η δεύτερη και η τρίτη μέτρηση της διαμέτρου των αναπτυσσόμενων αποικιών σε cm και υπολογίστηκε η γραμμική αύξηση του μυκηλίου. Μετρήθηκαν δύο κάθετοι διάμετροι της αποικίας από την κάθε απομόνωση του μύκητα *A. solani* και στη συνέχεια υπολογίστηκε ο μέσος όρος τους.

2. Μορφολογία αποικιών

Μελετήθηκε σε θρεπτικό υλικό ανάπτυξης V-8 άγαρ η μορφολογία των αποικιών εννέα (AL 24, AL 25, AL 29, AL 61, AL 62, AL 94, AL 95, AL 96, AL 97) και έντεκα (AL 78a, AL 83, AL 85, AL 86, AL 87, AL 88, AL 89, AL 90, AL 91, AL 92, AL 93) μονοκονιδιακών απομονώσεων του μύκητα *A. solani* που προέρχονταν από φυσικά μολυσμένα φυτά τομάτας και πατάτας, αντίστοιχα. Μετά την τελευταία μέτρηση της διαμέτρου των αποικιών στο προηγούμενο πείραμα, τα τριβλία χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη της μορφολογίας των αποικιών και πιο συγκεκριμένα του χρώματος της αποικίας, της παρουσίας ή μη συγκεντρικών δακτυλίων και της μορφής του μυκηλίου των αποικιών (έρπον ή εναέριο).

3. Παραγωγή κονιδίων *in vitro*

Μετά την τελευταία μέτρηση της διαμέτρου των αποικιών των απομονώσεων του μύκητα *A. solani* (βλέπε παράγραφο 1), τα τριβλία επώαστηκαν για 7 ημέρες σε θερμοκρασία 21°C και σε συνθήκες εναλλαγής υπεριώδους ακτινοβολίας (NUV-light) με σκότος (12h NUV-light/12h σκότος). Στη συνέχεια από την κάθε απομόνωση κόπηκαν με την βοήθεια φελλοτρυπητή διαμέτρου 1,1cm και κάτω από ασηπτικές συνθήκες τρεις μυκηλιακοί δίσκοι οι οποίοι τοποθετήθηκαν σε αποστειρωμένα μπουκαλάκια McCartney, που περιείχαν 2ml αποστειρωμένου απεσταγμένου νερού στο οποίο είχε προστεθεί ο διαβρεκτικός παράγοντας Tween 80 (0,01%). Τα μπουκαλάκια αναδεύτηκαν μηχανικά για 30 sec με σκοπό την απελευθέρωση των κονιδίων και στα αιωρήματα που προέκυψαν υπολογίστηκε με τη βοήθεια αιματοκυττομέτρου η συγκέντρωση των κονιδίων της κάθε απομόνωσης. Στη συνέχεια έγινε αναγωγή της συγκέντρωσης κονιδίων της κάθε απομόνωσης στη μονάδα επιφανείας του θρεπτικού υλικού (cm³) σύμφωνα με τον παρακάτω τύπο:

$$y = \alpha\beta / \chi\pi r^2 \quad (1)$$

όπου: y = αριθμός κονιδίων/cm² επιφανείας θρεπτικού υλικού

α = συγκέντρωση κονιδίων στο αιώρημα (αριθμός κονιδίων/ml)

β = όγκος αιωρήματος κονιδίων (ml)

χ = αριθμός μυκηλιακών δίσκων

π = 3,14

r = ακτίνα μυκηλιακού δίσκου (cm)

Σε ένα επόμενο στάδιο, για τη συγκριτική μελέτη της δυνατότητας παραγωγής κονιδίων *in vitro* από διάφορες απομονώσεις του μύκητα *A. solani* δοκιμάστηκε εκτός από το θρεπτικό υλικό V-8 άγαρ και το S-medium (Shahin & Shepard, 1979). Η παρασκευή του θρεπτικού υλικού έγινε σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφεται στα Γενικά Υλικά και Μέθοδοι (παράγραφο 2.1.). Η αναβίωση των απομονώσεων του μύκητα (AL 24, AL 25, AL 29, AL 61, AL 62, AL 94, AL 95, AL 96, AL 97, AL 78a, AL 83, AL 85, AL 86, AL 87, AL 88, AL 89, AL 90, AL 91, AL 92, AL 93) από τη συλλογή στην οποία διατηρούνταν (μπουκαλάκια McCartney) έγινε σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφεται στα Γενικά Υλικά και Μέθοδοι (παράγραφο 2.3.). Η κάθε απομόνωση μεταφέρθηκε σε δύο τριβλία με θρεπτικό υλικό V-8 άγαρ και τα τριβλία επώαστηκαν για 4 ημέρες σε θερμοκρασία 21°C και σε συνθήκες εναλλαγής υπεριώδους ακτινοβολίας (NUV-light) με σκότος (12h NUV-light/12h σκότος). Στη συνέχεια από την κάθε απομόνωση κόπηκαν με τη βοήθεια φελλοτρυπητή και κάτω από ασηπτικές συνθήκες μυκηλιακοί δίσκοι διαμέτρου 5mm οι οποίοι τοποθετήθηκαν ανεστραμμένοι (το μυκήλιο σε επαφή με το υλικό) σε τριβλία Petri, που περιείχαν θρεπτικό υλικό V-8 άγαρ (20 ml/τριβλίο) (3 τριβλία ανά απομόνωση). Τα τριβλία σφραγίστηκαν με Parafilm και επώαστηκαν για 7 ημέρες σε θερμοκρασία 21°C και σε συνθήκες εναλλαγής υπεριώδους ακτινοβολίας με σκότος (12h NUV-light/12h σκότος) μέχρι την πλήρη ανάπτυξη των αποικιών. Ακολούθως από τις αποικίες κόπηκαν με τη βοήθεια φελλοτρυπητή και κάτω από ασηπτικές συνθήκες μυκηλιακοί δίσκοι διαμέτρου 1,1 cm οι οποίοι τοποθετήθηκαν σε τριβλία Petri, που περιείχαν θρεπτικό υλικό S-medium (20 ml/τριβλίο). Για κάθε απομόνωση χρησιμοποιήθηκαν τρία τριβλία (επαναλήψεις), ενώ σε κάθε τριβλίο-επανάληψη τοποθετήθηκαν τρεις μυκηλιακοί δίσκοι από κάθε απομόνωση. Στη συνέχεια σε κάθε τριβλίο προστέθηκαν περίπου 2ml αποστειρωμένου, απεσταγμένου νερού ώστε οι μυκηλιακοί δίσκοι να καλυφθούν κατά το ήμισυ του ύψους τους. Κατόπιν τα τριβλία σφραγίστηκαν με

Parafilm και επώαστηκαν για 7 ημέρες σε θερμοκρασία 21°C και σε συνθήκες εναλλαγής υπεριώδους ακτινοβολίας με σκότος (12h NUV-light/12h σκότος). Στη συνέχεια οι μυκηλιακοί δίσκοι της κάθε απομόνωσης μεταφέρθηκαν κάτω από ασηπτικές συνθήκες σε αποστειρωμένα μπουκαλάκια McCartney, που περιείχαν 2ml αποστειρωμένου, απεσταγμένου νερού στο οποίο είχε προστεθεί ο διαβρεκτικός παράγοντας Tween 80 (0,01%). Τα μπουκαλάκια αναδεύτηκαν μηχανικά για 30 sec με σκοπό την απελευθέρωση των κονιδίων και στα αιωρήματα που προέκυψαν υπολογίστηκε με τη βοήθεια αιματοκυττομέτρου η συγκέντρωση των κονιδίων της κάθε απομόνωσης. Στη συνέχεια έγινε αναγωγή της συγκέντρωσης κονιδίων της κάθε απομόνωσης στη μονάδα επιφανείας του θρεπτικού υλικού (cm²) σύμφωνα με τον τύπο (1).

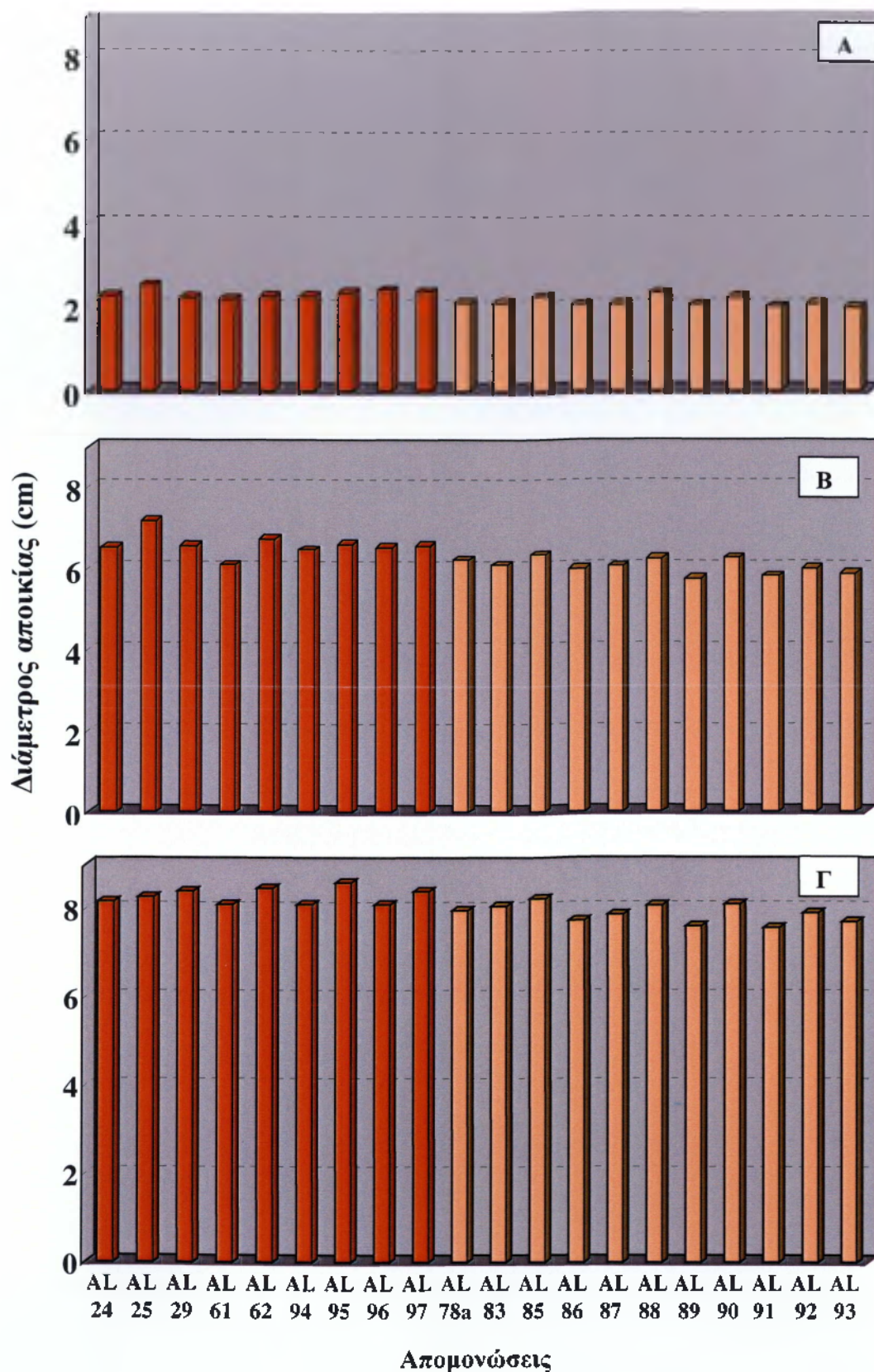
4. Διαστάσεις κονιδίων

Για τη συγκριτική μελέτη των διαστάσεων των κονιδίων στα θρεπτικά υλικά V-8 άγαρ και S-medium, χρησιμοποιήθηκαν τα αιωρήματα των κονιδίων που προέκυψαν από την καλλιέργεια των απομονώσεων του μύκητα *A. solani*. Για κάθε απομόνωση μετρήθηκε: α) το συνολικό μήκος των κονιδίων (κυρίως σώμα και ράμφος) σε μm, β) το μήκος του ράμφους σε μm, και γ) το μεγαλύτερο πλάτος του κυρίως σώματος των κονιδίων σε μm. Επιπλέον, έγιναν παρατηρήσεις όσον αφορά την ύπαρξη μονού ή διπλού ράμφους. Όλες οι μετρήσεις και παρατηρήσεις έγιναν στο μικροσκόπιο (μεγέθυνση x400) και από κάθε απομόνωση μετρήθηκαν 30 κονίδια σε καθένα από τα θρεπτικά υλικά V-8 άγαρ και S-medium.

Αποτελέσματα

1. Γραμμική αύξηση μυκηλίου

Τα αποτελέσματα του πειράματος έδειξαν ότι η γραμμική αύξηση του μυκηλίου των απομονώσεων του μύκητα *A. solani* εξαρτάται από την προέλευση των απομονώσεων (Εικ. 11). Πιο συγκεκριμένα, η γραμμική αύξηση του μυκηλίου όλων των απομονώσεων από φυτά τομάτας (AL 24, AL 25, AL 29, AL 61, AL 62, AL 94,



Εικόνα 11. Γραμμική αύξηση μυκηλίου 20 απομονώσεων του μύκητα *A. solani* από φυτά τομάτας (■) και πατάτας (□) σε θρεπτικό υλικό V-8 άγαρ μετά από 2(A), 4(B) και 7(Γ) ημέρες επώασης των τριβλίων σε θερμοκρασία 21°C στο σκοτάδι. SED_s (40d.f.): (A)=0,24, (B)=0,67, (Γ)=0,54.

AL 95, AL 96, AL 97) ήταν στατιστικά σημαντικά ($P < 0,05$) μεγαλύτερη σε σχέση με εκείνη των απομονώσεων του μύκητα από φυτά πατάτας (AL 78a, AL 83, AL 85, AL 86, AL 87, AL 88, AL 89, AL 90, AL 91, AL 92, AL 93) στο θρεπτικό υλικό V-8 άγαρ, σε όλες τις μετρήσεις που έγιναν (Εικ.11). Πιο συγκεκριμένα οι διάμετροι των αποικιών των απομονώσεων από φυτά τομάτας 2, 4 και 7 ημέρες μετά τον εμβολιασμό των τριβλίων κυμαίνονταν από 2,1 - 2,5cm, 6,1 - 7,1cm και 8,1 - 8,6cm αντίστοιχα ενώ οι αντίστοιχες των απομονώσεων από φυτά πατάτας κυμαίνονταν από 1,9 - 2,3cm, 5,7 - 6,3cm και 7,5 - 8,2cm (Εικ.11). Επιπλέον, σύμφωνα με τα αποτελέσματα του πειράματος διαπιστώθηκαν διαφορές ως προς τη γραμμική αύξηση του μυκηλίου των αποικιών των απομονώσεων του μύκητα που προέρχονταν από τον ίδιο ξενιστή (απομονώσεις από φυτά τομάτας και απομονώσεις από φυτά πατάτας). Πιο συγκεκριμένα 7 ημέρες μετά τον εμβολιασμό των τριβλίων η διάμετρος της αποικίας της απομόνωσης AL 95 από φυτά τομάτας διέφερε στατιστικά σημαντικά ($P < 0,05$) από τις υπόλοιπες απομονώσεις του μύκητα από φυτά τομάτας (AL 96, AL 24, AL 61, AL 94). Παρόμοια, η διάμετρος της αποικίας της απομόνωσης AL 85 του μύκητα από φυτά πατάτας διέφερε στατιστικά σημαντικά ($P < 0,05$) από τις υπόλοιπες απομονώσεις του μύκητα από φυτά πατάτας (AL 83, AL 86, AL 89, AL 91, AL 93) (Εικ.11).

2. Μορφολογία αποικιών

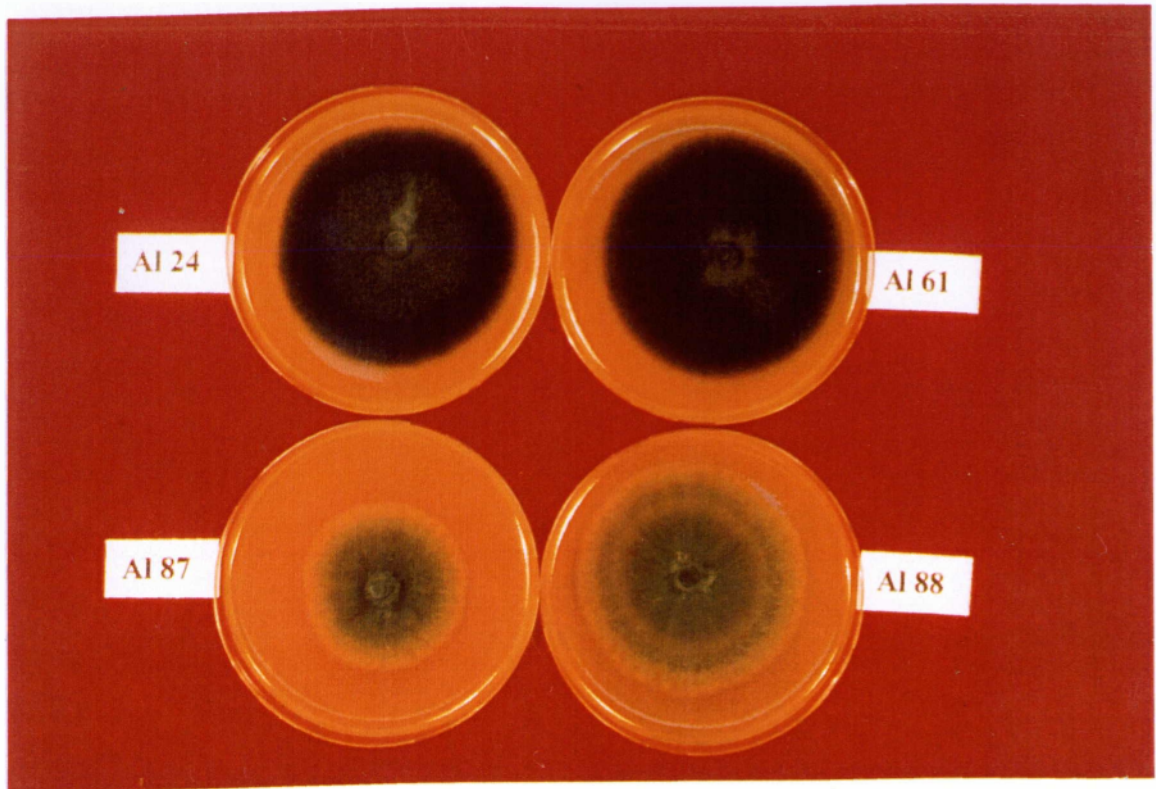
Τα αποτελέσματα του πειράματος έδειξαν ότι και η μορφολογία των αποικιών του μύκητα *A. solani* εξαρτάται από την προέλευση των απομονώσεων (από φυτά τομάτας ή φυτά πατάτας) (Πιν. 3). Πιο συγκεκριμένα, διαπιστώθηκε ότι το χρώμα των αποικιών των απομονώσεων που προέρχονταν από φυτά τομάτας (AL 24, AL 25, AL 29, AL 61, AL 62, AL 94, AL 95, AL 96, AL 97) είχε μια διαβάθμιση από γκρίζο σκούρο έως μαύρο (Εικ. 12). Επιπλέον, διαπιστώθηκε ότι όλες οι απομονώσεις σχημάτιζαν συγκεντρικούς δακτυλίους (Πιν. 3). Τέλος, όσον αφορά τη μορφή του μυκηλίου γενικά όλες οι παραπάνω απομονώσεις σχημάτισαν σε θρεπτικό υλικό V-8 άγαρ έρπον μυκήλιο (Εικ.12). Λίγο εναέριο μυκήλιο εμφανίστηκε μόνο στις αποικίες των απομονώσεων AL 24, AL 25, AL 61 και AL 95 που όμως περιοριζόταν στο κέντρο των αποικιών. Επιπλέον, τα αποτελέσματα του πειράματος, έδειξαν ότι οι αποικίες των απομονώσεων του μύκητα που προέρχονταν από φυτά πατάτας (AL 78a, AL 83, AL 85, AL 86, AL 87, AL 88, AL 89, AL 90, AL 91, AL 92, AL 93) είχαν

Πίνακας 3: Μορφολογικοί χαρακτήρες αποικιών απομονώσεων του μύκητα *A. solani* από φυτά τομάτας και πατάτας σε θρεπτικό υλικό V-8 άγαρ.

Απομόνωση	Χρώμα αποικίας	Συγκεντρικοί δακτύλιοι*	Έρπον μυκήλιο*
Τομάτα			
AL 24	Γκρίζο έως μαύρο	+	+++
AL 25	Γκρίζο σκούρο	+	+++
AL 29	Γκρίζο έως μαύρο	+	+
AL 61	Γκρίζο σκούρο έως μαύρο	+	+++
AL 62	Γκρίζο σκούρο έως μαύρο	+	+
AL 94	Γκρίζο σκούρο	+	+
AL 95	Γκρίζο σκούρο έως μαύρο	+	+++
AL 96	Γκρίζο σκούρο έως μαύρο	+	+
AL 97	Γκρίζο σκούρο έως μαύρο	+	+
Πατάτα			
AL 78a	Γκρίζο ανοιχτό	+	-
AL 83	Υπόλευκο	-	-
AL 85	Γκρίζο ανοιχτό	-	-
AL 86	Υπόλευκο	+	-
AL 87	Γκρίζο ανοιχτό	-	-
AL 88	Υπόλευκο	-	-
AL 89	Γκρίζο ανοιχτό	-	-
AL 90	Γκρίζο ανοιχτό	-	-
AL 91	Υπόλευκο	+	-
AL 92	Υπόλευκο	+	-
AL 93	Υπόλευκο	+	-

* (+) παρουσία, (-) απουσία

** Εμφάνιση εναέριου μυκηλίου μόνο στο κέντρο της αποικίας.

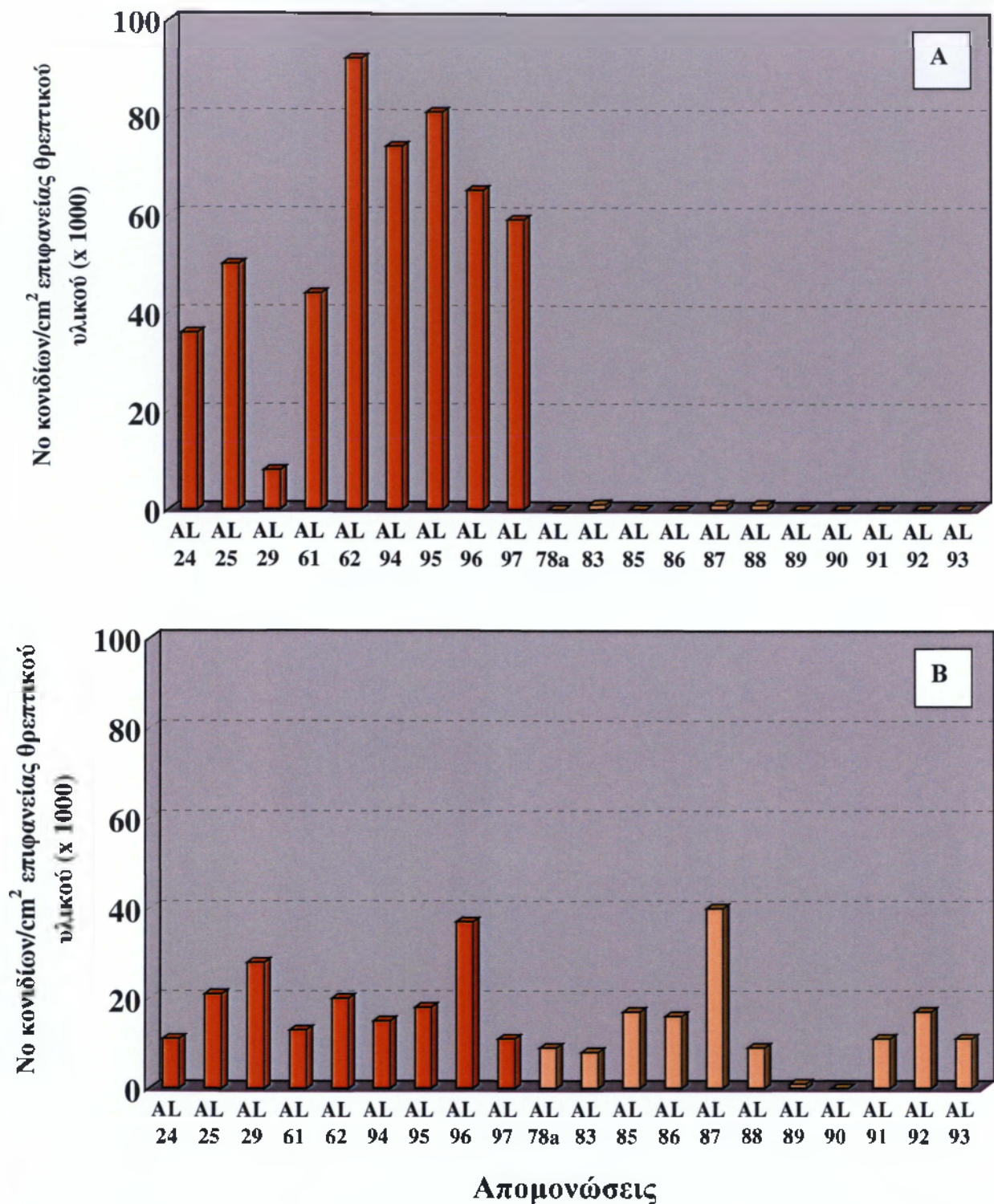


Εικόνα 12. Μορφολογία αποικιών απομονώσεων του μύκητα *A. solani* από φυτά τομάτας (πάνω σειρά) και πατάτας (κάτω σειρά) σε θρεπτικό υλικό V-8 άγαρ μετά από επώαση 7 ημερών σε θερμοκρασία 21°C στο σκοτάδι.

χρώμα υπόλευκο έως γκρίζο ανοιχτό ανάλογα με την απομόνωση (Πιν. 3). Πέντε (AL 78a, AL 86, AL 91, AL 92, AL 93) από τις 11 απομονώσεις του μύκητα από φυτά πατάτας που μελετήθηκαν εμφάνισαν συγκεντρικούς δακτυλίους στις αποικίες τους, ενώ όλες οι απομονώσεις σχημάτισαν αποικίες με εναέριο μυκήλιο (Πιν. 3).

3. Παραγωγή κονιδίων *in vitro*

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων έδειξαν ότι τόσο η *in vitro* παραγωγή κονιδίων των απομονώσεων του μύκητα *A. solani* όσο και ο αριθμός των παραγομένων κονιδίων εξαρτάται από την προέλευση των απομονώσεων καθώς και από το θρεπτικό υλικό ανάπτυξης (Εικ. 13). Πιο συγκεκριμένα, όλες οι απομονώσεις του μύκητα από φυτά τομάτας (AL 24, AL 25, AL 29, AL 61, AL 62, AL 94, AL 95, AL 96, AL 97) παρήγαγαν κονίδια στο θρεπτικό υλικό V-8 άγαρ, ενώ οι περισσότερες απομονώσεις του μύκητα από φυτά πατάτας (AL 78a, AL 85, AL 86, AL 89, AL 90, AL 91, AL 92, AL 93) δεν παρήγαγαν κονίδια στο παραπάνω υλικό, με μόνη εξαίρεση τις απομονώσεις AL 83, AL 87 και AL 88, οι οποίες σχημάτισαν μικρό αριθμό κονιδίων στο συγκεκριμένο υλικό (Εικ.13). Ο αριθμός των παραγομένων κονιδίων από τις απομονώσεις του μύκητα από φυτά τομάτας ανά cm^2 επιφάνειας θρεπτικού υλικού V-8 άγαρ διέφερε στατιστικά σημαντικά ($P < 0,05$) μεταξύ των απομονώσεων και κυμαινόταν από 8.300 έως 92.200 κονίδια/ cm^2 ενώ ο αντίστοιχος των απομονώσεων AL 83, AL 87 και AL 88 από φυτά πατάτας ήταν 1.200 κονίδια/ cm^2 (Εικ.13). Στο θρεπτικό υλικό S-medium όλες σχεδόν οι απομονώσεις του μύκητα, ανεξάρτητα από τον ξενιστή από τον οποίο προέρχονταν (τομάτα ή πατάτα), σχημάτισαν κονίδια με μόνη εξαίρεση την απομόνωση AL 90 του μύκητα από φυτά πατάτας που δεν παρήγαγε κονίδια στο συγκεκριμένο υλικό (Εικ.13). Επιπλέον, τα αποτελέσματα των πειραμάτων έδειξαν ότι στο θρεπτικό υλικό S-medium η παραγωγή κονιδίων των απομονώσεων του μύκητα από φυτά τομάτας ήταν στατιστικά σημαντικά ($P < 0,05$) μεγαλύτερη από εκείνη των απομονώσεων από φυτά πατάτας, με μόνη εξαίρεση την απομόνωση AL 87 από φυτά πατάτας η οποία παρουσίασε τη μεγαλύτερη παραγωγή κονιδίων από όλες τις απομονώσεις του μύκητα (Εικ.13). Πιο συγκεκριμένα ο αριθμός των κονιδίων που παράχθηκε από τις απομονώσεις του μύκητα από φυτά τομάτας ανά cm^2 επιφάνειας θρεπτικού υλικού S-medium κυμαινόταν από 11.800 - 37.900



Εικόνα 13. Αριθμός παραγομένων κωνιδίων ανά cm² επιφάνειας σε καθένα από τα θρεπτικά υλικά V-8 άγαρ (A) και S-medium (B) 20 απομονώσεων του μύκητα *A. solani* από φυτά τομάτας (■) και πατάτας (□) μετά από 7 ημέρες επώασης των τριβλίων (*in vitro*) σε θερμοκρασία 21°C και σε συνθήκες εναλλαγής υπεριώδους ακτινοβολίας με σκότος (12h NUV-light/12h σκότος). SED_S (40d.f.): (A)=5.569,4, (B)=6.343,4.

κονίδια/cm², ενώ ο αντίστοιχος των απομονώσεων από φυτά πατάτας, κυμαινόταν από 1.200 -17.800 κονίδια/cm². Ο αριθμός των κονιδίων της απομόνωσης AL 87 που σχηματίστηκαν στο θρεπτικό υλικό S-medium ήταν 40.200 κονίδια/cm² (Εικ.13). Επιπλέον, τα αποτελέσματα των πειραμάτων έδειξαν ότι στο θρεπτικό υλικό V-8 άγαρ ο αριθμός των παραγομένων κονιδίων από τις απομονώσεις του μύκητα από φυτά τομάτας ήταν στατιστικά σημαντικά (P<0,05) μεγαλύτερος από εκείνον των ίδιων απομονώσεων στο θρεπτικό υλικό S-medium (Εικ.13). Πιο συγκεκριμένα ο αριθμός των κονιδίων που παράχθηκε από τις απομονώσεις του μύκητα από φυτά τομάτας (με εξαίρεση την απομόνωση AL 29) ανά cm² επιφανείας θρεπτικού υλικού V-8 άγαρ κυμαινόταν από 36.000-96.000 κονίδια/cm² ανάλογα με την απομόνωση ενώ στο θρεπτικό υλικό S-medium κυμαινόταν από 11.000-37.000 κονίδια/cm² (Εικ.13). Αντίθετα, όσον αφορά τον αριθμό των παραγομένων κονιδίων από τις απομονώσεις του μύκητα από φυτά πατάτας στο θρεπτικό υλικό V-8 άγαρ, τα αποτελέσματα των πειραμάτων έδειξαν ότι ήταν στατιστικά σημαντικά (P<0,05) μικρότερος από τον αντίστοιχο των ίδιων απομονώσεων στο θρεπτικό υλικό S-medium. Πιο συγκεκριμένα από τις 11 απομονώσεις του μύκητα από φυτά πατάτας ο αριθμός των κονιδίων που παράχθηκε ανά cm² επιφανείας θρεπτικού υλικού V-8 άγαρ κυμαινόταν από 0-1.200 κονίδια/cm² ανάλογα με την απομόνωση ενώ στο θρεπτικό υλικό S-medium κυμαινόταν από 0-40.000 κονίδια/cm² (Εικ.13).

4. Διαστάσεις κονιδίων

Τα αποτελέσματα του πειράματος έδειξαν ότι οι διαστάσεις των κονιδίων 20 απομονώσεων του μύκητα *A. solani* που ελέγχθηκαν στην παρούσα μελέτη εξαρτώνται από την προέλευσή τους (φυτά τομάτας ή πατάτας) και από το θρεπτικό υλικό ανάπτυξης (Πιν. 4). Πιο συγκεκριμένα διαπιστώθηκε ότι σε θρεπτικό υλικό V-8 άγαρ οι διαστάσεις κονιδίων των απομονώσεων από φυτά τομάτας ήταν μεγαλύτερες από εκείνες των απομονώσεων από φυτά πατάτας (Πιν. 4). Επιπλέον, διαπιστώθηκε ότι στο παραπάνω θρεπτικό υλικό το συνολικό μήκος των κονιδίων (κυρίως σώμα και ράμφος) των απομονώσεων του μύκητα από φυτά τομάτας (AL 24, AL 25, AL 29, AL 61, AL 62, AL 94, AL 95, AL 96, AL 97) κυμαινόταν από 179-255,2 μm (Πιν. 4). Το μήκος του ράμφους των κονιδίων των παραπάνω απομονώσεων κυμαινόταν από 100,6-150,8μm ενώ το μέγιστο πλάτος του σώματος των κονιδίων κυμαινόταν από 12,5-14,6μm.

Πίνακας 4: Διαστάσεις κονιδίων 20 απομονώσεων του μύκητα *A. solani* από φυτά τομάτας (AL 24, AL 25, AL 29, AL 61, AL 62, AL 94, AL 95, AL 96, AL 97) και πατάτας (AL 78a, AL 83, AL 85, AL 86, AL 87, AL 88, AL 89, AL 90, AL 91, AL 92, AL 93) σε θρεπτικά υλικά V-8 άγαρ και S-medium.

Απομόνωση	Συνολικό μήκος κονιδίου (μm)*			Μήκος ράμφους (μm)*			Μέγιστο πλάτος κονιδίου (μm)*		
	min	max	M.O.	min	max	M.O.	min	max	M.O.
V-8 άγαρ									
AL 24	130	312,5	216,3	55	200	127	10	17,5	12,5
AL 25	125	317,5	215,4	62,5	200	126,5	10	17,5	13,8
AL 29	87,5	300	179	2,5	200	100,6	10	17,5	13,5
AL 61	125	297,5	202,4	37,5	175	122	10	17,5	13,3
AL 62	162,5	312,5	241	87,5	200	151	10	17,5	13,8
AL 94	187,5	317,5	255,2	7,5	200	150,8	10	20	14,6
AL 95	157,5	325	222,5	50	225	135,9	10	17,5	13,5
AL 96	165	295	228,8	80	215	136,3	10	20	15
AL 97	152,5	275	211	65	175	122,2	10	17,5	13,1
AL 78a	Απουσία κονιδίων								
AL 83									
AL 85									
AL 86									
AL 87	12,5	107,5	66,6	25	62,5	48,2	10	17,5	13
AL 88	65	185	104,6	30	125	52	10	17,5	12,1
AL 89	Απουσία κονιδίων								
AL 90									
AL 91									
AL 92									
AL 93									
S- medium									
AL 24	175	365	259	100	250	168,8	12,5	25	15,3
AL 25	132,5	300	199	62,5	200	121	12,5	25	15,7
AL 29	190	332,5	254,5	100	217,5	157,2	15	22,5	19,2
AL 61	152,5	367,5	223,6	87,5	237,5	143,5	12,5	22,5	17,2
AL 62	155	392,5	243,1	77,5	250	156,1	12,5	25	16,7
AL 94	205	357,5	263,6	112,5	225	166,5	15	22,5	17,2
AL 95	180	345	266,6	105	230	170,4	12,5	22,5	17,8
AL 96	177,5	345	252,6	90	225	155,8	12,5	25	17,8
AL 97	145	317,5	241	87,5	217,5	153,1	12,5	20	17,6
AL 78a	87,5	237,5	163,4	25	130	69,8	12,5	25	18,1
AL 83	82,5	225	127	35	115	58,3	12,5	22,5	16,5
AL 85	130	250	194	52,5	125	91,1	15	22,5	19
AL 86	100	212,5	149,8	37,5	125	63,5	15	22,5	18,8
AL 87	107,5	217,5	156,4	32	112,5	69,3	15	17,5	16
AL 88	67,5	212,5	121,2	25	125	52,8	10	20	17
AL 89	77,5	237,5	155	30	150	70,9	12,5	22,5	17
AL 91	120	250	184	50	150	98,6	12,5	22,5	17,8
AL 90	Απουσία κονιδίων								
AL 92	125	195	157,4	50	112,5	76,7	12,5	20	16,9
AL 93	80	200	132	30	100	62,6	12,5	20	17

*Οι αριθμοί αντιστοιχούν στο μέσο όρο 30 κονιδίων ανά απομόνωση.

Σε ότι αφορά τις απομονώσεις του μύκητα από φυτά πατάτας (AL 78a, AL 83, AL 85, AL 86, AL 87, AL 88, AL 89, AL 90, AL 91, AL 92, AL 93) διαπιστώθηκε ότι μόνο δύο απομονώσεις (AL 87, AL 88) σχημάτισαν κονίδια στο θρεπτικό υλικό V-8 άγαρ. Τα κονίδια αυτά είχαν συνολικό μήκος σώματος που κυμαινόταν από 12,5-185μm, μήκος ράμφους 25-125μm και μέγιστο πλάτος σώματος 12,1-13μm (Πιν. 4). Επίσης τα αποτελέσματα του του πειράματος έδειξαν ότι στο θρεπτικό υλικό S-medium οι διαστάσεις των κονιδίων των απομονώσεων του μύκητα από φυτά τομάτας ήταν μεγαλύτερες σε σχέση με τις απομονώσεις του ίδιου μύκητα από φυτά πατάτας (Πιν. 4). Πιο συγκεκριμένα, το συνολικό μήκος των κονιδίων (κυρίως σώμα και ράμφος) των απομονώσεων του μύκητα από φυτά τομάτας κυμαινόταν από 199-266,6μm, το μήκος του ράμφους κυμαινόταν από 121-170,4μm, ενώ το μέγιστο πλάτος του σώματος των κονιδίων κυμαινόταν από 15,3-19,2μm. Σε ότι αφορά τις απομονώσεις του μύκητα από φυτά πατάτας το συνολικό μήκος των κονιδίων κυμαινόταν από 121,2-194μm, το μήκος του ράμφους κυμαινόταν από 52,8-98,6μm, ενώ το μέγιστο πλάτος κονιδίου κυμαινόταν από 16-19μm (Πιν. 4).

Τα αποτελέσματα του πειράματος έδειξαν επίσης ότι το ποσοστό των κονιδίων των απομονώσεων του μύκητα *A. solani* που εμφάνιζαν μονό ή διπλό ράμφος εξαρτιόταν επίσης από την απομόνωση και το θρεπτικό υλικό ανάπτυξης (Πιν.5). Ανεξάρτητα όμως από την προέλευση της απομόνωσης (φυτά τομάτας ή πατάτας) ή το θρεπτικό υλικό ανάπτυξης, το μεγαλύτερο ποσοστό των κονιδίων του μύκητα που εξετάστηκε εμφάνισε μονό ράμφος (Πιν.5). Πιο συγκεκριμένα, στο θρεπτικό υλικό V-8 άγαρ 40-77% και 23-60% των κονιδίων των απομονώσεων του μύκητα από φυτά τομάτας είχαν μονό και διπλό ράμφος, αντίστοιχα (Πιν.5). Σε ότι αφορά τις απομονώσεις του μύκητα από φυτά πατάτας (AL 87, AL 88) στο θρεπτικό υλικό V-8 άγαρ διαπιστώθηκε ότι το 100% των κονιδίων είχαν μονό ράμφος. Όταν οι απομονώσεις του μύκητα, ανεξάρτητα από την προέλευση τους, καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό S-medium, διαπιστώθηκε ότι το 100% των κονιδίων τους είχαν μονό ράμφος (Πιν.5).

Πίνακας 5: Ποσοστό (%) κονιδίων με μονό και διπλό ράμφος, 20 απομονώσεων του μύκητα *A. solani* από φυτά τομάτας (AL 24, AL 25, AL 29, AL 61, AL 62, AL 94, AL 95, AL 96, AL 97) και πατάτας (AL 78a, AL 83, AL 85, AL 86, AL 87, AL 88, AL 89, AL 90, AL 91, AL 92, AL 93) σε θρεπτικά υλικά V-8 άγαρ και S-medium.

Απομόνωση	Ποσοστό κονιδίων (%)*	
	Μονό ράμφος	Διπλό ράμφος
V-8 άγαρ		
AL 24	63	37
AL 25	53	47
AL 29	77	23
AL 61	70	30
AL 62	40	60
AL 94	63	37
AL 95	60	40
AL 96	63	37
AL 97	57	43
AL 78a	Απουσία κονιδίων	
AL 83		
AL 85		
AL 86		
AL 87	100	0
AL 88	100	0
AL 89	Απουσία κονιδίων	
AL 90		
AL 91		
AL 92		
AL 93		
S- medium		
AL 24	100	0
AL 25	100	0
AL 29	100	0
AL 61	100	0
AL 62	100	0
AL 94	100	0
AL 95	100	0
AL 96	100	0
AL 97	100	0
AL78a	100	0
AL 83	100	0
AL 85	100	0
AL 86	100	0
AL 87	100	0
AL 88	100	0
AL 89	100	0
AL 90	Απουσία κονιδίων	
AL 91	100	0
AL 92	100	0
AL 93	100	0

*Οι αριθμοί βασίζονται σε παρατηρήσεις 30 κονιδίων ανά απομόνωση.

ΠΕΙΡΑΜΑ ΔΕΥΤΕΡΟ : Διαφοροποίηση απομονώσεων του μύκητα *A. solani* με τη χρήση μεθόδων μοριακής βιολογίας.

Σκοπός

Σκοπός των πειραμάτων ήταν η διαφοροποίηση απομονώσεων του μύκητα *A. solani* που προέρχονταν από φυτά τομάτας από εκείνες από φυτά πατάτας με τη χρήση της τεχνικής RAPD-PCR.

Υλικά

1. Παραγωγή μυκηλίου

Για την παραγωγή μυκηλίου από τις παραπάνω απομονώσεις χρησιμοποιήθηκε το υγρό θρεπτικό υπόστρωμα SSN.

1.1. Υγρό θρεπτικό υπόστρωμα SSN

Sucrose (Merck).....	15g
KH ₂ PO ₄ (Merck).....	1g
MgSO ₄ . 7H ₂ O (Merck).....	0,5g
NaNO ₃ (Merck).....	2g
KCl (Merck).....	0,5g
Απιονισμένο νερό.....	1lt

Στο διάλυμα προστίθεται 1ml από το μίγμα των παρακάτω ιχνοστοιχείων (Nutrient element solution)

FeSO ₄ . 7H ₂ O (Merck).....	240mg
CuSO ₄ . 5H ₂ O (Merck).....	40mg
ZnSO ₄ . 7H ₂ O (Merck).....	44mg
MnSO ₄ . 4H ₂ O (Merck).....	41mg

Na ₂ MoO ₄ · 4H ₂ O (Merck)	51mg
Απιονισμένο νερό	100ml

2. Απομόνωση του DNA

Για την απομόνωση του DNA από το μυκήλιο των απομονώσεων του μύκητα χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω υλικά:

2.1. Ρυθμιστικό διάλυμα εξαγωγής DNA (TES Buffer)

Tris – HCl (pH =8.0) (Serva).....	100mM
EDTA (Merck).....	10 mM
Sodium dodecyl sulfate (SDS) (Genaxis Biotechnology)....	2%
pH = 8.0	

2.2. Ρυθμιστικό διάλυμα TE

Tris – HCl (pH =8.0) (Serva).....	10mM
EDTA (Merck).....	1mM
pH = 8.0	

Επιπλέον, για την απομόνωση του DNA χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω υλικά στις ποσότητες που αναφέρονται αναλυτικά στην περιγραφή των μεθόδων του παρόντος κεφαλαίου.

2.2. NaCl 5M (Merck)

2.3. CTAB (cetyltrimethylammoniumbromide) (Serva)

2.5. SEVAG [Chloroform (Vioryl S.A.) : Isoamylalcohol (Merck)]

2.6. NH₄Ac (Merck)

2.7. Isopropanol (Vioryl S.A.)

2.8. Αλκοόλη 100% (Panreac quimico,S.A.)

3. Μέθοδος RAPD-PCR

Για την εφαρμογή της μεθόδου RAPD-PCR χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω υλικά:

3.1. Εκκινητές (Primers)

OPR-12: 5'- ACA GGT GCG T - 3' (Kit R, Operon Technologies Inc. California, USA)

OPA-13: 5'- CAG CAC CCA C - 3' (Kit A, Operon Technologies Inc. California, USA)

OPA-3: 5'- AGT CAG CCA T - 3' (Kit A, Operon Technologies Inc. California, USA)

OPA-4: 5'- AAT CGG GCT G - 3' (Kit A, Operon Technologies Inc. California, USA)

P284: 5'- CAG GCG CAC A - 3' (Pennsylvania State University, USA)

P285: 5'- GGG CGC CTA G - 3' (Pennsylvania State University, USA)

3.2. Μίγμα αντίδρασης της PCR

MgCl ₂ 2,5mM (MBI Fermentas)	5μl
dNTP _s (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) (25μM το καθένα) (MBI Fermentas).....	0,05μl
Taq DNA Polymerase 5U/μl (MBI Fermentas).....	0,2μl
10x PCR Buffer	5μl
Εκκινητές (10pmol ο καθένας).....	0,5μl
DNA απομόνωσης	1μl
Απιονισμένο νερό	38,25μl

4. Ηλεκτροφόρηση

Για την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR σε πήγμα αγαρόζης χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω υλικά:

4.1. Ρυθμιστικό διάλυμα 5x TBE

Tris – HCl (Serva)	54g
Boric acid (Merck).....	27,5g
EDTA (pH =8.0) (Merck).....	20ml
Απιονισμένο νερό	1lt

4.2. Πήγμα αγαρόζης

Αγαρόζη (Conda).....	1,6g
1x TBE (Buffer).....	80ml

4.3. DNA Ladder 100bp (MBI Fermentas)

Gene Ruler	1μl
6x Loading Dye Solution (Χρωστική).....	1μl
Απιονισμένο νερό	4μl

Μέθοδοι

1. Απομονώσεις του μύκητα

Για τη διαφοροποίηση των απομονώσεων του μύκητα *A. solani* που προέρχονταν από φυτά τομάτας από εκείνες από φυτά πατάτας χρησιμοποιήθηκαν οι μονοκονιδιακές απομονώσεις AL 24, AL 29 από φυτά τομάτας και η AL 85 από φυτά πατάτας. Η αναβίωση των καλλιεργειών των παραπάνω απομονώσεων από τη συλλογή στην οποία διατηρούνταν (μπουκαλάκια McCartney) έγινε σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφεται στα Γενικά Υλικά και Μέθοδοι (παράγραφο 2.3.).

2. Παραγωγή μυκηλίου

Για την παραγωγή μυκηλίου από τις παραπάνω απομονώσεις του μύκητα με σκοπό την απομόνωση του DNA ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία: με τη βοήθεια φελλοτρυπητή κόπηκαν από την περιφέρεια μιας αποικίας της κάθε απομόνωσης του μύκητα *A. solani* 4 μυκηλιακοί δίσκοι διαμέτρου 1cm ο καθένας οι οποίοι τοποθετήθηκαν σε κωνική φιάλη Erlenmeyer όγκου 250ml που περιείχε 50ml υγρό θρεπτικό διάλυμα SSN. Στη συνέχεια οι κωνικές φιάλες τοποθετήθηκαν σε ανακινητή (shaker) σε θερμοκρασία 21°C μέχρι την παραγωγή μυκηλίου (10 περίπου ημέρες). Ακολούθησε διήθηση του περιεχομένου των φιαλών (υγρή καλλιέργεια του μύκητα) και το αναπτυσσόμενο μυκήλιο εκπλύθηκε τρεις φορές με απεσταγμένο, αποστειρωμένο νερό. Στη συνέχεια ποσότητα 2g νωπού μυκηλίου από την κάθε

απομόνωση τοποθετήθηκε σε υγρό άζωτο με σκοπό την ξήρανσή του (λυοφιλίωση). Από το ξηρό μυκήλιο της κάθε απομόνωσης ζυγίστηκε ποσότητα 60mg, η οποία στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση του DNA. Ακολούθησε λειοτριβήση της ποσότητας των 60mg ξηρού μυκηλίου παρουσία υγρού αζώτου σε γουδιά πορσελάνης (Möller *et al.*, 1992). Στη συνέχεια το λειοτριβημένο μυκήλιο μεταφέρθηκε σε νέους αποστειρωμένους σωλήνες Eppendorf όγκου 1,5ml οι οποίοι τοποθετήθηκαν σε θερμοκρασία -18 °C για περαιτέρω χρήση.

3. Απομόνωση DNA

Για την απομόνωση του DNA από τις απομονώσεις του μύκητα *A. solani* ακολουθήθηκε η μέθοδος των Möller *et al.* (1992).

1. Σε κάθε σωλήνα Eppendorf που περιείχε το αλεσμένο μυκήλιο του μύκητα προστέθηκαν 500μl ρυθμιστικού διαλύματος TES και ακολούθησε επώαση σε θερμοκρασία 60°C για 1h.
2. Στη συνέχεια σε κάθε σωλήνα προστέθηκαν 140 μl NaCl 5M και 65 μl CTAB 10% (cetyltrimethylammoniumbromide) και ακολούθησε επώαση για 10min σε θερμοκρασία 65°C.
3. Ακολούθως σε κάθε σωλήνα προστέθηκαν 700μl SEVAG (chloroform: isoamylalcohol, 24:1 v/v), οι σωλήνες επώαστηκαν σε θερμοκρασία 0°C για 30min και στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκαν σε 10.000 στροφές/min για 10 min και σε θερμοκρασία 4°C.
4. Στη συνέχεια το υπερκείμενο υγρό μεταφέρθηκε σε νέους αποστειρωμένους σωλήνες Eppendorf, προστέθηκαν 225 μl 5M NH₄Ac, ακολούθησε ψύξη των σωλήνων σε θερμοκρασία 0°C για 30min και φυγοκέντρωση τους σε 10.000 στροφές/min για 10 min και σε θερμοκρασία 4°C.
5. Το υπερκείμενο υγρό μεταφέρθηκε σε νέους αποστειρωμένους σωλήνες Eppendorf, προστέθηκαν 50 μl isopropanol με σκοπό την κατακρήμνιση του DNA και ακολούθησε φυγοκέντρωση σε 10.000 στροφές/min για 5min σε θερμοκρασία 4°C.
6. Στη συνέχεια απομακρύνθηκε όλη η υγρή φάση μέσα από τους σωλήνες Eppendorf έτσι ώστε να παραμείνει μόνο το ίζημα (DNA). Ακολούθως το ίζημα εκπλύθηκε 2 φορές με αιθυλική αλκοόλη 70%, ακολούθησε στέγνωμα για την απομάκρυνση της αλκοόλης και προσθήκη 50μl ρυθμιστικού διαλύματος TE για την διατήρηση του DNA (Möller *et al.*, 1992).

4. Μέθοδος RAPD-PCR

Για την εφαρμογή της μεθόδου RAPD-PCR χρησιμοποιήθηκαν αποστειρωμένοι πλαστικοί μικροσωλήνες PCR, όγκου 200μl ο καθένας. Σε κάθε μικροσωλήνα τοποθετήθηκαν 50μl από το μίγμα αντίδρασης της PCR. Στη συνέχεια οι μικροσωλήνες τοποθετήθηκαν σε θερμικό κυκλοποιητή (Genius, Techne, Cambridge, UK) και υποβλήθηκαν στην παρακάτω αλληλουχία θερμοκρασιών:

94 °C για 1 min

34 °C για 1,5 min (45 κύκλοι)

72 °C για 5 min

5. Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR

Η οριζόντια ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR έγινε σε πήγμα αγαρόζης με τη βοήθεια συσκευής οριζόντιας ηλεκτροφόρησης (Gibco BRL, Life Technologies, USA) (Εικ.14). Το πήγμα αγαρόζης ήταν διαστάσεων 11x 14cm με 14 θέσεις υποδοχής των προϊόντων της PCR (αποτυπώματα κτένας) (Εικ.15). Σε κάθε θέση τοποθετήθηκαν με τη βοήθεια μηχανικής πιπέτας 15μl προϊόντος της PCR και 3μl χρωστικής (6x Loading Dye Solution). Το πήγμα αγαρόζης καλύφθηκε με ρυθμιστικό διάλυμα 1x TBE, ενώ η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης έγινε σε ηλεκτρική τάση 90Volt και διήρκεσε περίπου 90min.

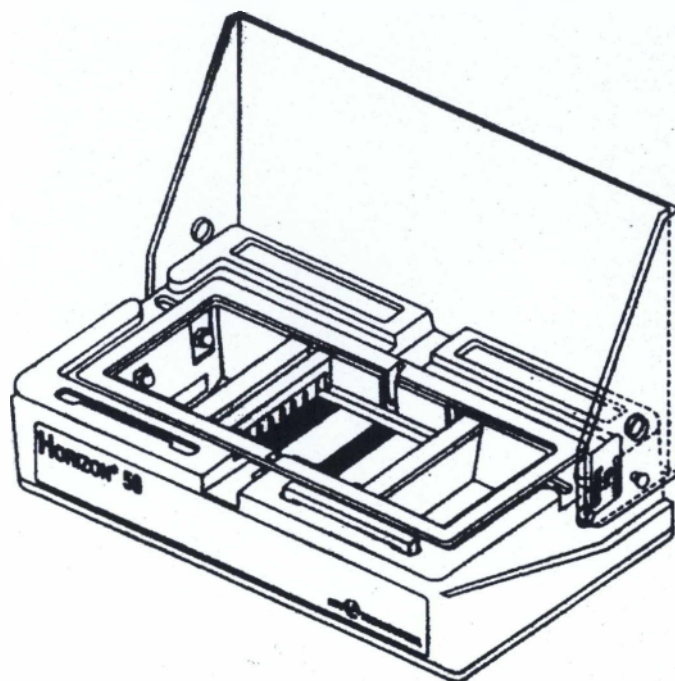
Αποτελέσματα

Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης, το πήγμα αγαρόζης βάφτηκε με εμβάπτισή του σε διάλυμα βρωμιούχου αιθυδίου (150μg/300ml νερού) για περίπου 30min. Στη συνέχεια τοποθετήθηκε σε συσκευή UV φωτισμού (Darkroom with camera support for table, V. Lourmat, Marme La Vallee, France) και φωτογραφήθηκε (Εικ. 16).

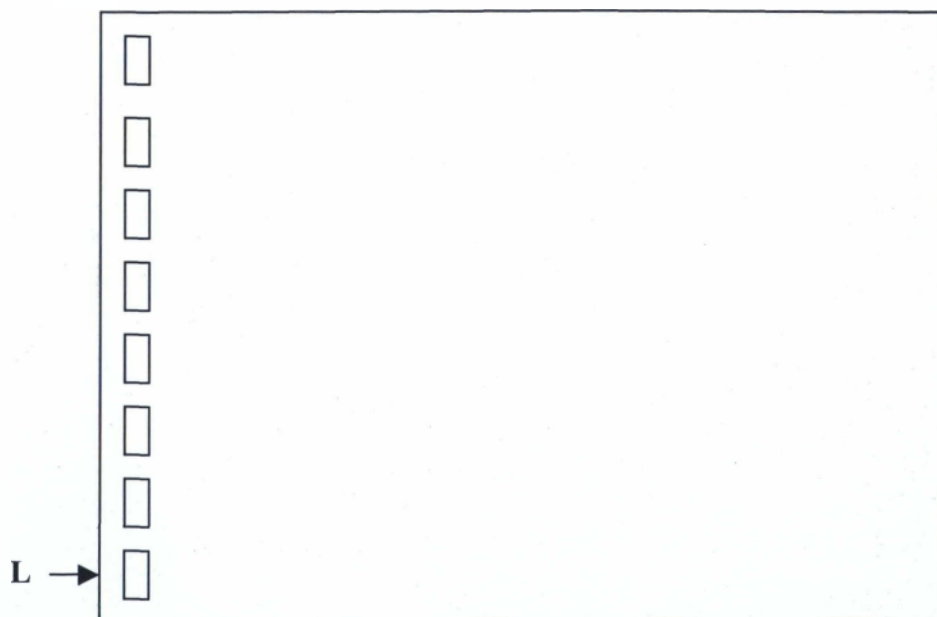
Μετά από δοκιμή 16 εκκινητών επιλέχθηκαν οι εκκινητές P284, OPA-3, OPA-13 και OPR-12, οι οποίοι με βάση την αλληλουχία τους έδωσαν για τις απομονώσεις του μύκητα *A. solani* AL 24, AL 29 που προέρχονταν από φυτά τομάτας


και AL 85 που προερχόταν από φυτά πατάτας, διαφορετικού μεγέθους τμήματα DNA (μπάντες) (Εικ.16).

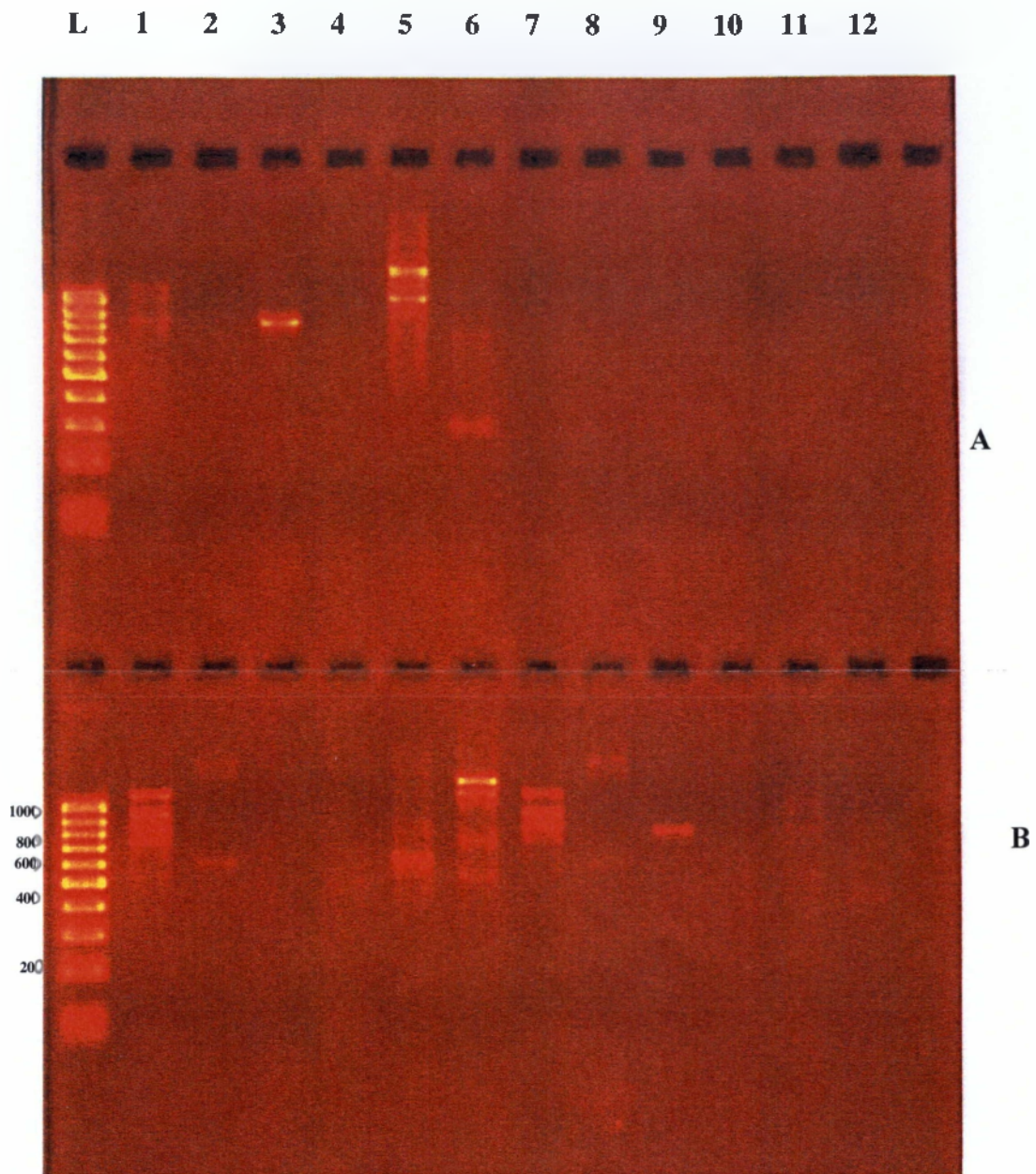
Πιο συγκεκριμένα τα αποτελέσματα από την RAPD-PCR ανάλυση έδειξαν ότι ο εκκινητής P284 έδωσε για την απομόνωση AL 24 από φυτά τομάτας (θέση 1A) προϊόντα τα οποία είχαν μέγεθος από 700bp έως 1000bp, ενώ ο ίδιος εκκινητής έδωσε για την απομόνωση AL 85 από φυτά πατάτας (θέση 1B) τέσσερα προϊόντα των οποίων το μέγεθος κυμαινόταν από 800bp έως >1000bp (Εικ.16). Ο εκκινητής OPA-3 έδωσε για την απομόνωση AL 24 από φυτά τομάτας (θέση 3A) ένα προϊόν το οποίο είχε μέγεθος 800bp ενώ για την απομόνωση AL 85 από φυτά πατάτας (θέση 3B) δεν έδωσε κανένα προϊόν (Εικ.16). Ο εκκινητής OPA-13 έδωσε για την απομόνωση AL 24 από φυτά τομάτας (θέση 5A) δύο προϊόντα εκ των οποίων το πρώτο είχε μέγεθος 1000bp και το δεύτερο ήταν >1000bp ενώ για την απομόνωση AL 85 από φυτά πατάτας (θέση 6B) έδωσε τέσσερα προϊόντα των οποίων το μέγεθος κυμαινόταν από 500bp έως >1000bp. Τέλος, ο εκκινητής OPR-12 έδωσε δύο προϊόντα μεγέθους 300bp και 700bp αντίστοιχα για την απομόνωση AL 24 από φυτά τομάτας (θέση 6A) και ένα μόνο προϊόν το οποίο είχε μέγεθος 600bp για την απομόνωση AL 85 του μύκητα από φυτά πατάτας (θέση 5B) (Εικ.16).



Εικόνα 14. Συσκευή οριζόντιας ηλεκτροφόρησης (Gibco BRL, Life Technologies, USA).



Εικόνα 15. Σχηματική παράσταση του πήγματος αγαρόζης που χρησιμοποιείται για την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR.  : θέσεις υποδοχής των προϊόντων της PCR. (L): θέση υποδοχής της κλίμακας των 100 βάσεων (100bp DNA Ladder).



Εικόνα 16. Διπλό πήγμα αγαρόζης με τα προϊόντα της PCR. Όπου: 1A-6A: απομόνωση του μύκητα *A. solani* από τομάτα (AL 24), 7A-12A : απομόνωση του μύκητα *A. solani* από τομάτα (AL 29), 1B-8B & 12B: απομόνωση του μύκητα *A. solani* από πατάτα (AL 85), 9B-10B : απομόνωση του μύκητα *A. solani* από τομάτα (AL 29), 11B: απομόνωση του μύκητα *A. solani* από τομάτα (AL 24). Θέσεις εκκινητών: (A) θέση 1: P284, θέση 2: P285, θέση 3: OPA3, θέση 4: OPA-4, θέση 5: OPA-13, θέση 6: OPR-12, θέση 7: P284, θέση 8: P285, θέση 9: OPA-3, θέση 10: OPA-4, θέση 11: OPA-13, θέση 12: OPR-12. (B) θέσεις 1-4, 7-10 και 12 όμοιες με την (A), θέση 5: OPR-12, θέση 6: OPA-13, θέση 10:θέση 11: P284.

L: 100bp DNA Ladder

ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η παρούσα μελέτη έδειξε ότι οι απομονώσεις του μύκητα *A. solani* που προέρχονται από φυτά τομάτας διαφέρουν από τις απομονώσεις του ίδιου μύκητα από φυτά πατάτας ως προς τους μορφολογικούς, καλλιεργητικούς χαρακτήρες, την ικανότητα παραγωγής κονιδίων *in vitro* και τις διαστάσεις των κονιδίων τους, ενώ με τη βοήθεια της μοριακής τεχνικής RAPD-PCR εντοπίστηκαν και γενετικές διαφορές.

Πιο συγκεκριμένα, τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας έδειξαν ότι σε θρεπτικό υλικό V-8 άγαρ η γραμμική αύξηση του μυκηλίου όλων των απομονώσεων του μύκητα *A. solani* από φυτά τομάτας ήταν στατιστικά σημαντικά ($P < 0,05$) μεγαλύτερη από εκείνη των απομονώσεων του μύκητα από φυτά πατάτας. Στην Διεθνή Βιβλιογραφία δεν υπάρχουν ανάλογες αναφορές ως προς το ρυθμό αύξησης του μυκηλίου απομονώσεων του μύκητα *A. solani* διαφορετικής προέλευσης.

Σύμφωνα με την παρούσα μελέτη, οι απομονώσεις του μύκητα που προέρχονταν από φυτά τομάτας εμφάνισαν στο θρεπτικό υλικό V-8 άγαρ συγκεντρικούς δακτυλίους και έρπον μυκήλιο ενώ ο χρωματισμός των αποικιών είχε μια διαβάθμιση από γκριζό έως μαύρο. Σε ότι αφορά τις απομονώσεις του μύκητα που προέρχονταν από φυτά πατάτας όλες σχημάτισαν εναέριο μυκήλιο ενώ οι περισσότερες δεν εμφάνισαν συγκεντρικούς δακτυλίους, είχαν δε χρωματισμό υπόλευκο ή γκριζό ανοιχτό. Σύμφωνα με τους Ellis & Gibson (1975), ο μύκητας *A. solani* σχηματίζει σε στερεό θρεπτικό υλικό ανάπτυξης αποικίες χρώματος γκριζού έως μελανού με άφθονο και πυκνό εναέριο μυκήλιο. Οι τυχόν διαφορές με τη μορφολογία των αποικιών των απομονώσεων του μύκητα *A. solani* της παρούσας μελέτης πιθανόν να οφείλονται στο διαφορετικό θρεπτικό υλικό ή τη διαφορετική προέλευση των απομονώσεων, αν και οι Ellis & Gibson (1975) δεν αναφέρουν στοιχεία σχετικά με τους δύο παραπάνω παράγοντες.

Η παρούσα εργασία έδειξε επίσης ότι τόσο η *in vitro* παραγωγή κονιδίων των απομονώσεων του μύκητα *A. solani* όσο και ο αριθμός των παραγομένων κονιδίων εξαρτάται από την προέλευση των απομονώσεων καθώς και από το θρεπτικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε κατά την σποριογένεση. Πιο συγκεκριμένα, όλες οι απομονώσεις του μύκητα *A. solani* που προέρχονταν από φυτά τομάτας σχημάτισαν κονίδια στο θρεπτικό υλικό V-8 άγαρ, ο αριθμός των οποίων εξαρτιόταν από την απομόνωση, ενώ οι απομονώσεις του μύκητα *A. solani* που προέρχονταν από φυτά πατάτας δεν

παρήγαγαν κονίδια στο συγκεκριμένο υλικό, με εξαίρεση δύο απομονώσεις. Η παρούσα μελέτη έδειξε επίσης ότι στο θρεπτικό υλικό S-medium όλες οι απομονώσεις του μύκητα ανεξάρτητα από την προέλευση τους, σχημάτισαν κονίδια. Ο Simmons (2000), βασιζόμενος στους μορφολογικούς χαρακτήρες, τις διαστάσεις των κονιδίων και την ικανότητα παραγωγής κονιδίων *in vitro* διαφόρων απομονώσεων του μύκητα *A. solani* από διαφορετικούς ξενιστές (τομάτα, πατάτα) και διαφορετικές περιοχές του κόσμου, προσδιόρισε τέσσερα διαφορετικά είδη απομονώσεων στο είδος *A. solani*. Σύμφωνα με την κατάταξη του Simmons (2000) οι απομονώσεις που προέρχονται από φυτά πατάτας και οι οποίες δεν παράγουν εύκολα κονίδια *in vitro* στο θρεπτικό υλικό V-8 άγαρ ανήκουν στο ήδη γνωστό είδος *A. solani*. Αντίθετα, οι απομονώσεις που προέρχονται από φυτά τομάτας μπορεί να ανήκουν σε ένα από τα παρακάτω είδη: *A. tomatophila* Simmons sp. nov., *A. subcylindrica* Simmons & Roberts sp. nov. ή *A. cretica* Simmons & Vakalounakis sp. nov. Από τα παραπάνω τρία νέα είδη, το πρώτο και το τρίτο παράγουν άφθονα κονίδια *in vitro* (V-8 άγαρ), ενώ το είδος *A. subcylindrica* που προσβάλλει κυρίως την κερασόμορφη τομάτα (*L. esculentum* var. *cerasiforme*) παράγει ελάχιστα κονίδια *in vitro* (Simmons, 2000). Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης δεν συμφωνούν απόλυτα με εκείνα του Simmons (2000) κυρίως όσον αφορά τις απομονώσεις του μύκητα από φυτά πατάτας οι οποίες δεν σχημάτισαν κονίδια (με εξαίρεση ελάχιστα κονίδια από δύο απομονώσεις) στο V-8 άγαρ. Θα πρέπει όμως να σημειωθεί ότι οι απομονώσεις αυτές παρήγαγαν άφθονα κονίδια με τη μέθοδο των Shahin & Shepard (1979) που τροποποιήθηκε μετέπειτα από τη Vloutoglou (1994). Η μέθοδος αυτή βασίζεται στο συνδυασμό πολλών παραγόντων, που ευνοούν το σχηματισμό κονιδίων από μύκητες του γένους *Alternaria*. Οι παράγοντες αυτοί είναι η παρουσία υψηλής συγκέντρωσης CaCO₃ στη σύνθεση του θρεπτικού υλικού, η υψηλή σχετική υγρασία (προσθήκη 2ml απεσταγμένου, αποστειρωμένου νερού στην επιφάνεια του θρεπτικού υλικού S-medium), το πλήγωμα του μυκηλίου και η έκθεση των καλλιεργειών σε θερμοκρασία 21°C και σε συνθήκες εναλλαγής υπεριώδους ακτινοβολίας με σκότος (12h NUV-light/12h σκότος). Με την επίδραση διαφόρων παραγόντων στην *in vitro* παραγωγή κονιδίων από μύκητες του γένους *Alternaria* έχουν ασχοληθεί πολλοί ερευνητές στο παρελθόν (Aragaki, 1964; Rands, 1917; Charlton, 1953; Lukens, 1960; Shahin & Shepard, 1979). Ο Rotem (1994) αναφέρει ότι τα περισσότερα είδη του γένους *Alternaria* παράγουν κονίδια *in vitro* σε θρεπτικά υλικά φτωχά σε σάκχαρα όπως π.χ το θρεπτικό υλικό V-8 άγαρ. Επιπλέον, ο ίδιος ερευνητής αναφέρει ότι ο πληθυσμός των διαφόρων ειδών του γένους

Alternaria αποτελείται από απομονώσεις που διαφέρουν τόσο στον αριθμό των παραγομένων κονιδίων όσο και στις συνθήκες (θερμοκρασία, θρεπτικά υποστρώματα, έκθεση στην υπεριώδη ακτινοβολία, κλπ) παραγωγής τους. Σύμφωνα με τον Rands (1917), ο μύκητας *A. solani* παράγαγε κονίδια μόνο μετά από πλήγωμα του μυκηλίου σε συνδυασμό με αφυδάτωση του θρεπτικού υλικού και έκθεση των καλλιεργειών για αρκετές ώρες στην ηλιακή ακτινοβολία.

Όταν στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν οι διαστάσεις των κονιδίων των διαφόρων απομονώσεων του μύκητα *A. solani* διαπιστώθηκε ότι αυτές εξαρτώνται από την προέλευση των απομονώσεων καθώς και από το θρεπτικό υλικό πάνω στο οποίο αναπτύχθηκαν (*in vitro*). Οι διαστάσεις των κονιδίων των απομονώσεων του μύκητα *A. solani* από φυτά τομάτας ήταν μεγαλύτερες από εκείνες των απομονώσεων από φυτά πατάτας. Πιο συγκεκριμένα, οι διαστάσεις των κονιδίων των απομονώσεων του μύκητα *A. solani* από φυτά τομάτας σε θρεπτικό υλικό V-8 άγαρ ήταν όσον αφορά το συνολικό μήκος σώματος 179-255,2μm και το πλάτος σώματος 12,5-15μm, ενώ εκείνες από φυτά πατάτας ήταν 66,6-104,6μm και 12,1-13μm αντίστοιχα. Αντίθετα, οι διαστάσεις των ίδιων απομονώσεων στο θρεπτικό υλικό S-medium ήταν σχετικά μεγαλύτερες. Πιο συγκεκριμένα, το συνολικό μήκος σώματος των κονιδίων του μύκητα από φυτά τομάτας ήταν 199-266,6μm και το πλάτος σώματος 15,3-19,2μm, ενώ εκείνων από φυτά πατάτας ήταν 121,2-194μm και 16,5-19μm αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα αυτά δεν συμφωνούν απόλυτα με εκείνα των Ellis & Gibson (1975), οι οποίοι αναφέρουν ότι το συνολικό μήκος σώματος των κονιδίων του μύκητα *A. solani* κυμαίνεται από 150-300μm και το πλάτος 15-19μm. Οι διαφορές όμως πιθανόν να οφείλονται στο διαφορετικό θρεπτικό υλικό ή στη διαφορετική προέλευση των απομονώσεων αν και οι παραπάνω ερευνητές δεν αναφέρουν στοιχεία σχετικά με τους δύο αυτούς παράγοντες.

Διαφορετικές διαστάσεις κονιδίων σε σχέση με εκείνες των Ellis & Gibson (1975) καθώς και με εκείνες της παρούσας εργασίας αναφέρει και ο Rotem (1994). Πιο συγκεκριμένα, σε θρεπτικό υλικό V-8 άγαρ το συνολικό μήκος σώματος των κονιδίων του μύκητα *A. solani* κυμαινόταν από 163-381μm και το πλάτος από 15-30μm (Rotem, 1994). Και στην περίπτωση αυτή όμως δεν αναφέρεται η προέλευση των απομονώσεων τις οποίες μελέτησε. Ο ίδιος ερευνητής αναφέρει επίσης ότι όταν χρησιμοποιήθηκε διαφορετικό θρεπτικό υπόστρωμα (π.χ PDA), οι διαστάσεις των κονιδίων του μύκητα *A. solani* ήταν μικρότερες (συνολικό μήκος σώματος 120-296μm, πλάτος σώματος 12-20μm) (Rotem, 1994). Διαφορές ως προς τις διαστάσεις των

κονιδίων του μύκητα *A. solani* ανάλογα με το θρεπτικό υλικό που χρησιμοποιείται έχουν διαπιστωθεί και από τον Bonde (1929).

Επιπλέον, τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης έδειξαν ότι οι απομονώσεις του μύκητα *A. solani*, ανεξάρτητα προέλευσης και υλικού ανάπτυξης παράγγααν *in vitro* κονίδια με μονό και διπλό ράμφος και ότι το ποσοστό κονιδίων με μονό ράμφος ήταν μεγαλύτερο από εκείνο των κονιδίων με διπλό. Τα παραπάνω αποτελέσματα είναι ανάλογα με εκείνα του Simmons (2000), ο οποίος διαπίστωσε ότι ο μύκητας *A. solani* παράγγαγε *in vitro* μεγαλύτερο αριθμό κονιδίων με μονό από ότι με διπλό ράμφος, ανεξάρτητα από το θρεπτικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε.

Όταν στην παρούσα εργασία διερευνήθηκε για πρώτη φορά διεθνώς η δυνατότητα γενετικού διαχωρισμού των απομονώσεων του μύκητα *A. solani* από φυτά τομάτας από τις απομονώσεις του ίδιου μύκητα από φυτά πατάτας, χρησιμοποιώντας την μοριακή τεχνική RAPD-PCR, εντοπίστηκαν τέσσερις εκκινητές (primers) (P284, OPA-3, OPA-13, OPR-12) οι οποίοι μπορούσαν να διαχωρίσουν τις παραπάνω δύο ομάδες απομονώσεων.

Με βάση τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης καθώς και τα αποτελέσματα των Vloutoglou *et al.* (2002), που έδειξαν ότι οι απομονώσεις του μύκητα *A. solani* από φυτά τομάτας εμφανίζουν μεγαλύτερη παθογένεια σε φυτά τομάτας σε σχέση με τις απομονώσεις του μύκητα από φυτά πατάτας, φαίνεται ότι πιθανόν οι δύο αυτές ομάδες απομονώσεων ανήκουν σε διαφορετικά είδη. Σε ανάλογα συμπεράσματα κατάληξε και ο Simmons (2000) μελετώντας όμως μόνο τους μορφολογικούς, καλλιεργητικούς χαρακτήρες, την ικανότητα παραγωγής κονιδίων *in vitro* και τις διαστάσεις κονιδίων. Στην παρούσα όμως μελέτη διαπιστώθηκε από τα προκαταρκτικά πειράματα που έγιναν ότι οι δύο αυτές ομάδες απομονώσεων του μύκητα *A. solani* διαφέρουν εκτός των άλλων και σε γενετικό επίπεδο. Η έρευνα όμως θα πρέπει να συνεχιστεί εξετάζοντας μεγαλύτερο αριθμό απομονώσεων του μύκητα *A. solani*.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Adams, R.P. and Demeke, T.R. (1993).** Systematic relationships in *Juniperus* based on random amplified polymorphic DNA. Taxon **42**: 553-571.
- Annamalai, D., Ishil, H., Lalithakumari, D. and Revathi, R. (1995).** Polymerase chain reaction and its applications in fungal disease diagnosis. Journal of Plant Diseases and Protection **102(1)**: 91-104.
- Aragaki, M. (1961).** Radiation and temperature interaction on the sporulation of *Alternaria* tomato. Phytopathology **51**: 803-805.
- Aragaki, M. (1962).** Quality of radiation inhibitory to sporulation of *Alternaria* tomato. Phytopathology **52**: 1227-1228.
- Aragaki, M. (1964).** Relation of radiation and temperature to the sporulation of *Alternaria* tomato and other fungi. Phytopathology **54**: 565-569.
- Aylor, D.E. (1990).** The role of intermittent wind in the dispersal of fungal pathogens. Annual Review of Phytopathology **28**: 73-92.
- Βλουτόγλου, Ε., Ασπρόμουγκος, Ι. και Κατσιμάκης, Θ. (2002).** Χαρακτηρισμός απομονώσεων του μύκητα *Alternaria solani* ανθεκτικών στο iprodione. Περίληψεις εργασιών 11^{ου} Πανελληνίου Φυτοπαθολογικού Συνεδρίου Πρέβεζα. σελ.137.
- Barclay, G.M., Murphy, H.J., Manzer, F.E. and Hutchinson, F.E. (1973).** Effects of differential rates of nitrogen and phosphorus on early blight in potatoes. American Potato Journal.**50**: 42-48.
- Bashi, E. and Rotem, J. (1974).** Adaptation of four pathogens to semi-arid habitats as conditioned by penetration rate and germinating spore survival. Phytopathology **64**: 1035-1039.
- Bashi, E. and Rotem, J. (1975a).** Host and biotic factors affecting sporulation of *Stemphylium botryosum* f. sp. *lycopersici* on tomatoes and of *Alternaria porri* f. sp. *solani* on potatoes. Phytoparasitica **3(1)**: 27-38.
- Bashi, E. and Rotem, J. (1975b).** Sporulation of *Stemphylium botryosum* f. sp. *lycopersici* in tomatoes and of *Alternaria porri* f. sp. *solani* in potatoes under alternating wet-dry regimes. Phytopathology **65**: 532-535.
- Basim, H. and Katircioglu, Y.Z. (1990).** Studies of *in vitro* antagonistic effects of some *Bacillus subtilis* isolates against important plant pathogenic fungi. In:

- Proceedings of the second Turkish National Congress of Biological Control, 26-29 September, 1990, Turkey. pp. 109-118.
- Basu, K. (1971).** Existence of chlamydospores of *Alternaria porri* f.sp. *solani* as overwintering propagules in soil. Phytopathology **61**: 1347-1350.
- Bonde, R. 1929.** Physiological strains of *Alternaria solani*. Phytopathology **17**: 56.
- Brame, C. and Flood, J. (1983).** Antagonism of *Aureobasidium pullulans* towards *Alternaria solani*. Transactions of the British Mycological Society **81**: 621-624.
- Brian, P.W., Elson, G.W., Hemming, H.G. and Wright, J.M. (1952).** The phytotoxic properties of alternaric acid in relation to the etiology of plant diseases caused by *Alternaria solani* (Ell. & Mart.) Jones & Grout. Annals of Applied Biology **39**: 308-321.
- Brummer, E.C., Boyton, J.H. and Kochert, G.T. (1995).** Analysis of annual *Medicago* species using RAPD markers. Genome **38**: 362-367.
- Bussey, M.J. and Stevenson, W.R. (1991).** A leaf disk assay for detecting resistance to early blight caused by *Alternaria solani* in juvenile potato plants. Plant Disease **75**: 385-390.
- Charlton, K.M. (1953).** The sporulation of *Alternaria solani* in culture. Transactions of the British Mycological Society **36**: 349-355.
- Cooke, D. E., Forster, J.W., Jenkins, P.D., Jones, D.G. and Lewis, D.M. (1998).** Analysis of intraspecific and interspecific variation in the genus *Alternaria* by the use of RAPD-PCR. Annals of Applied Biology **132**: 197-209.
- Das, M.L. and Anima, H. (1968).** Influence of *Rhizopus nigricans* on the development of *Alternaria solani*. Phytopathology **63**: 40-46.
- Datar, V.V. and Mayee, C.D. (1982).** Conidial dispersal of *Alternaria solani* in tomato. Indian Phytopathology **35**: 68-70.
- Douglas, D.R. (1972).** The effect of light and temperature on the sporulation of different isolates of *Alternaria solani*. Canadian Journal of Botany **50**: 629-634.
- El-Abyad, M.S., El-Sayed, M.A., El-Shanshoury, A.R. and El-Sabbagh, S.M. (1993).** Towards the biological control of fungal and bacterial diseases of tomato using antagonistic *Streptomyces* spp. Plant and Soil **149**: 185-195.

- Ellis, M.B. and Gibson, I.A.S. (1975).** *Alternaria solani*. CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria No 475. Commonwealth Mycological Institute Kew, Surrey, UK.
- Φανουράκης, Ν. (1999).** Γενετική Βελτίωση Φυτών. Εκδόσεις ΙΩΝ, Αθήνα. σελ. 265-275.
- Folson, J. and Bonde, R. (1925).** *Alternaria solani* as a cause of tuber rot in potatoes. Phytopathology **15**: 282-286.
- Gregory, P.H. (1973).** The Microbiology of the Atmosphere Second edition. Leonard Hill, Aylesbury, England. 377 p.
- Haley, S.D., Miklas, P.N., Stavely, J.R. Byrum, J.T. and Kelly, J.D. (1993).** Identification of RAPD markers linked to major rust resistance gene block in common bean. Theory Applied Genetic **86**: 505-512.
- Harrison, M.D., Livingston, C.M. and Oshima, N. (1965).** Control of potato early blight in Colorado. II. Spore traps as a guide for initiating applications of fungicides. American Potato Journal **42**: 333-340.
- Henning, R.G. and Alexander, L.J. (1959).** Evidence of physiologic races of *Alternaria solani*. Plant Disease Reporter **43**: 298-308.
- Holenstein, J.E. and Stoessl, A. (1983).** Metabolites of *Alternaria solani*, Part IX: Phytotoxicity of Altersolanol A. Phytopathologische Zeitschrift **108**: 143-147.
- Hooker, W.J. (1981).** Compendium of potato diseases (Ed. W.J.Hooker) American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, USA. 125p.
- Horsfall, J.G. and Lukens, R.J. (1971).** Differential temperatures for separate phase of *Alternaria solani*. Phytopathology **61**: 129.
- Ivanyuk, V.G. (1979).** Comparative characteristics of races of *Macrosporium solani* Ell. & Mart. differentiated on potato and tomato. Botanica Issled **21**: 139-144.
- Jones, J.B., Jones, J.P., Stall, R.E. and Zitter, T.A. (1993).** Compendium of tomato diseases The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, USA. 73p.
- Langenberg, W.J. Sutton, J.C. and Gillespie, T.J. (1977).** Relation of weather variables and periodicities of airborne spores of *Alternaria dauci*. Phytopathology **67**:879-883.
- Langsdorf, G., Furuichi, N., Doke, N. and Nishimura, S. (1990).** Investigations on *Alternaria solani* infections: Detection of alternaric acid and a susceptibility

- inducing factor in the spore-germination fluid of *Alternaria solani*. Journal of Phytopathology **128**: 271-282.
- Leach, C.M. (1967).** Interaction of near-ultraviolet light and temperature on sporulation of the fungi *Alternaria*, *Cercospora*, *Fusarium*, *Helminthosporium* and *Stemphylium*. Canadian Journal of Botany **45**: 1999-2016.
- Lima, M.L.R.Z.C., May, L.L. and Maccari, A.Jr. (1997).** Incidence of fungal diseases in potato under several crop systems. Revista do Setor de Ciências Agrarias **16**: 95-98.
- Lukens, R.J. (1960).** Conidial production from filter paper cultures of *Helminthosporium vagans* and *Alternaria solani*. Phytopathology **58**: 867-868.
- Lukens, R.J. and Horfall, J.G. (1969).** Spore initiation in *Alternaria solani*. Phytopathology **59**: 1039.
- Madden, L., Pennypacker, S.P. and MacNab, A.A. (1978).** FAST, a forecast system for *Alternaria solani* on tomato. Phytopathology **68**: 1354-1358.
- Möller, E.M., Bahnweg, G., Sandermann, H. Geiger, H.H. (1992).** A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies and infected plant tissues. Nucleic Acids Research **22**: 6115-6116.
- Morris, P.F., Connolly, M.S. and Clair, D.A. (2000).** Genetic diversity of *Alternaria alternata* isolated from tomato in California assessed using RAPDs. Mycological Research **104** (3): 286-292.
- Michelmore, R.W. and Hulbert, S.H. (1987).** Molecular markers for genetic analysis of phytopathogenic fungi. Annual Review of Phytopathology **25**: 383-404
- Nolte, P. and Ojala, J. (1992).** Control of early blight disease of potato University of Idaho. pp. 129-130.
- Norse, D. (1973).** Some factors influencing spore germination and penetration of *Alternaria longipes*. Annals of Applied Biology **74**: 297-306.
- Ολύμπιος, Χ. (1994).** Ειδική λαχανοκομία (Λαχανικά υπαίθρου) Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών. σελ. 113-118.
- Ολύμπιος, Χ. (2001).** Η τεχνική της καλλιέργειας των κηπευτικών στα θερμοκήπια Εκδόσεις Α. Σταμούλης, Αθήνα. σελ. 39-204.

- Παναγόπουλος, Χ.Γ. (2000).** Ασθένειες τομάτας, μελιτζάνας, πιπεριάς και μπάμιας. Εις: Ασθένειες Κηπευτικών Καλλιεργειών. Εκδόσεις Α. Σταμούλης, Αθήνα. σελ. 15-189.
- Parlange, J.Y. (1974).** Slowing of spore germination with changes between moderately warm and cool temperatures. Phytopathology **65**:551-553.
- Patterson, C.L. (1991).** Importance of chlamydospores as primary inoculum for *Alternaria solani*, incitant of collar rot and early blight on tomato. Plant Disease **75**: 274-278.
- Pound, G.S. and Stahmann, M.A. (1951).** The production of a toxic material by *Alternaria solani* and its relation to the early blight disease of tomato. Phytopathology **41**:1104-1114.
- Pryor, B.M. and Gilbertson, R.L. (2002).** Relationships and taxonomic status of *Alternaria radicina*, *A. carotiincultae*, and *A. petroselini* based upon morphological, biochemical and molecular characteristics. Mycologia **94** (1): 49-61.
- Rands, R.D. (1917).** The production of spores of *Alternaria solani* in pure culture. Phytopathology **7**: 316-317.
- Rotem, J. (1963).** Inhibition of germination of spores of *Alternaria porri* f. sp. *solani*. Phytopathology **53**: 1241.
- Rotem, J. (1964).** The effect of weather on dispersal of *Alternaria* spores in a semi-arid region of Israel. Phytopathology **54**: 628-632.
- Rotem, J. (1965).** Sand and dust storms as factors leading to *Alternaria* blight epidemics on potatoes and tomatoes. Agricultural Meteorology **2**: 281-288.
- Rotem, J. (1968).** Thermoxerophytic properties of *Alternaria porri* f.sp. *solani*. Phytopathology **58**: 1284-1287.
- Rotem, J. (1969).** The effect of soil moisture level on the incidence of early blight of potato and tomato plants. Israel Journal of Agricultural Research **19**: 139-141.
- Rotem, J. (1994).** The Genus *Alternaria*: Biology, Epidemiology and Pathogenicity APS Press. The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, USA. 313 pp.
- Rotem, J. and Aust, H.J. (1991).** The effect of ultraviolet and solar radiation and temperature on survival of fungal propagules. Journal of Phytopathology **133**: 76-84.

- Rotem, J. and Bashi, E. (1969).** Induction of sporulation of *Alternaria rotrei* f. sp. *solani* by inhibition of its vegetative development. Transactions of the British Mycological Society **53**: 433-439.
- Salgado, C.H.G., Arias, A.P., Flores, M.F., Soto, E.S. and Gomez, R.B. (1999).** Antagonistic activity of *Trichoderma* sp. isolated from a soil of the Gramma province, Cuba against *Alternaria solani*. Revista de la Facultad de Agronomia, Universita del Zulia **16**: 167-173.
- Saregianni, J.A. (1936).** Liste (II) des maladies des plants cultives et autres de la Grece. Annals Intitute Phytopathologique Benaki **2** : 8-12.
- Shahin, E.A. and Shepard, J.F (1979).** An efficient technique for inducing profuse sporulation of *Alternaria* species. Phytopathology **69**: 618-620.
- Sharma, T.R. and Tewari J.P. (1998).** RAPD analysis of three *Alternaria* species pathogenic to crucifers. Mycological Research **102** (7): 807-814.
- Shtienberg, D., Doster, M.A., Pelletier, J.R. and Fry, W.E. (1989).** Use of simulation models to develop a low-risk strategy to suppress early and late blight in potato foliage. Phytopathology **79**: 590-595.
- Shtienberg, D., Blachinsky, D., Ben-Hador, G. and Dinoor, A. (1996).** Effects of growing season and fungicide type on the development of *Alternaria solani* and on potato yield. Plant Disease **80**: 994-998.
- Simmons, E.G. (2000).** *Alternaria* themes and variation. Species on Solanaceae. Mycotaxon **75**: 244-286.
- Sinden, S.L., Goth, R.W. and O'Brien, M.J. (1973).** Effect of potato alkaloids on the growth of *Alternaria solani* and their possible role as resistance factors in potatoes. Phytopathology **63**: 303-307.
- Stevenson, P.C., Padgham, D.E. and Haware, M.P. (1995).** Root exudates associated with the resistance of four chickpea cultivars (*Cicer arietinum*) to two races of *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris*. Plant Pathology **44**: 686-694.
- Stevenson, R.E. and Pennypacker, S.P. (1988).** Effect of radiation, temperature and moisture on conidial germination of *Alternaria solani*. Phytopathology **78**: 926-930.
- Strandberg, J.O. (1992).** *Alternaria* diseases that attack vegetable crops: biology and options for disease management. In: Alternaria: Biology, Plant Diseases and Metabolites (Eds. J. Chelkowski & A. Visconti), Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, pp. 175-208.

- Stoflet, E.S., Koebert, D.D., Sarkar, G.E. and Summer, S.S. (1988).** Genomic amplification with transcript sequencing. Science **239**: 491-494.
- Tolman, J.H., McLeod, D.G.R. and Harris, C.R. (1986).** Yield losses in potatoes, onions and rutabagas in Southwestern Ontario, Canada- the case for pest control. Crop Protection **5**: 227-237.
- Vakalounakis, D.J. (1991).** Control of early blight of greenhouse tomato, caused by *Alternaria solani*, by inhibiting sporulation with ultraviolet-absorbing vinyl film. Plant Disease **75**: 795-797.
- Venette, J.R. and Harrison, M.D. (1973).** Factors affecting infection of potato tubers by *Alternaria solani* in Colorado. American Potato Journal **50**: 283-292.
- Vloutoglou, I. (1994).** Epidemiology of *Alternaria linicola* on linseed (*Linum usitatissimum* L.) Ph.D. Thesis, University of Nottingham, University Park, Nottingham, UK. 378 pp.
- Vloutoglou, I., Fitt, B.D.L. and Lucas, J.A. (1995).** Periodicity and gradients in dispersal of *Alternaria linicola* in linseed crops. European Journal of Plant Pathology **53**: 450-455.
- Waggoner, P.E. and Horsfall, J.G. (1969).** EPIDEM: A simulator of plant disease written for a computer. Connecticut Agricultural Experimental Station Bulletin **698**: 1-80.
- Waggoner, P.E. and Parlange, J.Y. (1977).** Changed metabolic pathways and the germination of *Alternaria solani* spores. Phytopathology **67**: 1007-1011.
- Weir, T.L., Huff, D.R., Christ, B.J. and Romaine, C.P. (1998).** RAPD-PCR analysis of genetic variation among isolates of *Alternaria solani* and *Alternaria alternata* from potato and tomato. Mycologia **90**: 813-821.
- Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rifalski, J.A. and Tingey, S.V. (1990).** DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Research **18**: 6531-6535.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Πίνακας 6. Ανάλυση παραλλακτικότητας (ANOVA) των αποτελεσμάτων της μέτρησης της γραμμικής αύξησης του μυκηλίου των απομονώσεων του μύκητα *A. solani* μετά από 2 ημέρες επώασης των τριβλίων. Η ανάλυση έγινε με τη βοήθεια του στατιστικού προγράμματος για ηλεκτρονικούς υπολογιστές SPSS 9.0.

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1,217	19	6,404E-02	7,552	,000
Within Groups	,339	40	8,479E-03		
Total	1,556	59			

Πίνακας 7. Ανάλυση παραλλακτικότητας (ANOVA) των αποτελεσμάτων της μέτρησης της γραμμικής αύξησης του μυκηλίου των απομονώσεων του μύκητα *A. solani* μετά από 4 ημέρες επώασης των τριβλίων. Η ανάλυση έγινε με τη βοήθεια του στατιστικού προγράμματος για ηλεκτρονικούς υπολογιστές SPSS 9.0.

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	7,219	19	,380	5,713	,000
Within Groups	2,660	40	6,650E-02		
Total	9,879	59			

Πίνακας 8. Ανάλυση παραλλακτικότητας (ANOVA) των αποτελεσμάτων της μέτρησης της γραμμικής αύξησης του μυκηλίου των απομονώσεων του μύκητα *A. solani* μετά από 7 ημέρες επώασης των τριβλίων. Η ανάλυση έγινε με τη βοήθεια του στατιστικού προγράμματος για ηλεκτρονικούς υπολογιστές SPSS 9.0.

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	4,619	19	,243	5,505	,000
Within Groups	1,767	40	4,417E-02		
Total	6,386	59			

Πίνακας 9. Ανάλυση παραλλακτικότητας (ANOVA) των αποτελεσμάτων της μέτρησης του αριθμού των παραγομένων κονιδίων ανά cm^2 επιφάνειας θρεπτικού υλικού V-8 άγαρ. Η ανάλυση έγινε με τη βοήθεια του στατιστικού προγράμματος για ηλεκτρονικούς υπολογιστές SPSS 9.0.

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	6,33E+10	19	3,33E+09	71,581	,000
Within Groups	1,86E+09	40	46527066		
Total	6,51E+10	59			

Πίνακας 10. Ανάλυση παραλλακτικότητας (ANOVA) των αποτελεσμάτων της μέτρησης του αριθμού των παραγομένων κονιδίων ανά cm^2 επιφάνειας θρεπτικού υλικού S-medium. Η ανάλυση έγινε με τη βοήθεια του στατιστικού προγράμματος για ηλεκτρονικούς υπολογιστές SPSS 9.0.

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	5,92E+09	19	3,12E+08	5,163	,000
Within Groups	2,41E+09	40	60358889		
Total	8,34E+09	59			

Στους παραπάνω πίνακες όπου:

Between Groups: Επεμβάσεις

Within Groups: Πειραματικό λάθος

Total: Ολική παράλλαξη

Sum of squares: Άθροισμα τετραγώνων

df: Βαθμοί ελευθερίας

Mean of squares: Μέσο τετράγωνο

F: Δοκιμή F

Sig.: Σημαντικότητα