

Τ.Ε.Ι. ΚΑΛΑΜΑΤΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ

Διερεύνηση της επισχετικότητας οργανικών υποστρωμάτων από  
αγρό-βιομηχανικά υπολείμματα στο εδαφικό παθογόνο φυτών  
*Fusarium oxysporum f.sp. radicis-lycopersici.*

Αλέρτας Α. Γεώργιος  
Πτυχιακή Εργασία

Καλαμάτα 2003

Τ.Ε.Ι. ΚΑΛΑΜΑΤΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ

**Διερεύνηση της επισχετικότητας οργανικών υποστρωμάτων από  
αγρό-βιομηχανικά υπολείμματα στο εδαφικό παθογόνο φυτών  
*Fusarium oxysporum f.sp. radicis-lycopersici.***

Σπουδαστής :  
Αλέρτας Α. Γεώργιος

Επιβλέποντες Καθηγητές :  
Ηλιόπουλος Αναστάσιος , Παπαδοπούλου Καλλιόπη

Καλαμάτα 2003

ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....	1
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	2

## **1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

1.1	ΕΔΑΦΙΚΟΙ ΦΥΤΟΠΑΘΟΓΟΝΟΙ ΜΥΚΗΤΕΣ.....	3
1.2	ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ.....	4
1.2.1	Χημική αντιμετώπιση.....	4
1.2.2	Καλλιεργητικά μέτρα.....	4
1.2.3	Βιολογικός έλεγχος.....	5
1.2.4	Επισχετικά εδάφη.....	6
1.3	COMPOST.....	7
1.4	Ο ΜΥΚΗΤΑΣ <i>Fusarium oxysporum f.sp. radicis-lycopersici</i> (FORL).....	9
1.4.1	Ταξινόμηση.....	9
1.4.2	Συμπτώματα.....	10
1.5	ΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ GUS-A.....	11

## **2. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ**

2.1	ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ COMPOST.....	13
2.2	ΣΠΟΡΑ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ ΤΟΜΑΤΑΣ.....	14
2.3	ΜΕΣΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΩΝ ΦΥΤΑΡΙΩΝ.....	15
2.4	ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ.....	16
2.5	ΛΟΙΠΑ ΥΛΙΚΑ – ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ.....	17
2.5.1	Προετοιμασία μιγμάτων.....	18
2.5.2	Προετοιμασία μολυσματικού υλικού από προπαρασκευασμένη καλλιέργεια FORL.....	19
2.5.3	Μετρήσεις ενζυμικής δραστηριότητας με φασματογράφο φθορισμού (κατά Κοσμά).....	20
α)	Δημιουργία πρότυπης καμπύλης αναφοράς MU.....	20
β)	Μετρήσεις ενζυμικής δραστηριότητας δειγμάτων με φασματοφωτόμετρο φθορισμού.....	21
2.5.4	Μετρήσεις συγκεντρώσεων ολικών πρωτεϊνών (μέθοδος Bradford).....	22
α)	Δημιουργία πρότυπης καμπύλης αναφοράς BSA.....	22
β)	Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνικών δειγμάτων.....	23
2.6	ΣΥΣΚΕΥΕΣ.....	23
2.7	ΣΚΕΥΗ.....	24
2.8	ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΠΡΟΣΒΟΛΩΝ – ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ.....	25

## **3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**

3.1	ΜΑΚΡΟΣΚΟΠΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ.....	26
3.2	ΠΟΣΟΣΤΟ ΠΡΟΣΒΟΛΗΣ.....	26
3.3	ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΠΟΡΕΙΑΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΤΟΥ ΜΥΚΗΛΙΟΥ ΤΟΥ FORL ΣΕ ΕΚΛΕΚΤΙΚΟ ΘΡΕΠΤΙΚΟ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ.....	28
3.4	ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΠΟΡΕΙΑΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΤΟΥ ΜΥΚΗΛΙΟΥ ΤΟΥ FORL ΣΤΗΝ ΤΥΡΦΗ ΚΑΙ ΣΤΟ COMPOST ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΤΟΥ GUS.....	29

## **4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ**..... 32

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	34
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΕΚΟΝΩΝ.....	36
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΠΙΝΑΚΩΝ.....	40

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα πτυχιακή εργασία πραγματοποιήθηκε στα εργαστήρια του Ινστιτούτου Ελαιάς και Οπωροκηπευτικών Καλαμάτας με την εποπτεία της Δρος Παπαδοπούλου Καλλιόπης και την επίβλεψη του καθηγητή του Τ.Ε.Ι. Καλαμάτας Ηλιόπουλου Αναστάσιου. Ανεκτίμητη η βοήθεια του Δρα Καβρουλάκη Νεκτάριου σε πολλά τεχνικά ζητήματα.

Σύμφωνα με τον τίτλο της εργασίας, μελετήθηκε η επισχετικότητα αγροβιομηχανικών υπολειμμάτων στον παθογόνο μύκητα εδάφους *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici* (FORL). Πιο συγκεκριμένα εξετάστηκε η πορεία ανάπτυξης του παραπάνω μύκητα σε υπόστρωμα, το οποίο περιελάμβανε προϊόντα αερόβιας χώνευσης οργανικών υπολειμμάτων.

Σκοπός της εργασίας ήταν η ποσοτικοποίηση και ανάδειξη ενός εναλλακτικού τρόπου αντιμετώπισης εδαφικών φυτοπαθογόνων μυκήτων όπως το FORL, αντί των συνηθισμένων χημικών πρακτικών που πιθανόν επιβαρύνουν το περιβάλλον και, ίσως, και το πιάτο του καταναλωτή.

Ευχαριστώ το επιστημονικό προσωπικό του Ινστιτούτου για την παροχή πολύτιμων πληροφοριών καθώς και το ίδιο το ίδρυμα που μου εμπιστεύθηκε τη χρήση του ακριβού και δυσεύρετου εξοπλισμού του.

Καλαμάτα, Οκτώβριος 2003  
Γεώργιος Αλέρτας

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο μύκητας *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici* (FORL) είναι ένα παθογόνο εδάφους, που προκαλεί αδρομυκώσεις κυρίως σε θερμοκηπιακές καλλιέργειες τομάτας. Για την καταπολέμηση του FORL χρησιμοποιούνται διάφορα μέτρα και κυρίως χημικά (απολύμανση εδάφους).

Σε πειράματα αξιολόγησης αγρο-βιομηχανικών υπολειμμάτων που προηγήθηκαν αυτής της εργασίας (Ntougias et. al. 2003), παρατηρήθηκε κάποια μορφή επισχετικότητας επί του συγκεκριμένου παθογόνου, η οποία ήταν αρκετά πιο έντονη σε compost παρασκευασμένο από 50% στέμφυλα και 50% πυρηνόξυλο.

Στόχος της εργασίας αυτής ήταν να πιστοποιήσει την επισχετικότητα και να διαπιστώσει αν οφείλεται στην παρεμπόδιση της ανάπτυξης του FORL στο compost.

Αρχικά, με τη μέθοδο των οπτικών παρατηρήσεων, πιστοποιήσαμε την υφιστάμενη επισχετικότητα. Έπειτα, με τη μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων διαπιστώσαμε διαφορετική συμπεριφορά του παθογόνου στις δυο επεμβάσεις (compost και τύρφη). Στο compost φαινόταν σαν να μην μπορούσε το παθογόνο να μπει στον ξενιστή, ενώ στην τύρφη όλα έδειχναν σαν ο μύκητας να είχε εισέλθει στο φυτό, και αφού ολοκλήρωσε την προσβολή ακολούθησε την πορεία που είχε και στο compost.

Τέλος μετρήθηκε η ενζυμική δραστηριότητα του γονιδίου GUS η οποία έχει συσχετιστεί θετικά με το νερό μυκηλιακό βάρος (βιομάζα). Οι μετρήσεις αυτές έδειξαν ίδια ενζυμική δραστηριότητα, ήτοι ίδια ανάπτυξη του παθογόνου στις ριζόσφαιρες και των δύο επεμβάσεων.

Ο συνδυασμός αυτών των αποτελεσμάτων μας οδήγησε στο συμπέρασμα ότι η επισχετικότητα υφίσταται και ότι δεν οφείλεται σε παρεμπόδιση της ανάπτυξης του FORL, αλλά στην αδυναμία του να εισέλθει στους ξενιστές που είχαν αναπτυχθεί στο compost.

# 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## 1.1 ΕΔΑΦΙΚΟΙ ΦΥΤΟΠΑΘΟΓΟΝΟΙ ΜΥΚΗΤΕΣ

Οι μύκητες είναι ομάδα ετερότροφων οργανισμών που περιλαμβάνει πάνω από 100.000 είδη. Άλλοι είναι παρασιτικοί ,άλλοι σαπροφυτικοί και άλλοι συμβιωτικοί.

Οι περισσότεροι φυτοπαθογόνοι μύκητες, περνούν μέρος της ζωής τους στους ζωντανούς ιστούς του ξενιστή ,και μέρος στα νεκρά υπολείμματα που παραμένουν στο έδαφος ,όπου παραμένουν ανενεργοί μέχρι να βρεθεί ζωντανός ξενιστής. Άλλοι, προκειμένου να ολοκληρώσουν το βιολογικό τους κύκλο, πρέπει να περάσουν και από ζωντανούς και από νεκρούς ιστούς του ξενιστή. Η επιβίωση και ανάπτυξη των παθογόνων, εξαρτάται σε πολύ μεγάλο από τις συνθήκες περιβάλλοντος, όπως από την υγρασία, τη θερμοκρασία, τη διαθεσιμότητα τροφής, παράγοντες που καθορίζουν τη δυνατότητα πρόσληψης της τροφής.(Α. Ηλιόπουλος, 1993)

Το ελεύθερο μυκήλιο ζει σε ένα εύρος θερμοκρασιών, από 5 ως 45°C , με την υγρασία, να θεωρείται απολύτως αναγκαία.

Όταν οι συνθήκες δεν τους ευνοούν, οι περισσότεροι μύκητες παράγουν σπόρια , κατασκευασμένα έτσι, ώστε να επιβιώνουν σε κατάσταση λήθαργου (υποσπόρια και χλαμυδοσπόρια) στις ακραίες συνθήκες του χειμώνα ή του καλοκαιριού. Όμως και τα σπόρια θέλουν ειδικές συνθήκες για να βλαστήσουν όπως υψηλή υγρασία και συχνά θερμοκρασίες άνω των 15-20 °C.

Οι εδαφικοί φυτοπαθογόνοι μύκητες είναι πολλοί και προσβάλουν σχεδόν όλες τις καλλιέργειες. Άλλοι εξειδικεύονται σε ένα είδος ξενιστή και άλλοι περισσότερα είδη. Μεταξύ των φυτοπαθογόνων μυκήτων εδάφους περιλαμβάνονται οι:

- *Rhizoctonia solani*, που προκαλεί σηψιριζίες, τήξεις σπορίων και προσβολές λαιμού σε πολλά λαχανοκομικά είδη κυρίως της οικογένειας Solanaceae.
- *Armillaria mellea* και *Rosellinia necatrix*, που προκαλούν σηψιριζίες σε δένδρα.
- *Phytophthora sp.* ,που προκαλούν τήξεις σπορίων, σηψιριζίες, κομμίωση των εσπεριδοειδών και άλλων δένδρων.
- *Fusarium sp.* και *Verticillium dahliae* που προκαλούν αδρομυκώσεις σε πολλά είδη φυτών (λαχανοκομικά, βαμβάκι, δένδρα, αμπέλι κ.ά.)
- *Sclerotium sp.*, *Macrophomina sp.*, *Pythium sp.*, που προκαλούν τήξεις σπορίων, και σηψιριζίες σε πολλά ετήσια φυτά.

## 1.2 ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ

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

### 1.2.1 Χημική αντιμετώπιση

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

- Επένδυση σπόρων με ειδικά μυκητοκτόνα.
- Απολύμανση του εδάφους με βρωμιούχο μεθύλιο, dazomet, metam sodium ή άλλα χημικά μέσα.
- Χρησιμοποίηση ειδικών διασυστηματικών μυκητοκτόνων ανάλογα με τα είδη των φυτοπαθογόνων μυκήτων. Ειδικότερα, για τις φουζαριώσεις, ριζοκτόνιες, σκληρότια χρησιμοποιούνται βενζιμιδαζολικά μυκητοκτόνα (benomyl, carbendazim, thiophanate methyl), ενώ για φυτόφθορες και πύθια χρησιμοποιούνται τα etridiazole, fenaminosulf, propanocarb, fosetyl-Al. Εφαρμόζονται με ριζοποτίσματα.

### 1.2.2 Καλλιεργητικά μέτρα

Η ελάττωση εδαφικών μολυσμάτων μπορεί να γίνει σε σημαντικό βαθμό με διάφορα καλλιεργητικά μέτρα, όπως:

- Χρησιμοποίηση υγιούς σπόρου.
- Χρησιμοποίηση ανθεκτικών ποικιλιών
- Αμειψισπορά με σχετικά ανθεκτικά είδη φυτών.
- Βαθιά ενσωμάτωση ή καύση των υπολειμμάτων των καλλιεργειών
- Εμβολιασμός φυταρίων σε ανθεκτικά υποκείμενα (αποτελεσματική τεχνική εναντίον της φουζαρίωσης των κολοκυνθοειδών).

### 1.2.3 Βιολογικός έλεγχος

#### Ανταγωνισμός και παρασιτισμός

Ο βιολογικός έλεγχος βασίζεται σε διάφορους μηχανισμούς που εμπλέκονται σε συστήματα που πολύ οργανισμοί συνυπάρχουν. Τέτοιοι μηχανισμοί είναι οι ανταγωνιστικές σε τροφή σχέσεις, σχέσεις παρασιτισμού, εμφάνιση τοξικοτήτων και ανάπτυξη ανθεκτικότητας φυτών.

Τις τελευταίες δεκαετίες γίνονται προσπάθειες να αξιοποιηθούν για σκοπούς φυτοπροστασίας οι βιολογικές και οικολογικές σχέσεις μεταξύ των μικροοργανισμών και κυρίως οι μεταξύ τους ανταγωνιστικές και παρασιτικές σχέσεις.

Φυσικός ανταγωνισμός και παρασιτισμός έχει παρατηρηθεί σε πολλές περιπτώσεις φυτοπαθογόνων μυκήτων. Περιπτώσεις που έχουν ενδιαφέρον για τις εδαφαγενείς ασθένειες είναι και οι ακόλουθες:

Σαπροφυτικοί μύκητες των γενών *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Verticillium* κ.ά. ασκούν ισχυρή ανταγωνιστική επίδραση εναντίον ορισμένων φυτοπαθογόνων μυκήτων εδάφους των γενών *Rhizoctonia*, *Pythium*, *Fusarium*, *Botrytis* κ.ά. Έχουν ήδη χρησιμοποιηθεί στη γεωργική πράξη σκευάσματα με αφυδατωμένα σπόρια του γένους *Trichoderma* για τον περιορισμό της δράσης των παραπάνω φυτοπαθογόνων.

Έχει επίσης παρατηρηθεί παρασιτισμός του γένους *Rhizoctonia* από μη φυτοπαθογόνα είδη *Pythium*.

Οι έρευνες για βιολογικό έλεγχο επεκτείνονται για να έρθουν και να συνδεθούν με τις αρχές της ολοκληρωμένης διαχείρισης παθογόνων και να περιγράψουν τη δημιουργία ενός αποδεκτού οικοσυστήματος που τείνει να ελέγξει από μόνο του την ανάπτυξη διαφόρων επιζήμιων οργανισμών. (Papanizos & Lumsden, 1980)

#### Επίκτητη αντοχή

Η επίκτητη αντοχή (επαγώγιμη αντοχή ή ενεργητική ανοσία, αγγλ. acquired resistance) είναι η αντοχή που αποκτά ένα φυτό έναντι ενός παθογόνου, μετά από επίδραση βιοτικών ή αβιοτικών παραγόντων. Οι παράγοντες αυτοί (elicitors= διεγέρτες), μπορεί να είναι φυτοπαθογόνοι μικροοργανισμοί και ιοί ή κάποιες φυσικές ή χημικές ουσίες, που προκαλούν την ενεργοποίηση του αμυντικού μηχανισμού του φυτού. Έχουν αναφερθεί περιπτώσεις φυτών, κατά τις οποίες, όταν



ένα παθογόνο βακτήριο ή νεκρά βακτήρια εισαχθούν στο φυτό, του προσδίδουν την ικανότητα να μη μολύνεται από διάφορα παθογόνα βακτήρια ή μύκητες. Για παράδειγμα, το βακτήριο *Bacillus pumilis*, παράγει πτητική μυκοστατική ουσία που καταστέλλει την ανάπτυξη του *Botrytis cinerea* σε καλλιέργειες φράουλας.

Η επίκτητη ανοχή, σε αντίθεση με την πραγματική, δεν κληρονομείται, μπορεί δε να συγκριθεί με την ανοσία που προκαλείται στα ζώα, μετά από την είσοδο στον οργανισμό τους ξένων πρωτεϊνών (αντιγόνων), η οποία έχει ως επακόλουθο τη δημιουργία αντισωμάτων από το ζωικό οργανισμό.

Η επίκτητη ανοχή μπορεί να εκδηλώνεται μόνο κοντά στο σημείο εισόδου του διεγέρτη, οπότε λέγεται τοπική επίκτητη ανοχή (local acquired resistance) ή και σε απομεμακρυσμένα σημεία ή και σε ολόκληρο το φυτό, οπότε λέγεται διασυστηματική επίκτητη ανοχή (systemic acquired resistance ή SAR).

Έχουν ήδη διαπιστωθεί ότι διάφορες χημικές ουσίες, όπως το σαλικυλικό οξύ, το αραχιδονικό οξύ, το 2,6-διγλωροϊσοτονικό οξύ, μπορεί να προκαλέσουν τοπική επίκτητη ανοχή, εφαρμοζόμενα σε δόσεις, που δεν προκαλούν νεκρώσεις στους φυτικούς ιστούς.

#### 1.2.4 Επισχετικά εδάφη

Τα επισχετικά ή κατασταλτικά εδάφη μπορούν να οριστούν με διάφορους τρόπους. Κατά μια άποψη, περιλαμβάνουν όλα τα εδάφη που είναι ακατάλληλα για την ανάπτυξη ποικίλων εδαφικών ασθενειών, και κατά μια άλλη είναι τα εδάφη στα οποία παρατηρείται μια φυσική μείωση περιστατικών εμφάνισης παθογόνων, που καθορίζεται από τη μείωση που συμβαίνει σε μονοκαλλιέργειες διαφόρων φυτών. Μεταξύ αυτών των ορισμών υπάρχουν ερμηνείες για κατασταλτικότητα ασθενειών, και άλλες για παθογόνα. (Homby, 1983)

Κατασταλτικότητα ασθενειών, χρησιμοποιείται στην παρασκευή εδαφικών μιγμάτων όπου εδαφογενείς ασθένειες απουσιάζουν τελείως, ή υπάρχουν σε φυσικώς πολύ μικρές ποσότητες. Η ποικιλία αυτών των μιγμάτων είναι μεγάλη και συναρτάται με την ποικιλία των εδαφογενών ασθενειών, καθώς και με τους ανάλογους ρυθμιστικούς παράγοντες.

Τα επισχετικά εδάφη οφείλουν την δραστικότητα τους σε ένα συνδυασμό γενικών και ειδικών επισχετικοτήτων. Ένας άλλος παράγοντας διαφοροποίησης μεταξύ επισχετικών εδαφών, είναι η διάρκεια δραστικότητας των κατασταλτικών μηχανισμών.

Διακρίνονται δύο κατηγορίες: επισχετικά εδάφη μεγάλης διάρκειας και επισχετικά εδάφη μειωμένης διάρκειας.

Η πρώτη κατηγορία αναφέρεται σε βιολογικές φυσικές καταστάσεις που συνδέονται με αυτογενείς κατασταλτικούς παράγοντες άγνωστης συχνά προέλευσης, και εμφανίζεται κυρίως απουσία φυτών. Τα εδάφη μειωμένης διάρκειας επισχετικότητας δημιουργούνται με προσθήκη αντιβιοτικών, υπολείμματα μονοκαλλιεργειών κ.α.(Weller et al ,2002)

Η ύπαρξη επισχετικών προς το *Fusarium* εδαφών είναι γνωστή πάνω από πενήντα χρόνια (προστασία καλλιεργειών μπανάνας και μπαμπακιού).(Nelson 1981)

Οι εκτεταμένες έρευνες για επισχετικά στο *Fusarium* εδάφη, έδωσαν την εικόνα πως διάφοροι μικροοργανισμοί-μηχανισμοί λαμβάνουν μέρος στη διαδικασία. Σ' αυτά τα εδάφη η φυσική επισχετικότητα ενισχύεται με τη μείωση της σαπροφυτικής ανάπτυξης και την αναστολή της δημιουργίας χλαμυδοσποριών του *Fusarium*. Η επισχετικότητα αυτή συχνά αποδίδεται στην ύπαρξη μη παθογόνων στελεχών του *Fusarium* που δρουν ανταγωνιστικά ή εισάγουν παράγοντα ανθεκτικότητας στους ξενιστές. (Weller et al ,2002)

### **1.3 COMPOST**

Το compost είναι φυτόχωμα οργανικής προελεύσεως το οποίο έχει υποστεί μια αυτογενή ή ετερογενή διαδικασία αποδόμησης των μητρικών υλικών. Είναι υποστρώματα υψηλής θρεπτικής αξίας, πλούσια σε μικροοργανισμούς και βιοχημικούς ενεργοποιητές και πολλά βελτιωτικά κολλοειδή που χαρακτηρίζουν την ποιότητα της δομής.(Hoitnik ,1986)

Η εκμετάλλευση του compost στη γεωργία και ειδικότερα στις κηπευτικές καλλιέργειες ως λίπασμα είναι καλά γνωστή από δεκαετίες.

Ο βασικός λόγος χρήσης είναι ο εμπλουτισμός του υποστρώματος με οργανική ουσία. Οι θετικές επιδράσεις είναι πολλές και συχνά ορατές. Φανερή είναι η βελτίωση της δομής, του πορώδους, της υδατοϊκανότητας, της αγωγιμότητας, της

ρυθμιστικής ικανότητας του pH, αύξηση της αποσθρωτικής ικανότητας κ.α. Επιπλέον, το έδαφος εμπλουτίζεται με μικροοργανισμούς, οι οποίοι αφενός βοηθούν στην αποδόμηση της οργανικής ουσίας και μετατροπής της σε άμεσα αφομοιώσιμες μορφές τροφής για το φυτό, αφετέρου δημιουργούν συνθήκες ανταγωνισμού μεταξύ των μικροοργανισμών, τόσο των παθογόνων όσο και άλλων. Ο ανταγωνισμός μπορεί να είναι τροφικός ή παρασιτικός.(N. Σιδηράς 1997)

**Η παρασκευή compost** προϋποθέτει ορισμένες γνώσεις, καθώς η ποιότητά του εξαρτάται κυρίως από το είδος και την ποιότητα των πρώτων υλών αλλά και των συνθηκών που επικρατούν κατά τη διάρκεια της κομποστοποίησης.

Οργανικά υπολείμματα φυτικής και ζωικής προέλευσης περιέχουν αξιοποιήσιμες ποσότητες θρεπτικών στοιχείων και μεγάλη ποικιλία μικροοργανισμών που μπορούν να οδηγήσουν σε ένα ισορροπημένο περιβάλλον ριζικής ανάπτυξης και εν γένει παραγωγής.

Η κομποστοποίηση είναι η διαδικασία της αερόβιας αποδόμησης των οργανικών υπολειμμάτων και η μετατροπή τους σε χούμο, σε ουσίες σχετικά σταθερές καθώς επίσης και στο σχηματισμό αργιλλοχουμικών συμπλόκων.

Για μια καλή κομποστοποίηση παίζουν ρόλο παράγοντες όπως, πρώτη ύλη, υγρασία, οξυγόνο, θερμοκρασία & pH.

Για να αποδομηθούν τα υπολείμματα πρέπει να έχουν κατάλληλη περιεκτικότητα σε Άζωτο (N) και Άνθρακα (C) ώστε να ευνοούν τον πολλαπλασιασμό και την αύξηση των μικροοργανισμών, όπως και τις δραστηριότητες που εμπλέκονται στη διαδικασία αυτή. Η σχέση C/N ρυθμίζονται με διάφορες προσθήκες, αναλόγως της προέλευσης των υπολειμμάτων.

Θρεπτικά και δομικά το compost προκύπτει από το περιεχόμενο των κυττάρων (πρωτεΐνες, σάκχαρα κ.α.), τις θρεπτικές ουσίες που έχουν αποθησαυριστή σε διάφορα όργανα και ιστούς (υδατάνθρακες, λίπη, φυτικά έλαια κ.α.) και κυρίως από τα κυτταρικά τοιχώματα της πρώτης ύλης.

Ειδικά το τελευταίο είναι στην ουσία το μητρικό υλικό της οργανικής ουσίας του εδάφους και αποτελείται από κυτταρίνη, ημικυτταρίνη, πηκτινικές ενώσεις και λιγνίνη.

Αποτέλεσμα αυτών των θρεπτικών και δομικών παραγόντων είναι η δημιουργία του χούμου και λοιπών μικροβιακών /ζωικών παραγόντων που προκύπτουν, όπως ουσίες άμεσα αξιοποιήσιμες (growth factors), αλλά και αντιβιοτικών μικροβιακής

προέλευσης που προωθούν ή ανακόπτουν την ανάπτυξη διαφόρων παθογόνων ή μη μικροοργανισμών. (Ν. Σιδηράς 1997)

Πριν το πείραμα μελετήθηκαν διάφοροι τύποι compost, παρασκευασμένοι από πρώτες ύλες οι οποίες παράγονται σε μεγάλο βαθμό στο νομό Μεσσηνίας. Τέτοια είναι τα ελαιόφυλα, το ελαιοπυρηνόξυλο, ελαιοπυρήνας ακατέργαστος, τσάμπουρο (στέμφυλα), κατσίγαρος (υγρά απόβλητα ελαιοτριβείων) και υπολείμματα καλλιεργειών μανιταριών του γένους *Agaricus*. Με κριτήριο τη δυνατότητα θρέψης, αλλά και ανάσχεσης κάποιων παθογόνων εδάφους (*Phytophthora*, *Fusarium*), καταλήξαμε να χρησιμοποιήσουμε για αυτό το πείραμα, compost που αποτελείτο από 50% τύρφη, 25% τσάμπουρο και 25% πυρηνόξυλο. Η επιλογή των υλικών έγινε με την βοήθεια πειραμάτων που είχαν προηγηθεί και τα οποία ανέδειξαν το συγκεκριμένο μίγμα ως το καλύτερο, τόσο θρεπτικά, όσο και επισχετικά. (Νιουγιάς et al, 2003)

Η Μεσσηνία είναι μια περιοχή που χαρακτηρίζεται από δύο βασικές αγροτικές δραστηριότητες, την ελαιοκομία και την αμπελοκομία. Οι δυο αυτές δραστηριότητες αποδίδουν σημαντικές ποσότητες οργανικών υπολειμμάτων όπως ελαιόφυλλα, πυρήνας, πυρηνόξυλο, κατσίγαρος, στέμφυλα και οινολάσπες. Όλα αυτά τα υπολείμματα χρησιμοποιούνται παραδοσιακά κυρίως για τη θρεπτική και εδαφοβελτιωτική αξία χωρίς να έχει γίνει εκτίμηση της φυτοπροστατευτικής τους αξίας ως επισχετικά υποστρώματα.

## 1.4 Ο ΜΥΚΗΤΑΣ *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis lycopersici* (FORL)

### 1.4.1. Ταξινόμηση (κατά Hawksworth et al., 1983):

<b>ΒΑΣΙΛΕΙΟ</b>	: Μύκητες - Fungi
<b>ΔΙΑΙΡΕΣΗ</b>	: Ευμύκητες – Eumycota (θαλλός Νηματοειδής με ή χωρίς septa)
<b>ΥΠΟΔΙΑΙΡΕΣΗ</b>	: Δευτερομύκητες ή Ατελείς ή Αδηλομύκητες – Deuteromycotina
<b>ΚΛΑΣΗ</b>	: Υφομύκητες - Hyphomycetes
<b>ΤΑΞΗ</b>	: Tuberculariales (Τα κονίδια παράγονται σε σποριοδόχεια)
<b>ΟΜΑΔΑ ΓΕΝΩΝ</b>	: Hyalophragmiae
<b>ΓΕΝΟΣ</b>	: <i>Fusarium</i>

Στην υποδιαίρεση των Δευτερομυκήτων, ανήκουν πολλά επιζήμια παθογόνα όπως η *Phoma sp.*, *Septoria sp.*, *Gloeosporium olivarum*, *Coryneum sp.*, *Monilia sp.*, *Botritis sp.*, *Fusicladium sp.*, *Alternaria sp.* και άλλα πολλά δυσεξόντοτα παθογόνα.

Γενικά το γένος *Fusarium*, προσβάλλει διάφορες καλλιέργειες και κυρίως κηπευτικά, προκαλώντας ασθένειες όπως αδρομυκώσεις και ξηρές σήψεις.(Λαχανοκομία, Κ.Γ. Δημητράκης, 1998)

Η αναγνώριση της φυλής (formae speciales) (Jarvis & Shoemaker ,1978 . Brayford ,1996) είναι συχνά προβληματική λόγω της μεγάλης ποικιλίας μορφολογικών και μη χαρακτηριστικών αλλά και της παθογένειας. Αρχικά έγινε απόπειρα για ταξινόμηση με κριτήριο τον ξενιστή, αφού πιστευόταν ότι σε αυτό διαφέρουν. Αποδείχθηκε όμως ότι αρκετές φυλές και ιδιαίτερα το FORL παρασιτούσαν μεγάλο φάσμα ξενιστών όπως *Vicia faba L.*, *Trifolium repens L.*, *Phaseolus vulgaris L.*(Menzies et.al. 1990).

Η θερμοκρασίες αέρα και εδάφους έχουν μεγάλη σημασία για την επιβίωση και εξάπλωση του μύκητα. Οι θερμοκρασίες αυτές δεν πρέπει να πέφτουν κάτω από 26-28 °C για το απλό στέλεχος *Fusarium oxysporum lycopersici* (FOL) σε αντίθεση με το στέλεχος (FORL) το οποίο αναπτύσσεται καλύτερα στους 18°C (Jarvis ,1988). Ωστόσο το παθογόνο ευδοκμεί σε μεγάλη ποικιλία τιμών pH, καθώς έχει εντοπιστεί σε πολλούς διαφορετικούς τύπους εδαφών.

Οι επαναλαμβανόμενες καλλιέργειες τομάτας στο ίδιο έδαφος είναι επίσης ένας παράγοντας που ευνοεί την ανάπτυξη του παθογόνου. Ιδιαίτερα σε χώματα που έχουν υποστεί απολυμάνσεις η διάδοση της ασθένειας μπορεί να γίνει ταχύτατα, αφού απουσιάζει το φαινόμενο του βιοελέγχου. Μολυσμένο πολλαπλασιαστικό υλικό ή νερό άρδευσης μπορούν να συνεισφέρουν στην εξάπλωση της ασθένειας. Επιπλέον είναι δυνατή η εξάπλωση της ασθένειας με μεταφορά κονιδίων δια του αέρα. (Λαχανοκομία, Κ.Γ. Δημητράκης, 1998).

#### **1.4.2.Συμπτώματα**

Σε πολύ νεαρά φυτά που αναπτύσσονται σε αποστειρωμένα και επαναπροσβεβλημένα εδάφη η νέκρωση τους επέρχεται πολύ σύντομα (Jarvis ,1988). Σε φυτά που μπαίνουν στην καρποφορία, εμφανίζεται μάρανση η οποία δείχνει συχνά

να ανακόπτεται τις νύχτες και της ημέρες με συνεφιά. Ωστόσο, και σε αυτή την περίπτωση ο θάνατος των φυτών είναι προδιαγεγραμμένος.

Τέλος, σε ώριμες καλλιέργειες παρατηρείται καφέ σήψη του λαιμού στο ύψος της επιφάνειας του εδάφους, και καφέ μεταχρωματισμοί στα αγγεία μέχρι και 25cm από το έδαφος. Μάρανση φύλλων, άχρωμοι μαλακοί καρποί συνθέτουν την τελική εικόνα.(Menzies & Jarvis ,1994)

## **1.5 ΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ GUS-A**

Στο παθογόνο FORI, έχει γίνει εισαγωγή του γονιδίου uidA από το βακτήριο *Escherichia coli* (N. Καβρουλάκης & I. Αγγέλου, υπό δημοσίευση). Το uidA λέγεται και γονίδιο αναφοράς (reporter gene) ή GUS και κωδικοποιεί το ένζυμο β-γλουκουρονεδάση που είναι μια υδρολάση, η οποία καταλύει τη διάσπαση μεγάλου αριθμού γλουκουρονιδίων, πολλά από τα οποία χρησιμοποιούνται ως φασματομετρικά και φλουορομετρικά υποστρώματα. (Oliver et al. 1993)

Το ένζυμο αυτό έχει πλεονεκτήματα όπως η σταθερότητα του, η ευρεία λειτουργικότητα σε ποικιλία τιμών pH και το ότι δεν υπάρχει σε φυτά και μύκητες, οπότε και δεν έχουμε λάθη από την ενδογενή ύπαρξη του ενζύμου στο δείγμα. Είναι ευαίσθητο σε ασθενείς μεταλλικά ιόντα όπως  $Cu^{2+}$  και  $Zn$  και γι' αυτό χρησιμοποιείται πάντα με EDTA.

Η ανίχνευσή του επιπλέον είναι εύκολη και αρκετά φερέγγυα με τη χρήση φθοριομέτρου (fluorometric assays) με υπόστρωμα 4-methyl umbelliferyl β-D-glucuronide (MUG) ή ιστοχημικά με υπόστρωμα 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-glucuronide (X-Gluc). Οι πληροφορίες που δίνει το γονίδιο δείκτης αφορούν ποιοτικές και ποσοτικές αναλύσεις βιομάζας των οργανισμών που περιέχουν το δείκτη. Το γονίδιο GUS έχει χρησιμοποιηθεί εκτεταμένα στη γενετική τροποποίηση μυκήτων. Ο μετασχηματισμός παθογενών μυκήτων με το γονίδιο αυτό έχει επιτρέψει την παρακολούθηση της εξάπλωσης του μύκητα στους φυτικούς ιστούς των ξενιστών (Green, Helge & Jensen ,1995 .Oliver et al ,1993), μετρήσεις μυκηλιακής βιομάζας και μυκηλιακής δραστηριότητας .(Coutududier et al 1993) Kamoun et al 1998), αναγνώριση ανθεκτικών γενοτύπων και προσδιορισμός επιπέδων ανθεκτικότητας (Kamoun et al 1998)

Στο μετασηματισμένο στέλεχος FORL (F30) που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία είναι δυνατή η ανίχνευση του μύκητα ιστοχημικά τόσο σε περιβαλλοντικά δείγματα, όσο και εντός του ξενιστή. Επιπλέον έχουν προκύψει αποτελέσματα για τη σχέση μυκηλιακής βιομάζας και της ενζυμικής δραστηριότητας της β-γλουκουρονιδάσης. Η συσχέτιση είναι θετική όσο έχουμε εκθετική αύξηση του μικυλίου. Μετά –όταν σταματήσει η αύξηση του μυκηλίου –παρατηρείται μείωση της ενζυμικής δράσης.

## 2. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.1 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ COMPOST

Για την Παρασκευή του compost του πειράματος χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω υλικά με τον αντίστοιχο εξοπλισμό

Πρώτες ύλες	Εξοπλισμός	Χρόνος & επεμβάσεις
<ul style="list-style-type: none"><li>- 50% υπολείμματα οиноποίησης (στέμφυλα) GMW</li><li>- 50% υπολείμματα ελαιοποίησης (πυρηνόξυλο) OPC</li><li>- 2% CaCO<sub>3</sub></li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>- Κάδος κομποστοποίησης</li><li>- Εργαλεία ανάδευσης (σκαλιστήρια, γράβαλα κ.α.)</li><li>- Θερμόμετρο</li><li>- Νάilon καλύμματα για προστασία του υλικού από ακραίες καιρικές συνθήκες</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>- Συνολικός χρόνος: 9 εβδομάδες</li><li>- Αριθμός αναμοχλεύσεων: 3-4</li><li>- Κριτήριο εφαρμογής αναμοχλεύσεων: κάθε φορά που η θερμοκρασία του σωρού ξεπερνά τους 50-60 °C.</li></ul>

Πρώτη ενέργεια για την παρασκευή compost ήταν η συλλογή των πρώτων υλών. Τόσο τα τσάμπουρα, όσο και το πυρηνόξυλο συλλέχθηκαν από αγροβιομηχανικές μονάδες της περιοχής της Καλαμάτας. Η εύρεση, αλλά και η επιλογή των υλικών ήταν εύκολη, αφού αυτού του τύπου μονάδες αφθονούν σε όλη την περιφέρεια της Μεσσηνίας.

Έπειτα κατασκευάστηκαν κάδοι κομποστοποίησης, ως ξύλινοι κύβοι ακμής μισού μέτρου. Τα ξύλινα στοιχεία τοποθετήθηκαν έτσι ώστε να αφήνουν κενά για τον αερισμό των υλικών. Αυτά τα κενά καλύφθηκαν από σίτα για να μην χύνονται τα υλικά, αλλά και για την προστασία από τρωκτικά, έντομα και πουλιά.

Το κάθε υλικό κομποστοποιήθηκε ξεχωριστά με την ανάμειξη να ακολουθεί μετά το τέλος της διαδικασίας.

Η διαδικασία χρειάστηκε γύρω στις 9 εβδομάδες μέχρι να σταθεροποιηθούν τα υλικά. Στο μεταξύ ελεγχόταν καθημερινά η θερμοκρασίες και η υγρασία των υλικών. Διορθωτικές ενέργειες με διαβροχές, αναμοχλεύσεις και προσθήκες CaCO<sub>3</sub> ήταν επαναλαμβανόμενες ανάλογα με την πορεία της κομποστοποίησης. Έτσι, μέχρι τη



σταθεροποίηση των οργανικών υλικών και των διεργασιών αποδόμισης μεσολάβησαν :5-6 διαβροχές, 6-7 αναμοχλεύσεις και τουλάχιστον μια προσθήκη CaCO<sub>3</sub> σε αναλογία 2% επί του όγκου των υλικών. Οι διαβροχές πραγματοποιούνταν όταν το υλικό ξεραινόταν, ενώ οι αναμοχλεύσεις ήταν αναγκαίες κάθε φορά που οι θερμοκρασίες στο κέντρο των σωρών ξεπέραναν τους 50 °C.

Μετά τη διέλευση του απαιτούμενου χρόνου, τα υλικά εξήλθαν από τους κάδους και απλώθηκαν για να χάσουν την όποια περισσευούμενη υγρασία. Αυτό έγινε για να ακολουθήσει μίξη των υλικών κατά βάρος.

Τα μίγματα που παρασκευάστηκαν ήταν :

α) 25% στέμφυλα, 25% πυρηνόξυλο, 48% τύρφη, 2% CaCO<sub>3</sub>.

β) 98% τύρφη, 2% CaCO<sub>3</sub> για τους μάρτυρες του πειράματος.

Τα υλικά μετά την ανάμιξη τους και αφού τοποθετήθηκαν σε γλάστρες (54 γλαστράκια χωρητικότητας 300ml) τα διαβρέξαμε καλά με νερό ώστε να είναι έτοιμα να δεχθούν τους σπόρους χωρίς να ξεχειλίζουν κάθε φορά που θα δέχονταν πότισμα.

## 2.2 ΣΠΟΡΑ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ ΤΟΜΑΤΑΣ

Τα υποστρώματα ανάπτυξης των φυτών (τύρφη και compost 50%) τοποθετήθηκαν σε γλαστράκια χωρητικότητας 300ml αφού προηγουμένως τα διαβρέξαμε καλά.

Ακολούθησε φύτευση σπόρων τομάτας (ποικιλίας ACE) σε μικρό βάθος (όσο η διάμετρος των σπόρων). Φυτεύτηκαν 5 σπόροι ανά γλάστρα σε 33 γλάστρες με 50% compost και 50% τύρφη. Η παραπάνω διαδικασία επαναλήφθηκε και για τον ίδιο αριθμό γλαστρών που αυτή τη φορά είχαν μόνο τύρφη (control). Προστέθηκε CaCO<sub>3</sub> σε ποσοστό 2% για την διόρθωση του pH. Πριν από τη φύτευση έγινε λίπανση με σύνθετο υδατοδιαλυτό λίπασμα 20-20-20 σε ποσότητα 3gr/γλάστρα διαλυμένο σε 20ml απιονισμένο νερό.

	Τύρφη	Compost	CaCO <sub>3</sub>	Γλάστρες	Σπόροι
Μάρτυρες	100%	-	2%	300ml/27τμχ.	5/γλάστρα
Επέμβαση I	50%	50%	2%	300ml/27τμχ.	ποικ. ACE
Βασική λίπανση	Σύνθετο λίπασμα 20-20-20				

Σύνθεση υποστρώματος ανάπτυξης των φυτών

## 2.3 ΜΕΣΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΩΝ ΦΥΤΑΡΙΩΝ

Η λίπανση των φυτών γινόταν με τα ακόλουθα διαλύματα:

<b>Βασικό θρεπτικό διάλυμα (περιεκτικότητα ενός λίτρου.)</b>	
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.5g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.27g
KNO <sub>3</sub>	0.2g
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.1g
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	0.5g [ή 0.7g Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O]
Fe EDTA	25mg (0.025g)
Διάλυμα ιχνοστοιχείων	0.15ml (150λ)
Απιονισμένο νερό	Μέχρι συμπλήρωσης 1 λίτρου
<b>Διάλυμα ιχνοστοιχείων ( περιεκτικότητα σε 450ml)</b>	
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	7.5g
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	6.75g
CuCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.37g
MoO <sub>3</sub>	0.15g
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1.18g
<b>Άρδευση</b>	
Απιονισμένο νερό	Καθημερινά γύρω στα 20 ml.

Μετά από 4-5 ημέρες σχεδόν όλοι οι σπόροι είχαν βλαστήσει οπότε ξεκίνησε και αγωγή λίπανσης που πραγματοποιήθηκε 3 φορές με ειδικό θρεπτικό διάλυμα που χρησιμοποιείται σε καλλιέργειες υδροπονίας.

Το πότισμα γινόταν με μίγμα 1/1 απιονισμένου νερού και νερού βρύσης. Η ανάπτυξη των φυτών έλαβε χώρα σε ειδικό θάλαμο στους 20°C με 16 ώρες φως και 8 ώρες σκοτάδι την ημέρα. Τέλος πρέπει να αναφερθούν μέτρα που πάρθηκαν για την αποφυγή επιμολύνσεων, όπως ερμητικό κλείσιμο του θαλάμου, φιλτράρισμα του αέρα που πέρναγε από το κλιματιστικό μηχάνημα, καθαρισμός υποδημάτων του προσωπικού με διάλυμα χλωρίνης 20%, και αποστείρωση όλου του εξοπλισμού που χρησιμοποιήθηκε για δειγματοληψίες και λοιπές εργασίες.

## 2.4 ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΤΟΥ FORL

**α) Για καλλιέργεια του FORL** (Dhingram O.D & Sinclair J.B. –editors: Basic Plant Pathology Methods. CRC Press Inc, USA)

PDB 1lt	
Πατάτα	400gr
Sucrose	20gr
CaCO <sub>3</sub>	Ρύθμιση pH στο 6.5
H <sub>2</sub> O απιοντισμένο.	Συμπλήρωση ως 1 lt.

Υγρό PDB εμβολιαζόταν με τμήμα στερεής καλλιέργειας FORL. Ακολουθούσε επώαση με ανάδευση 150 στρ./min στους 25°C για τέσσερις ημέρες. Τα σπόρια λαμβάνονταν με διήθηση της καλλιέργειας μέσα από τολουπάνι.

**β) Για απομόνωση του FORL από εδαφικά διαλύματα** (Dhingram O.D & Sinclair J.B. –editors: Basic Plant Pathology Methods. CRC Press Inc, USA)

Τα εδαφικά δείγματα που συλλέχθηκαν προορίζονταν για μετρήσεις ενζυμικής δραστηριότητας με φθορίμετρο, μέθοδο αρκετά καινούργια της οποίας τη φερεγγυότητα έπρεπε με κάποιο τρόπο να διασφαλίσουμε. Γι' αυτό λοιπόν χρησιμοποιήθηκε μέθοδος επιλεκτικής απομόνωσης του FORL από εδαφικά δείγματα σε εκλεκτικό υπόστρωμα, το οποίο επιτρέπει μόνο την ανάπτυξη του FORL (αν αυτό έχει αναπτυχθεί). Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στη χρήση αντιβιοτικών ή βακτηριοστατικών όπως η στρεπτομυκίνη και σε εξειδικευμένες πηγές θρεπτικών στοιχείων που ευνοούν μόνο την ανάπτυξη του FORL και όχι άλλων μικροοργανισμού που μπορεί να υπάρχουν στο δείγμα, και ιδιαίτερα στο εδαφικό.

Η σύνθεση του εκλεκτικού υποστρώματος ήταν η ακόλουθη:

SELECTIVE MEDIUM	
L-asparagine	2gr
MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	0.5gr
KCl	0.5gr
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1gr
Fe (EDTA)	0.5mg

Quintozene	1gr
Oxygall	0.5gr
Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> *10H <sub>2</sub> O	1gr
D-galactose	20gr
AGAR	20gr
Αποστείρωση για 20 min στους 120 °C	
Streptomycin	300mg
Αραιό διάλυμα HCl	Διόρθωση του pH στο 3,8-4
Ορός (υδατικό διάλυμα 0,85%NaCl)	

Το εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα, αφού παρασκευάστηκε, αποστειρώθηκε σε αυτόκαυστο στους 120°C για 20min και διανεμήθηκε προς στερεοποίηση σε τριβλία των 30ml.

## 2.5 ΛΟΙΠΑ ΥΛΙΚΑ – ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Είδος	Χρήση	Χαρακτηριστικά
Υγρό άζωτο.	Θραύση κυτάρων.	-80°C
Μόλυσμα FORL.	Εμβολιασμός PDB για παρασκευή μολυσματικού υλικού.	Στερεή καλλιέργεια που προπαρασκευάστηκε από το επιστημονικό προσωπικό του ιδρύματος. Ποσότητα :κομμάτι διαμέτρου 1cm.
Ρυθμιστικό διάλυμα AB	Δοκιμή για σταντάρισμα φλορίμετρου	50mM Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (ph :7), 10mM Na <sub>2</sub> EDTA (ph:8), 0.1%(w/v) N-lauroylsacrosyl, 1%(v/v) Triton X-100, 0.07% β-μερκαπτοαιθανόλη.
Ρυθμιστικό διάλυμα MUG	Δοκιμή GUS	Όπως το AB με προσθήκη 1-2 mM 4-methyl-umbelliferyl-glucuronide

Διάλυμα Bradford stock		100mg χρωστικής Coomassie blue G250, 100ml H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (85%), 50ml μεθανόλη, 50 ml ddH <sub>2</sub> O
Ρυθμιστικό διάλυμα δοκιμής		50mM Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (ph:7), 10mM Na <sub>2</sub> EDTA(ph:8), 0.1%(w/v) N-lauroyl-sacrosyl, 1%(v/v)Triton X-100, 0.07% β-μερκαπτοαιθανόλη
MU	Μέτρηση ενζυμικής δραστηριότητας	MUG + Extract =>MU

### 2.5.1 Δειγματοληψία - Προετοιμασία δειγμάτων

Οι δειγματοληψίες ξεκίνησαν την επομένη του εμβολιασμού και επαναλαμβάνονταν ανά τακτά διαστήματα. Δείγματα υποστρωμάτων λαμβάνονταν και από τις δυο επεμβάσεις σε τρεις επαναλήψεις. Από τις δύο επεμβάσεις (α. τύρφη 100% και β. τύρφη 50%+κομπόστ 50%) λαμβάνονταν έξη δείγματα κάθε δύο περίπου ημέρες. Αυτό σημαίνει ότι ελήφθησαν 54 δείγματα σε 18 ημέρες από την μόλυνση των φυτών, τα οποία φυλάχτηκαν σε πλαστικούς σωλήνες Falcons των 50ml μέχρι το τέλος της δειγματοληψίας, οπότε άρχισε και η επεξεργασία και προετοιμασία τους για μετρήσεις. Το κάθε δείγμα χωριζόταν σε δυο μέρη από τα οποία το ένα φυλασσόταν στους -80°C και το άλλο χρησιμοποιούνταν στις διαδοχικές αραιώσεις. Πριν από κάθε δειγματοληψία το κάθε γλαστράκι ζυγιζόταν για τον προσδιορισμό του ειδικού του βάρους το οποίο στην συνέχεια θα συνοπολογιζόταν στις μετρήσεις που θα ακολουθούσαν.

Από κάθε δείγμα ζυγίστηκαν 3gr τα οποία αραιώθηκαν με 100ml ορού. Από το αιώρημα που προέκυψε λάβαμε 1ml το οποίο αραιώθηκε : α)σε 9ml ορού και β) σε 99ml ορού. Τελικά καταλήξαμε σε διάλυμα 10ml συγκέντρωσης  $C_a=10^{-3}$  και σε διάλυμα 100ml συγκέντρωσης  $C_b=10^{-4}$ . Από το κάθε διάλυμα πήραμε 1ml με το οποίο εμβολιάσαμε το τριβλίο.

Αυτή η διαδικασία έγινε τόσες φορές όσος ο αριθμός των δειγμάτων. Το κάθε τριβλίο αντιστοιχούσε σε ένα δείγμα συγκεκριμένης επέμβασης, χρόνου και συγκέντρωσης του δείγματος (εικ. 2).

Τα μολυσμένα τριβλία καλύφθηκαν με ζελατίνα προς αποφυγή επιμολύνσεων και τοποθετήθηκαν στους 25°C ώστε να γίνει η επώαση.

Η διαδικασία εμβολιασμού των τριβλίων, καθώς και οι αραιώσεις έγιναν στο θάλαμο νηματικής ροής, ενώ όλα τα σκεύη που χρησιμοποιήθηκαν είχαν αποστειρωθεί προηγουμένως.

Μια βασική εργασία που πρέπει να γίνει στα δείγματα πριν από οποιαδήποτε επεξεργασία και μέτρηση, είναι η τριβή, θραύση των υφών και ομογενοποίηση τους. Αυτή η εργασία γίνεται με σπάσιμο σε πορσελάνινο γουδί με υγρό άζωτο -80 °C. Η διαδικασία διαρκεί ώσπου το δείγμα να γίνει σαν σκόνη. Πριν και μετά την κατεργασία στο γουδί, τα δείγματα φυλάσσονται στους -80 °C.

## 2.5.2 Προετοιμασία μολυσματικού υλικού από προϋπάρχουσα καλλιέργεια FORL

Η συγκέντρωση των спорίων προσδιορίζονταν με τη χρήση αιματοκυττόμετρου και τη μέτρησή τους πάνω στα ειδικά τετράγωνα που είναι χαραγμένα πάνω σε αυτό. Οι μετρήσεις των спорίων πάνω στο αιματοκυττόμετρο γίνονταν με μικροσκόπιο.

Η συγκέντρωση των спорίων στο διηθήμα προκύπτει από τον τύπο:

$$a \times 4 \times 25 \times 10^4 \times \text{dilouision factor} = \text{σπόρια/ml}$$

όπου

a: μέσος όρος спорίων ανά τετράγωνο του αιματοκυττομέτρου

dilouision factor: συντελεστής αραιώσης του διηθήματος.

Οι αραιώσεις του διηθήματος γίνονταν σε διάλυμα 0,85% NaCl.

Η τελική συγκέντρωση των спорίων του FORL στο υπόστρωμα ανάπτυξης των φυτών ήταν  $10^5$  σπόρια /cm<sup>3</sup>.

Ο εμβολιασμός πραγματοποιήθηκε με διάχυση του μολύσματος με προχοϊδες (σιφόνι) των 10ml και συνοδεύεται από ελαφρό πότισμα στην περίπτωση που το μολυσματικό υλικό δεν αρκεί για την καλή διαβροχή του ριζοστρώματος.

### 2.5.3 Μετρήσεις εμζυμικής δραστηριότητας με φασματοφωτόμετρο φθορισμού (κατά Κοσμά)

#### α) Δημιουργία πρότυπης καμπύλης αναφοράς MU.

1. Ζυγίζουμε 19,82 gr.MU (4-Methylumbelliferone), (Sodium salt, Sigma M1508) για την παραγωγή 1ml συγκέντρωσης 100mM. Το διάλυμα αυτό μπορεί να διατηρηθεί στους 4°C για ένα περίπου μήνα. Εάν παρατηρηθεί καθίζηση επιβάλλεται η αλλαγή του.
2. 50 μl αυτού του διαλύματος (100mM) προστίθενται σε 4950μl ρυθμιστικού διαλύματος τερματισμού (0,2 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>). Κατά αυτόν τον τρόπο δημιουργούμε ένα διάλυμα 1mM (10<sup>6</sup> nM).
3. Από το παραπάνω διάλυμα κάνουμε διαδοχικές αραιώσεις 1 nM, 10nM, 100nM, 10<sup>3</sup>nM, 2x10<sup>3</sup>nM, 10<sup>4</sup>nM και 10<sup>5</sup> ως εξής :
  - 500μl (10<sup>6</sup> nM) σε 4500 μl ρυθμιστικού διαλύματος τερματισμού (0.2M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>)=>10<sup>5</sup> nM.
  - 500μl (10<sup>5</sup> nM) σε 4500 μl ρυθμιστικού διαλύματος τερματισμού (0.2M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>)=>10<sup>4</sup> nM.
  - 500μl (10<sup>4</sup> nM) σε 4500 μl ρυθμιστικού διαλύματος τερματισμού (0.2M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>)=>10<sup>3</sup> nM.
  - 1000μl (10<sup>4</sup> nM) σε 4000 μl ρυθμιστικού διαλύματος τερματισμού (0.2M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>)=>2x10<sup>3</sup> nM.
  - 500 μl (10<sup>3</sup> nM) σε 4500 μl ρυθμιστικού διαλύματος τερματισμού (0.2M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>)=>10<sup>2</sup> nM.
  - 500 μl (10<sup>2</sup> nM) σε 4500 μl ρυθμιστικού διαλύματος τερματισμού (0.2M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>)=>10 nM.
  - 500 μl (10 nM) 4500 μl ρυθμιστικού διαλύματος τερματισμού (0.2M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>)=>1 nM.

Μετά από κάθε αραιώση ακολουθεί έντονη μίξη.

4. Ενεργοποιούμε τις εξής ρυθμίσεις στο φασματοφωτόμετρο φθορισμού: Excitation= 365nm, Emission= 445nm, Excitation Slit Width= 2.5, Emission Slit Width= 10, Emission filter= open or 1% attenuator, Excitation filter= clear (auto cutoff on).
5. Μετράμε όλα τα δείγματα συν το τυφλό (ρυθμιστικό διάλυμα τερματισμού 0.2M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>). Η καμπύλη που θα προκύψει πρέπει να είναι γραμμική. Αυτό συμβαίνει για όλα τα δείγματα μέχρι 2x10<sup>3</sup> nM. Στα 10<sup>5</sup> nM και 10<sup>4</sup> nM το όργανο βγαίνει εκτός ορίων μέτρησης.

**β) Μετρήσεις ενζυμικής δραστηριότητας δειγμάτων με φασματοφωτόμετρο φθορισμού.**

1. Ομογενοποιούμε το δείγμα σε φιαλίδιο erpendorf με 100 μl ρυθμιστικού διαλύματος AB.
2. Φυγοκεντρούμε τα δείγματα στις 13.000 στρ./min για ένα λεπτό.
3. Μεταφέρουμε το υπερκείμενο σε νέο φιαλίδιο erpendorf. Μέρος αυτού χρησιμοποιείται για τον ποσοτικό προσδιορισμό της δραστηριότητας του ενζύμου ενώ το υπόλοιπο φυλάσσεται στους -80°C.
4. Ετοιμάζουμε τέσσερα νέα φιαλίδια erpendorf στα οποία προσθέτουμε από 900 μl ρυθμιστικού διαλύματος τερματισμού (0.2M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>).
5. Σε ένα φιαλίδιο erpendorf αναμιγνύουμε 50 μl δείγματος μαζί με 500 μl ρυθμιστικού διαλύματος δοκιμής GUS (β- γλουκουρονιδάσης) (GAB).
6. Το φιαλίδιο τοποθετείται σε κλίβανο σταθερής θερμοκρασίας 37 °C.
7. Μετά από πάροδο 1 λεπτού αφαιρούμε από το δείγμα μια ποσότητα 100 μl, η οποία μεταφέρεται στο αριθμημένο φιαλίδιο No 1, που περιέχει 900 μl ρυθμιστικού διαλύματος τερματισμού.
8. Αναμιγνύουμε καλά και το τοποθετούμε πάνω στον πάγο.



9. Σε χρονικό διάστημα 6 λεπτών από την τοποθέτηση του δείγματος στους 37°C αφαιρούμε και πάλι μια ποσότητα 100μl η οποία μεταφέρεται στο φιαλίδιο No2. Αναμιγνύουμε καλά και τοποθετούμε το φιαλίδιο πάλι στον πάγο.
10. Η παραπάνω διαδικασία επαναλαμβάνεται σε χρονικό διάστημα 11 λεπτών (φιαλίδιο No 3) και 16 λεπτών (φιαλίδιο No 4). Το χρονικό διάστημα που θα επιλεγεί εξαρτάται από τη δραστηριότητα του ενζύμου. Για υψηλή δραστηριότητα επιλέγονται μικροί χρόνοι (1-10 λεπτά) ενώ για χαμηλή μεγάλοι χρόνοι (1-10 ώρες).
11. Μετά το πέρας των αντιδράσεων, η ενζυμική δραστηριότητα μπορεί να εκτιμηθεί ποιοτικά και σε κάποιο βαθμό ποσοτικά με έκθεση των φιαλιδίων erppendorf σε υπεριώδη ακτινοβολία.
12. Για την ποσοτική εκτίμηση της ενζυμικής δραστηριότητας ακολουθεί μέτρηση των δειγμάτων στο φασματοφωτόμετρο φθορισμού, με τις ίδιες ρυθμίσεις που πραγματοποιήθηκε η μέτρηση των γνωστών δειγμάτων για τη δημιουργία της πρότυπης καμπύλης αναφοράς MU. Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης της παραγόμενης MU γίνεται με βάση την πρότυπη καμπύλη αναφοράς. Η ενζυμική δραστηριότητα εκφράζεται σε pM/min/mg πρωτεΐνης.

#### **2.5.4 Μετρήσεις συγκεντρώσεων ολικών πρωτεϊνών (μέθοδος Bradford)**

##### **α) Δημιουργία πρότυπης καμπύλης αναφοράς BSA**

1. Σε σωλήνες erppendorf κάνουμε διαδοχικές αραιώσεις BSA 1, 2, 5, 10, 20 mg/ml.
2. Από αυτές τις αραιώσεις μεταφέρουμε ποσότητα 3-5 μl σε 900μl διαλύματος χρώσης Bradford.
3. Συμπληρώνουμε το δείγμα μέχρι τα 1000 μl με ddH<sub>2</sub>O.

4. Μετράμε την απορρόφηση των δειγμάτων σε φασματοφωτόμετρο στα 595 nm. Οι τιμές πρέπει να βρίσκονται εντός των ορίων διακριτικής ικανότητας της μεθόδου.
5. Με τη βοήθεια των τιμών των γνωστών δειγμάτων κατασκευάζουμε την πρότυπη καμπύλη αναφοράς BSA.

### β) Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνικών δειγμάτων

1. Τα δείγματα ομογενοποιούνται σε σωλήνες erpendorf με 100μl ρυθμιστικού διαλύματος AB.
2. Φυγοκεντρούμε τα δείγματα στις 13.000 στρ./min για ένα λεπτό.
3. Μεταφέρουμε το υπερκείμενο σε νέο erpendorf. Τα δείγματα μπορούν να διατηρηθούν στους  $-80^{\circ}\text{C}$ .
4. 3-5 μl από κάθε δείγμα αναμιγνύεται με 95 μl ddH<sub>2</sub>O και 900 μl διαλύματος χρώσης Bradford.
5. Η απορρόφηση μετράται σε φασματοφωτόμετρο στα 595 nm. Η συγκέντρωση των πρωτεϊνών προσδιορίζεται με τη βοήθεια της πρότυπης καμπύλης.

## 2.6 ΣΥΣΚΕΥΕΣ

Είδος	Χρήση	Τεχνικά χαρακτηριστικά
Αυτόκαυστο	Αποστείρωσεις όλων των σκευών, των θρεπτικών υποστρωμάτων αλλά και των υπολειμμάτων του πειράματος.	Δύο λειτουργίες: - $\theta=121^{\circ}\text{C}, P=2\text{Atm}$ $t=50\text{min}$ (σκεύη & σκουπίδια) - $\theta=120^{\circ}\text{C}, P=2\text{Atm}$ $t=20\text{min}$ (θρεπτικά υποστρώματα) (εικ. 5)
Ζυγός ακριβείας	Ζυγίσεις συστατικών υποστρωμάτων και δειγμάτων προς μέτρηση.	0,1- 100 gr.
Μικρομετρικές συσκευές όγκου υγρών	Αραίωση και προετοιμασία δειγμάτων, συλλογή υπερκείμενων υγρών.	Όγκοι των: 1ml και 0.5ml
Θάλαμος νηματικής ροής	Προετοιμασία θρεπτικών υποστρωμάτων και εμβολιασμοί αυτών.	Νηματική ροή και ακτινοβολία UV
Αναδευτήρας	Επώαση παθογόνου.	(εικ.4)
Φυγόκεντρος	Διαχωρισμός φάσεων (υγρής-στερεής) για λήψη υπερκείμενου υγρού	Έως 13.000στρ/min.

	κυτοπλάσματος.	
Καταψύκτης	Φύλαξη δειγμάτων μέχρι να συγκεντρωθούν όλα.	Θερμοκρασίες ως: -80°C
Φασματοφωτόμετρο φθορισμού (fluorometric assays).	Μετρήσεις ενζυμικής δραστηριότητας (GUS ACTIVITY)	(εικ. 7)
Μικροσκόπιο	Μέτρηση σπορίων	(εικ. 3)
Στήλη για παραγωγή απιονισμένου νερού.	*Παρασκευή διαλυμάτων και θρεπτικών υποστρωμάτων. *Αραιώσεις δειγμάτων. *Πότισμα φυτών.	(εικ. 6)

## 2.7 ΣΚΕΥΗ

Είδος	Χρήση	Χαρακτηριστικά
Κωνικές φιάλες.	*Παρασκευή θρεπτικών υποστρωμάτων. *Επώαση παθογόνου. *Φύλαξη εδαφικών δειγμάτων.	*1000ml *250ml *100ml
Ογκομετρικές φιάλες.	*Παρασκευή υποστρωμάτων.	*1000ml *250ml
Σιφόνια .	*Πότισμα-λίπανση φυτών. *Εμβολιασμός φυτών.	*20ml *10ml
Falcons.	*Φύλαξη δειγμάτων ιστών & εδάφους στους -80°C.	*50ml *15ml
Epedorfs.	*Χειρισμός κ φύλαξη δειγμάτων. *Χωρισμός φάσεων κυτοπλάσματος- στερεών.	*1.5ml
Γουδιά.	*Θραύση μυκηλιακών υφών.	*Πορσελάνινα 200-300ml.
Λαβίδες.	*Χειρισμός δειγμάτων.	*Ανοξείδωτες.
Νυστέρια.	*Λήψη δειγμάτων ιστών.	* Ανοξείδωτα.
Τριβλία.	*Επώαση παθογόνου σε υπόστρωμα selective medium.	*Πλαστικά αποστειρωμένα των 30ml.

## 2.8 ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΠΡΟΣΒΟΛΩΝ

Ταυτόχρονα με την δειγματοληψία εδάφους πραγματοποιήθηκε επιτόπια εκτίμηση της πορείας των προσβολών στις ρίζες των φυτών. Πρόκειται για μακροσκοπική παρατήρηση η οποία έγινε με βάση το ποσοστό προσβεβλημένων ριζών ανά φυτό. Χωρίσαμε τους βαθμούς προσβολής σε πέντε κατηγορίες με βάση το ποσοστό προσβολής :0-1(<10%), -2(<30%), -3(<50%), -4(<80%), -5(>90%).

### **3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**

#### **3.1 ΜΑΚΡΟΣΚΟΠΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ**

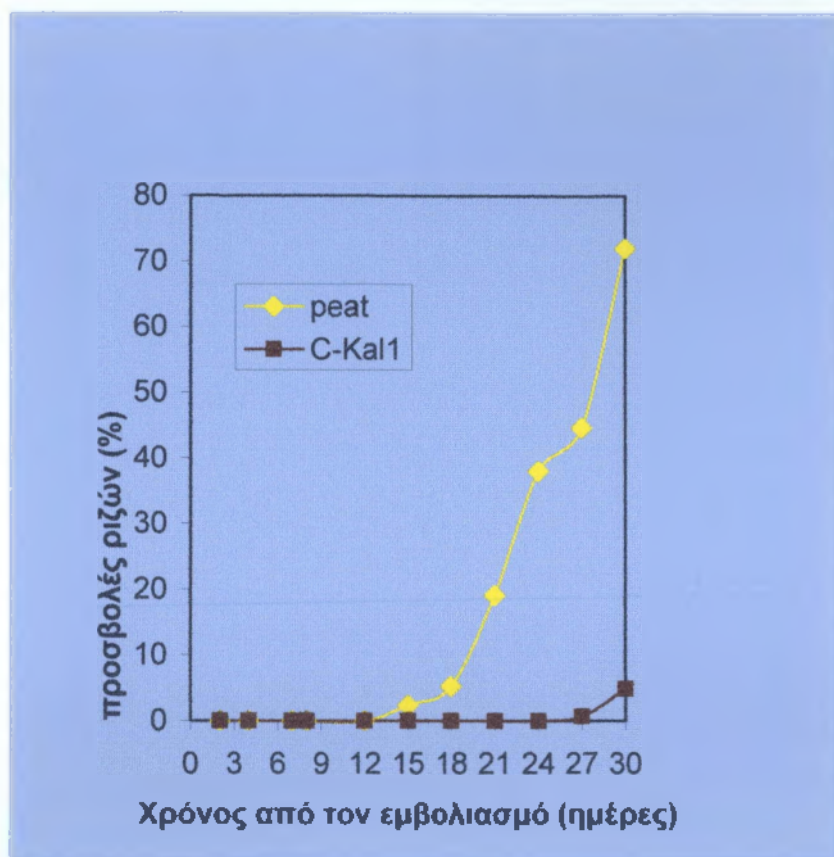
Τρεις μέρες μετά τη σπορά είχαν βλαστήσει σχεδόν όλοι οι σπόροι. Με το κατάλληλο πότισμα και λίπανση, μετά από 10 ημέρες είχαν όλα τα φυτά εμφανίσει το πρώτο πραγματικό φύλλο, οπότε ήταν έτοιμα για να μολυνθούν.

Σε μικρό χρονικό διάστημα μετά τη μόλυνση λάβαμε μακροσκοπικές ενδείξεις για την ύπαρξη κάποιας μορφής κατασταλτικότητας του compost επί του FORL, σε σχέση με την τύρφη. Δηλαδή ενώ οι μάρτυρες στην τύρφη πέθαιναν ο ένας μετά τον άλλον, τα φυτά στο compost έδειχναν εντελώς υγιή και εύρωστα. Η διαφορά ήταν εμφανής όπως φαίνεται στις παρακάτω εικόνες 10&11 και ήταν αυτή που οδήγησε στην επιλογή του συγκεκριμένου compost για την έρευνα, σε προκαταρκτικά πειράματα επισχετικότητας που προηγήθηκαν. Έτσι κι αλλιώς θα ήταν πολύ δαπανηρό να γίνει η παρούσα έρευνα για όλα τα αγρό-βιομηχανικά διαθέσιμα υπολείμματα. Γι' αυτό οι μακροσκοπικές παρατηρήσεις βοήθησαν και προφανώς βοηθάνε στην εστίαση της προσοχής σε σημεία και υλικά της έρευνας που μας φέρνουν πιο κοντά σε χρήσιμα συμπεράσματα.

#### **3.2 ΠΟΣΟΣΤΟ ΠΡΟΣΒΟΛΗΣ**

Παράλληλα με την δειγματοληψία εδάφους πραγματοποιήθηκε επιτόπια εκτίμηση της πορείας των προσβολών στις ρίζες των φυτών. Πρόκειται για μακροσκοπική παρατήρηση η οποία έγινε με βάση το ποσοστό προσβεβλημένων ριζών ανά φυτό. Χωρίσαμε τους βαθμούς προσβολής σε πέντε κατηγορίες με βάση το ποσοστό προσβολής :0-1(<10%), -2(<30%), -3(<50%), -4(<80%), -5(>90%).

Από τις εκτιμήσεις (πίνακας 1) του βαθμού προσβολής ριζών ανά τις ημέρες, προέκυψε το παρακάτω γράφημα.



Σχήμα 1. Προσβολές από FORL σε φυτά τομάτας ανεπτυγμένα σε τύρφη και compost

Από τις πρώτες κιόλας μέρες μετά τη μόλυνση λάβαμε μακροσκοπικές ενδείξεις για την ύπαρξη κάποιας μορφής κατασταλτικότητας του compost επί του FORL, σε σχέση με την τύρφη. Παρατηρήθηκε δηλαδή μεταχρωματισμός των ριζών στα φυτά που μεγάλωναν στην τύρφη (μάρτυρες) σε αντίθεση με αυτά του compost.

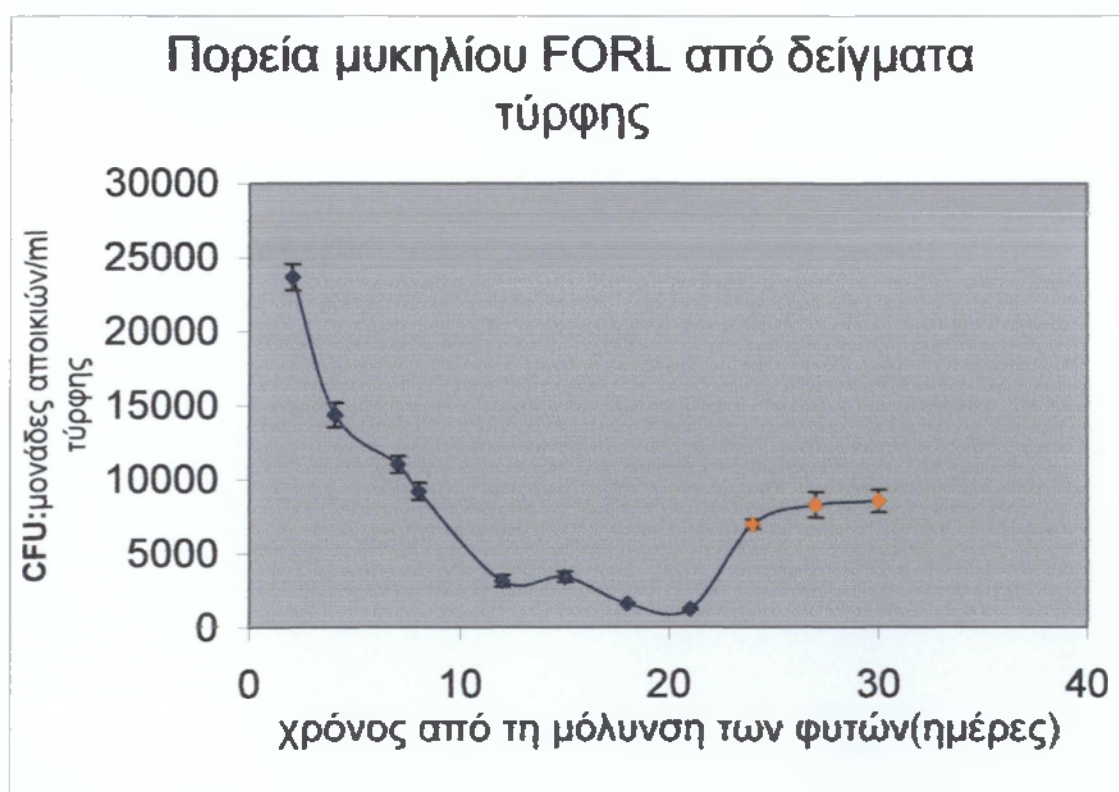
Στην πραγματικότητα προς το τέλος του πειράματος το σύνολο των φυτών τα οποία αναπτύσσονταν στην τύρφη είχαν πεθάνει σε αντίθεση με αυτά του compost τα οποία μόλις έδειχναν κάποια πρώτα σημάδια προσβολής.

### 3.3 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΠΟΡΕΙΑΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΤΟΥ ΜΥΚΗΛΙΟΥ ΤΟΥ FORL ΣΕ ΕΠΙΛΕΚΤΙΚΟ ΘΡΕΠΤΙΚΟ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ

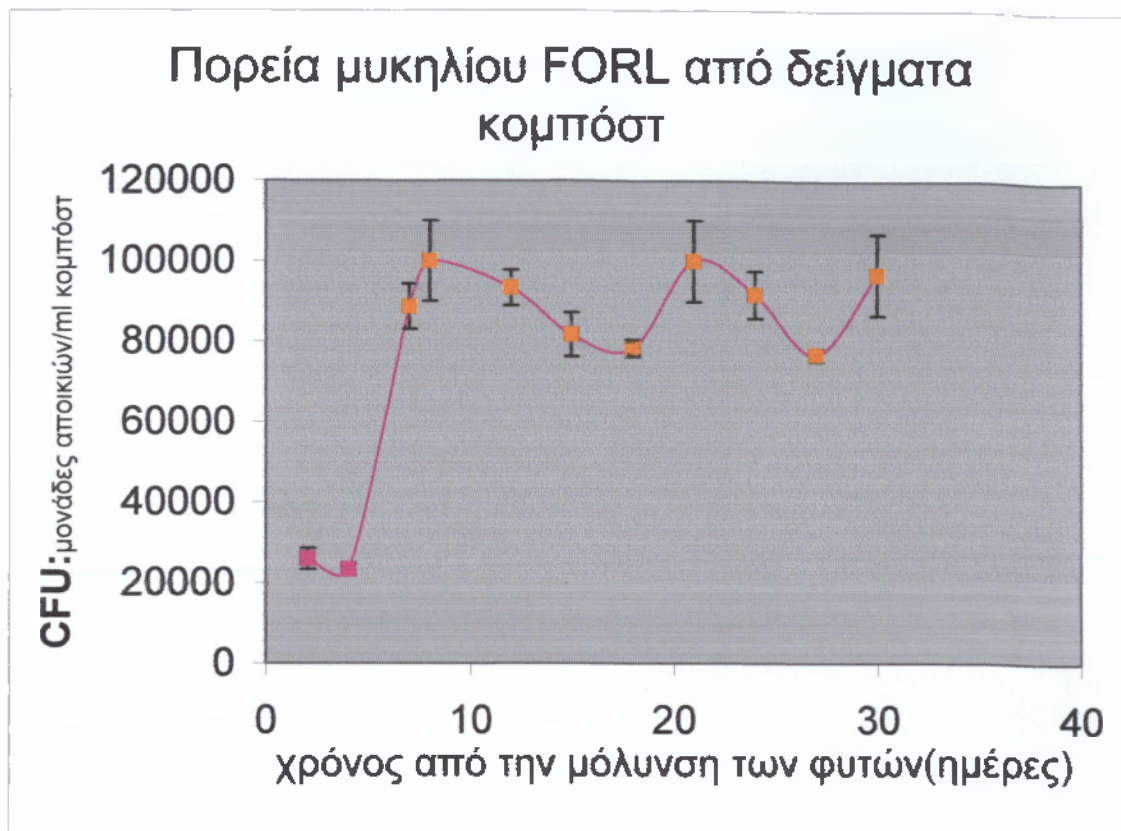
Κατά τις πρώτες κιόλας ημέρες από τον εμβολιασμό των τριβλίων με δείγματα τύρφης, παρατηρήθηκε μια μέγιστη εμφάνιση αποικιών (CFU, colony formic union) δημιουργημένων από μυκηλιακές υφές που ήδη είχαν αναπτυχθεί στο υπόστρωμα των φυτών. Πρόκειται για αποικίες υφών που έχουν την ιδιότητα να αναπτύσσονται ταχύτατα, αγενώς από προϋπάρχουσες υφές. Μέσα σε 10 ημέρες είχαμε σημαντική μείωση των αποικιών αυτών μέχρι που σχεδόν εξαφανίστηκαν, για να δώσουν τη θέση τους σε αποικίες που προέρχονταν από βλάστηση σπορίων. Αυτές οι τελευταίες, είναι αποικίες που αναπτύσσονται αργά αφού προηγουμένως βλαστήσουν τα σπόρια.

Μάλιστα, λόγω της αυξημένης ανάπτυξης του FORL στα πρώτα στάδια, χρησιμοποιήσαμε και μεγαλύτερες αραιώσεις από  $10^{-3}$ . Κάναμε αραιώσεις ως και  $10^{-4}$  προκειμένου να πετύχουμε μικρότερη πυκνότητα αποικιών, και συνεπώς πιο εύκολα μετρίσιμη.

Από τις μετρήσεις (πίνακας 3) των CFU προέκυψαν τα σχήματα 2 και 3.



Σχήμα 2. Πορεία μυκηλίου του FORL στο υπόστρωμα τύρφης



Σχήμα 3. Πορεία του μυκηλίου του FORL στο υπόστρωμα *compost*

### 3.4 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΠΟΡΕΙΑΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΤΟΥ ΜΥΚΗΛΙΟΥ ΤΟΥ FORL ΣΤΗΝ ΤΥΡΦΗ ΚΑΙ ΤΟ COMPOST ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΤΟΥ GUS

Μετά τις μετρήσεις των επεξεργασμένων δειγμάτων (πίνακας 5) πήραμε δυο γραφικές παραστάσεις (σχήμα 4&5). Η ενζυμική δραστηριότητα αποδείχθηκε σχεδόν ίδια, και για τις δυο επεμβάσεις. Μάλιστα η πορεία τους στο χρόνο ήταν σχεδόν παράλληλη με την δραστηριότητα GUS να εμφανίζεται λίγο πιο έντονη στα δείγματα τύρφης.



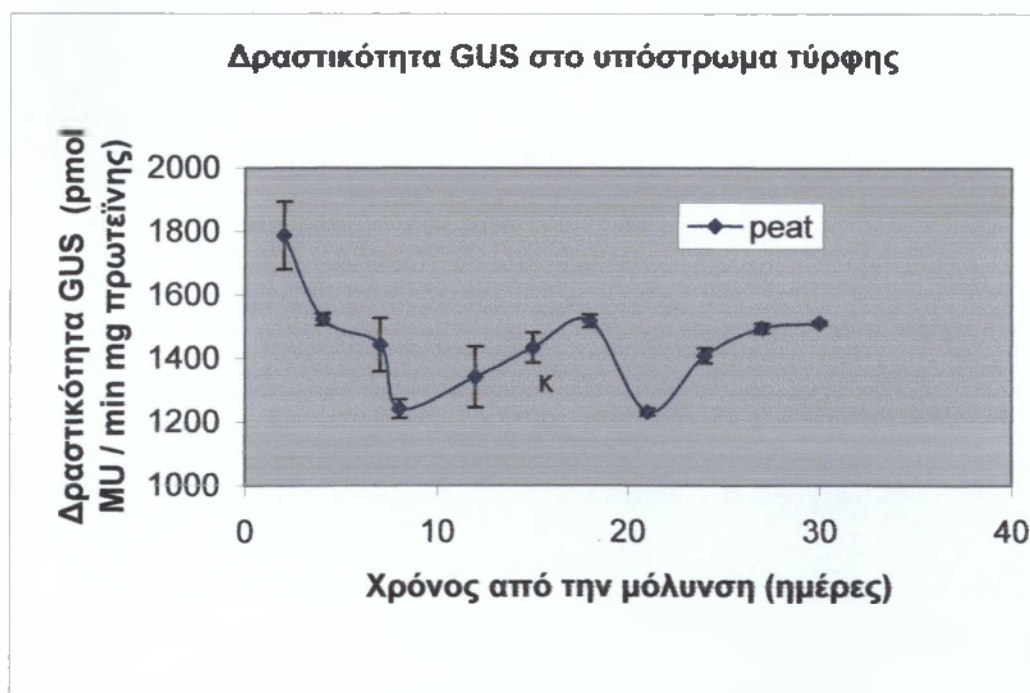
Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκε ένα γενετικά τροποποιημένο (από το εργαστήριο μας) στέλεχος του FORL. Το στέλεχος αυτό είχε μετασηματισθεί με το γονίδιο uidA του *E. coli* (GUS), το προϊόν του οποίου, η β-γλουκουρονιδάση μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως υπόστρωμα MUG. Το προϊόν της αντίδρασης είναι το MU που έχει την ικανότητα να φθορίζει όταν προσπίπτει φως πάνω του ορισμένου μήκους κύματος.

Η ένταση φθορισμού είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του παραγόμενου MU.

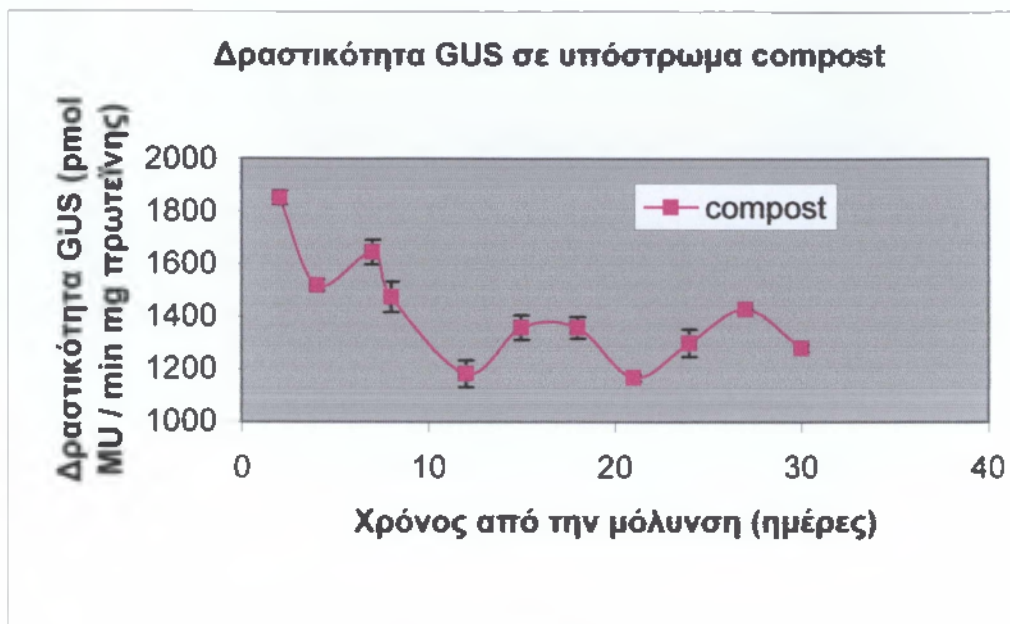
Η συγκέντρωση MU με τη σειρά της εξαρτάται από την ποσότητα του ενζύμου της β-γλουκουρονιδάσης στο εξεταζόμενο δείγμα. Δηλαδή από τον βαθμό παρουσίας του μετασηματισμένου μύκητα.

Θα πρέπει να τονισθεί ότι είχε βρεθεί, από το εργαστήριο μας, ότι υπάρχει θετική συσχέτιση μεταξύ της αύξησης της μυκηλιακής βιομάζας και της αύξησης ενεργότητας του ενζύμου. Έτσι λοιπόν φαίνεται πως και η βιομάζα του παθογόνου μύκητα ήταν ίδια και στις δυο επεμβάσεις. Δηλαδή φαίνεται πως ο μύκητας αναπτύχθηκε εξ' ίσου καλά τόσο στην τύρφη, όσο και στο compost.

Η ενεργότητα του ενζύμου εκφράστηκε σε pmol MU/mg ολικών πρωτεϊνών ανά λεπτό ενζυματικής αντίδρασης.



Σχήμα 4. Δραστικότητα του FORL στο υπόστρωμα τύρφης



Σχήμα 5. Δραστικότητα του FORL στο υπόστρωμα compost

## 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Οι μακροσκοπικές παρατηρήσεις ήταν σε μεγάλο βαθμό υποκειμενικές και εξαρτήθηκαν από την αντίληψη του παρατηρητή. Αυτό ίσως να ήταν πιο έντονο τις πρώτες μέρες των παρατηρήσεων όπου τα συμπτώματα δεν ήταν έντονα και ξεκάθαρα. Μετά από 2 εβδομάδες από την μόλυνση η διαφορά στην ένταση των συμπτωμάτων μεταξύ των δυο επεμβάσεων ήταν τόσο μεγάλη, που η υποκειμενικότητα των παρατηρήσεων δεν ήταν τόσο σημαντική. Όπως φαίνεται από το σχήμα 1 είναι εμφανής η ύπαρξη επισχετικότητας στο FORL λόγω του compost.

Όπως αναφέρεται στο σχετικό κεφάλαιο των υλικών και μεθόδων, η πορεία ανάπτυξης του μυκηλίου του FORL στην ριζόσφαιρα παρακολουθήθηκε εκτός από την μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων και με τη χρήση του GUS.

Όπως φαίνεται στα σχήματα 2&3 ο αριθμός των CFU στις δυο πρώτες μετρήσεις ήταν περίπου ο ίδιος και στις δυο επεμβάσεις. Από την τρίτη δειγματοληψία όμως και μετά ο αριθμός των λαμβανόμενων αποικιών από τις αραιώσεις του compost αυξήθηκε δραματικά. Οι CFU στην περίπτωση αυτή αποδόθηκαν σε σπόρια του FORL και αυτό γιατί η διάμετρος των αποικιών ήταν μικρότερη από αυτήν των αντίστοιχων της τύρφης (εικ 14). Η διαφορά αυτή πιθανόν να οφείλεται στην γνωστή φάση στέρησης που παρουσιάζουν τα σπόρια των μυκήτων κατά την ανάπτυξη τους.

Στην περίπτωση της τύρφης ο αριθμός των αποικιών που λαμβανόταν συνέχισε να μειώνεται μέχρι την 20<sup>η</sup> ημέρα περίπου. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι όπως φαίνεται στο σχήμα 1 τις ίδιες μέρες τα φυτά παρουσίαζαν όλο και εντονότερα συμπτώματα προσβολής.

Από την 20<sup>η</sup> ημέρα και μετά παρατηρείται ανάκαμψη του αριθμού λαμβανομένων αποικιών η οποία και εδώ οφείλεται στην παρουσία σπορίων. Πιθανά αυτό σημαίνει ότι από αυτό το σημείο και μετά έχουμε έξοδο του παθογόνου μύκητα από την ρίζα και σχηματισμό πλέον σπορίων στην ριζόσφαιρα.

Αργότερα βρέθηκε όμως ότι η πλειονότητα των αποικιών που σχηματίζονται εγγενώς πρέπει να προέρχονται από κάποιο άλλο στέλεχος Φουζαρίου (μη παθογόνου). Ο έλεγχος έγινε με την χρώση των υφών αποικιών με x-gluc το οποίο αποτελεί υπόστρωμα για την β-γλουκουρονιδάση. Οι μετασχηματισμένες αποικίες του FORL στην περίπτωση αυτή χρωματίζονται μπλε ενώ οι άλλες παραμένουν λευκές.

Μετά τις μετρήσεις των επεξεργασμένων δειγμάτων για δραστικότητα GUS πήραμε δυο γραφικές παραστάσεις (σχήμα 4&5), οι οποίες είχαν διαφορετικό αποτέλεσμα απ' ότι αναμέναμε.

Σύμφωνα με τις ενδείξεις επισχετικότητας που λάβαμε από τις προηγούμενες μετρήσεις (σχήμα 1), θα έπρεπε η ενζυμική δραστικότητα στην τύρφη να ήταν αρκετά μεγαλύτερη από αυτή του compost . Δηλαδή η ανάπτυξη του FORL να είναι μεγαλύτερη στην τύρφη, και μάλιστα με αυξητικές τάσεις.

Όπως φαίνεται στα σχήματα 4&5 η ενεργότητα του ενζύμου, άρα και η βιομάζα του μύκητα, βρίσκεται στα ίδια περίπου επίπεδα και στις δυο επεμβάσεις καθ' όλη τη διάρκεια εξέλιξης του πειράματος. Και αυτό, αν και στην περίπτωση της τύρφης τα φυτά παρουσιάζουν έντονα συμπτώματα προσβολής από τον μύκητα. Κατά συνέπεια θα μπορούσε να υποθέσει κάποιος ότι η επισχετικότητα έναντι του παθογόνου που παρουσιάζεται στο compost δεν οφείλεται στην παρεμπόδιση ανάπτυξης και εξάπλωσης του μυκηλίου. Θα πρέπει να υπάρχουν άλλοι μηχανισμοί οι οποίοι πιθανά να εμποδίζουν την είσοδο του μύκητα στη ρίζα. Ένας τέτοιος μηχανισμός θα μπορούσε να είναι η ενεργοποίηση επαγόμενης διασυστηματικής ανθεκτικότητας (induced systematic resistance) στα φυτά τομάτας, ή εμφάνιση κάποιας μορφής ανταγωνιστικότητας μεταξύ του FORL και κάποιου άλλου οργανισμού που βρίσκεται στο compost. Ειδικά οι μετρήσεις των διαδοχικών αραιώσεων, συνηγορούν στην ενίσχυση της υπόθεσης του ανταγωνισμού, και μάλιστα του ανταγωνισμού με ένα μη παθογόνο στέλεχος του γένους *Fusarium*.

Το τελικό συμπέρασμα της εργασίας αυτής, είναι ότι η επισχετικότητα που εμφανίζει το compost δεν οφείλεται στην παρεμπόδιση της ανάπτυξης του FORL εντός του υποστρώματος ανάπτυξης των φυτών, αλλά στην παρεμπόδιση εισχώρησης του εντός των ιστών του ξενιστή.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

### ΕΛΛΗΝΙΚΗ

- Δημητράκης Κ.Γ. (1998). Λαχανοκομία.
- Ηλιόπουλος Α. Γ. (1993). ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΣΙΑ Ι, Στοιχεία Φυτοπαθολογίας, ΤΕΙ Καλαμάτας
- Σιδηράς Κ.Ν. (1997). Οργανική λίπανση και αμειψισπορές. Εκδ. ΔΗΩ
- Σπάρτσης Ν.Ι. (1995). ΓΕΝΙΚΗ ΚΑΙ ΕΙΔΙΚΗ ΛΑΧΑΝΟΚΟΜΙΑ. ΟΕΔΒ
- Χριστοφιλόπουλος Ν.Ι. (1999). Σημειώσεις εργαστηρίου λαχανοκομίας ΙΙ. Τ.Ε.Ι. Καλαμάτας.

### ΞΕΝΗ

- Anonymous. Soil Management, A World View of Conservation and Production
- Agrios G. (1997). Plant Pathology. Academic Press. London
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- Brayford, D., (1996) *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici*. *Mycopathologia* 133: 61-63.
- Campbell R. (1989). Biological control of microbial plant pathogens. Cambridge University Press. Great Britain.
- Carol E. Windels. (19?? ) University of Minesota, Northwest Experiment Station Crookston, Minesota 56716.  
METHODS FOR RESEARCH ON SOILBORNE PHYTOPATHOGENIC FUNGI
- Couteaudier, Y., Daboussi, M.J., Eparvier, A., Langin, T. & Orcival, J. (1993) The GUS gene fusion system (*Escherichia coli*  $\beta$ -D-glucuronidase gene), a useful tool in studies of root colonization by *Fusarium oxysporum*. *Applied and Environmental Microbiology* 59: 1767-1773.
- Dhingram O.D & Sinclair J.B. (19??)-editors: Basic Plant Pathology Methods. CRC Press Inc, USA)
- El-Marsy M.H., Khali A.I., Hasouna M.S., Ibrahim H.A.H. (2002). In situ and in vitro suppressive effect of agricultural composts and their water extracts on some phytopathogenic fungi. *World journal of Microbiology*.
- Freeman, S., Maimon, M. & Pinkas, Y.(1999) Use of GUS Transformants of *Fusarium subglutinans* for Determining Etiology of Mango Malformation Disease. *Phytopathology* 89: 456-461.
- Green, H. & Jensen, D.F. (1995) A Tool for Monitoring *Trichoderma harzianum*: II. The Use of a GUS Transformant for Ecological Studies in the Rhizosphere. *Phytopathology* 85: 1436-1440.
- Green, H., Heiberg, N., Lejbolle, K. & Jensen, D.F. (2001) The use of a GUS transformant of *Trichoderma harzianum*, strain T3a, to study metabolic activity in the spermosphere and rhizosphere related to biocontrol of *Pythium* damping-off and root rot. *European Journal of Plant Pathology* 107: 349-359.
- Guetsky R., Shtienberg D., Elad Y., Fischer E., Dinoor A. (2002). Improving biological control by combining biocontrol agents each with several mechanisms of disease suppression.
- Hornby D., (1983). Suppressive soils. *Annual Review of Phytopathology*.
- Hoitink H.A.J. and Fahy P.C. (1986). Basis for the control of soilborne plant pathogens with composts. *Annual Review of Phytopathology*.
- Jarvis W.R. (1988). *Fusarium* crown and root rot of tomatoes. *Phytoprotection*.
- Jarvis W.R. and Shoemaker R.A. (1978). Taxonomic status of *Fusarium oxysporum* causing foot and root rot of tomato. *Phytopathology*.
- Jarvis W.R. and Thorpe H.J., (1981). Control of *Fusarium* foot and root rot of tomato by soil amendment with lettuce residues. *Canadian Journal of Plant Pathology*.
- Kamoun, Sophien, van West, Pieter, and Govers, Francine. (1998). Quantification of late blight resistance of potato using transgenic *Phytophthora infestans* expressing  $\beta$ -glucuronidase. *European Journal of Plant Pathology*.

- Jarvis, W.R. & Shoemaker, R.A. (1978) Taxonomic status of *Fusarium oxysporum* causing foot and root-rot of tomato. *Phytopathology* 68: 1679-1680.
- Jarvis, W.R. (1988) *Fusarium* crown and root rot of tomatoes. *Phytoprotection* 69: 49-64.
- Jefferson, R. A. (1987) Assaying chimaeric genes in plants: the GUS gene fusion system. *Plant Molecular Biology Reporter* 5: 387-405.
- Kahmann, R. & Basse, C. (2001) Fungal gene expression during pathogenesis-related development and host plant colonization. *Current Opinion in Microbiology* 4:374-380.
- Lagopodi, A.L., Ram, A.F.J., Lamers, G.E.M., Punt, P.J., Van den Hondel, C.A.M.J.J., Lugtenberg, B.J.J. & Bloemberg, G.V. (2002) Novel Aspects of Tomato Root Colonization and Infection by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* Revealed by Confocal Laser Scanning Microscopic Analysis Using the Green Fluorescent Protein as a Marker. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 15: 172-179.
- Liljeroth, E., Jansson, H.B. & Schafer, W. (1993) Transformation of *Bipolaris sorokiniana* with the GUS gene and Use for Studying Fungal Colonization of Barley Roots. *Phytopathology* 83: 1484-1489.
- Menzies J.G., Koch C., and Seywerd F. (1990). Additions to the host range of *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici*. *Plant Disease*.
- Menzies J.G. and Jarvis W.R. (1994). The infestation of tomato seed by *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici*. *Plant Pathology*.
- Nelson P.E. (1981). *Fungal wilt diseases of plants*. Academic Press. London.
- Ntougias S., Ehalotis C., Zervakis G., Katsaris P., and Papadopoulou K., (2003). Monitoring the composting process of different agricultural wastes and evaluation of the effects, of the final products in plants. 8<sup>th</sup> International Conference of Environmental Science and Technology, Lemnos, Greece.
- Oliver P. Richard, Farman, Mark, Jones. (1993). Use of fungal transformants expressing  $\beta$ -glucuronidase activity to detect infection and measure hyphal biomass in infected plant tissues.
- Oliver, R.P., Farman, M.L., Jones, J.D.G. & Hammond-Kosack, K.E. (1993) Use of fungal transformants expressing  $\beta$ -glucuronidase activity to detect infection and measure hyphal biomass in infected plant tissues. *Molecular Plant Microbe Interactions* 6:521-525
- Papavizas G.C., Lumsden R.D. (1980). Biological control of soilborne fungal propagules. *Annual Review of Phytopathology*.
- Roberts, I.N., Oliver, R.P., Dingenanse, M.A., Pouwels, P.H. & van den Hondel, C. A. M. J. (1989) Expression of the *Escherichia coli*  $\beta$ -glucuronidase gene in industrial and phytopathogenic filamentous fungi. *Current Genetics* 15: 177-180.
- Snyder & Hansen, (1977). *European Handbook of Plant Diseases*
- Weller D.M., Raaijmakers J.M., McSpadden Gardener B.B. and Thomashow L.M. (2002). Microbial Populations responsible for specific soil suppressiveness to Plant Pathogens. *Annual Review of Phytopathology*.
- Yates, I.E., Hiatt, K.L., Kapczynski, D.R., Smart, W., Glenn, A.E., Hinton, D.M., Bacon, C.W., Meinersmann, R., Liu, S. & Jaworski, A.J. (1999) GUS transformation of the maize fungal endophyte *Fusarium moniliforme* *Mycological Research* 103: 129-136

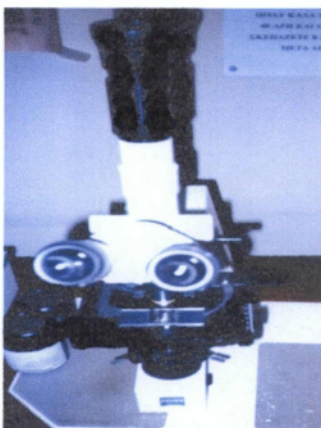
## **ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΕΙΚΟΝΩΝ**



εικ. 1. Θάλαμος ανάπτυξης φυτών και FORL (ξενιστή – παρασίτου)



εικ. 2. Εμβολιασμένα τριβλία



εικ. 3. Μικροσκόπιο



εικ. 4. Αναδευτήρας



εικ. 5. Αυτόκαυστο





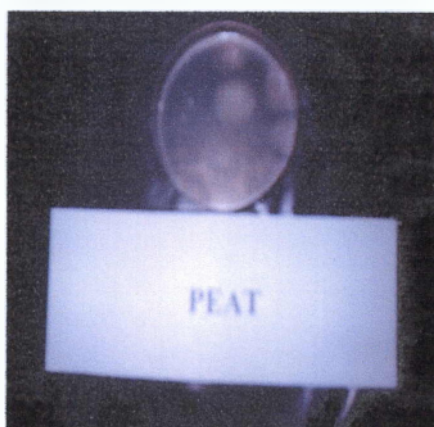
εικ. 6. Στήλη απιονισμού νερού.



εικ. 7. Φθοριόμετρο



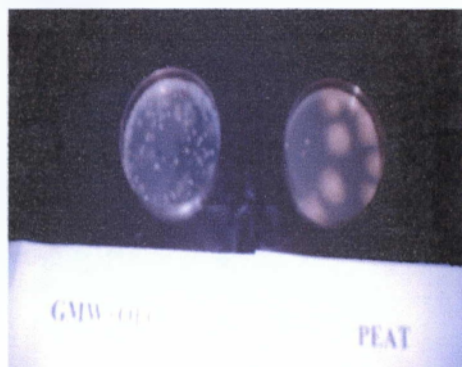
εικ. 8,9. Η μακροσκοπική διαφορά των φυτών είναι εμφανείς μετά από 2 εβδομάδες από τη μόλυνση.



εικ. 10. Αποικίες δειγμάτων τύρφης σε s.m.



εικ. 11. Αποικίες FORL από δείγμα compost



εικ.12 Σύγκριση επεμβάσεων

## **ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΠΙΝΑΚΩΝ**

Time/days	peat (diseased area %)	Compost(diseased area %)
2	0	0
4	0	0
7	0	0
8	0	0
12	0	0
15	2,4	0
18	5,3	0
21	19,1	0
24	38	0
27	44,6	0,66
30	72	4,9

Πίνακας 1. Αποτελέσματα μακροσκοπικών παρατηρήσεων. Εκτίμηση προσβολών.

CFU/peat	Mean	St. Err.	CFU/compost	Mean	St. Err.
27000	23666,67	1763,834	24000	26000	5291,503
23000	3055,05		36000	9165,151	
21000			18000		
16000	14333,33	1666,667	18000	23333,33	2905,933
11000	2886,751		28000	5033,223	
16000			24000		
13000	11000	1154,701	100000	88666,67	11333,33
11000	2000		66000	19629,91	
9000			100000		
8000	9166,667	1166,667	140000	100000	20000
8000	2020,726		80000	34641,02	
11500			80000		
2500	3133,333	788,106	110000	93333,33	8819,171
2200	1365,04		90000	15275,25	
4700			80000		
4800	3400	721,1103	90000	81666,67	10929,06
2400	1249		60000	18929,69	
3000			95000		
1800	1600	100	80000	78333,33	4409,586
1500	173,2051		70000	7637,626	
1500			85000		
1100	1233,333	133,3333	85000	100000	20207,26
1100	230,9401		75000	35000	
1500			140000		
7600	6966,667	633,3333	80000	91666,67	11666,67
7600	1096,966		115000	20207,26	
5700			80000		
5700	8266,667	1707,174	80000	76666,67	3333,333
7600	2956,913		80000	5773,503	
11500			70000		
6500	8533,333	1516,941	100000	96666,67	20275,88
7600	2627,42		130000	35118,85	
11500			60000		

Πίνακας 2. Μετρήσεις διαδοχικών αραιώσεων.

Time	CFU/peat	St. Err.	Time	CFU/compost	St. Err.
2	23666,67	1763,834	2	26000	5291,503
4	14333,33	1666,667	4	23333,33	2905,933
7	11000	1154,701	7	88666,67	11333,33
8	9166,667	1166,667	8	100000	20000
12	3133,333	788,106	12	93333,33	8819,171
15	3400	721,1103	15	81666,67	10929,06
18	1600	100	18	78333,33	4409,586
21	1233,333	133,3333	21	100000	20207,26
24	6966,667	633,3333	24	91666,67	11666,67
27	8266,667	1707,174	27	76666,67	3333,333
30	8533,333	1516,941	30	96666,67	20275,88

Πίνακας 3. Αποτελέσματα μετρήσεων διαδοχικών αραιώσεων.

Time	peat	Mean	St. Err.	compost	Mean	St. Err.
2	2194	1787,667	214,5618	1748	1851	52,37366
2	1704	371,632		1919	90,71384	
2	1465			1886		
4	1510	1524	37,04052	1445	1518,667	44,25808
4	1468	64,15606		1513	76,65725	
4	1594			1598		
7	1775	1443,333	167,5553	1788	1645	93,18262
7	1319	290,2143		1470	161,397	
7	1236			1677		
8	1253	1241,333	58,89067	1266	1474,333	114,7814
8	1134	102,0016		1495	198,8073	
8	1337			1662		
12	1402	1341,333	191,7849	1324	1183,333	101,6027
12	983	332,1812		986	175,9811	
12	1639			1240		
15	1556	1434,667	94,72299	1452	1359	93
15	1500	164,065			131,5219	
15	1248			1266		
18	1440	1519	39,52636	1200	1358,333	82,88211
18	1556	68,46167		1480	143,556	
18	1561			1395		
21	1185	1232	23,71357	1117	1168,333	25,77035
21	1261	41,07311		1190	44,63556	
21	1250			1198		
24	1366	1410,333	46,34772	1170	1300,333	104,9545
24	1362	80,27661		1508	181,7865	
24	1503			1223		
27	1447	1495,667	30,90487	1427	1429	3,05505
27	1553	53,52881		1435	5,291503	
27	1487			1425		
30	1538	1513,333	14,14606	1271	1280,667	28,98467
30	1513	24,5017		1335	50,20292	
30	1489			1236		

Πίνακας 4. Μετρήσεις ενζυμικής δραστηριότητας .

Time	peat	St. Err.	Time	compost	St. Err.
2	1787,667	214,5618	2	1851	52,37366
4	1524	37,04052	4	1518,667	44,25808
7	1443,333	167,5553	7	1645	93,18262
8	1241,333	58,89067	8	1474,333	114,7814
12	1341,333	191,7849	12	1183,333	101,6027
15	1434,667	94,72299	15	1359	93
18	1519	39,52636	18	1358,333	82,88211
21	1232	23,71357	21	1168,333	25,77035
24	1410,333	46,34772	24	1300,333	104,9545
27	1495,667	30,90487	27	1429	3,05505
30	1513,333	14,14606	30	1280,667	28,98467

Πίνακας 5. Αποτελέσματα μετρήσεων ενζυμικής δραστηριότητας .