

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ (Τ.Ε.Ι.)

ΚΑΛΑΜΑΤΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ

ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΜΥΚΗΤΑ *Rhizoctonia solani*, De Candolle

ΣΤΗΝ ΓΑΡΥΦΑΛΙΑ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΓΙΑΝΝΑΚΟΠΟΥΛΟΥ ΑΔΑΜΑΝΤΙΑ

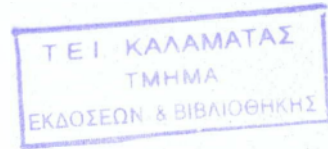
ΚΑΛΑΜΑΤΑ, 2005

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ (ΤΕΙ)

ΚΑΛΑΜΑΤΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ



ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΜΥΚΗΤΑ *Rhizoctonia solani*, De Candolle

ΣΤΗΝ ΓΑΡΥΦΑΛΙΑ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΓΙΑΝΝΑΚΟΠΟΥΛΟΥ ΑΔΑΜΑΝΤΙΑ

Επιβλέπων καθηγητής: Αναστάσιος Ηλιόπουλος

ΚΑΛΑΜΑΤΑ, 2005

ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	3
---------------	---

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΡΩΤΟ
Ο ΜΥΚΗΤΑΣ *Rhizoctonia solani* ΩΣ ΠΑΘΟΓΟΝΟ

1.1. ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΤΟΥ <i>Rhizoctonia solani</i>	4
1.2. ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΑ ΚΑΙ ΖΗΜΙΕΣ	8
1.3. ΟΜΑΔΕΣ ΑΝΑΣΤΟΜΩΣΗΣ	10
1.4. ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΩΝ ΟΜΑΔΩΝ ΑΝΑΣΤΟΜΩΣΗΣ	12

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΔΕΥΤΕΡΟ

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑΣ ΔΙΑΦΟΡΩΝ ΑΠΟΜΟΝΩΣΕΩΝ ΤΟΥ
***Rhizoctonia solani* ΣΕ ΦΥΤΑ ΓΑΡΥΦΑΛΙΑΣ**

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	14
2.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	15
2.2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	16
2.2.1. ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ ΕΔΑΦΟΥΣ	16
2.2.2. ΧΕΙΡΙΣΜΟΣ ΦΥΤΙΚΩΝ ΥΠΟΛΕΙΜΜΑΤΩΝ ΑΠΟ ΤΟ ΕΔΑΦΟΣ.....	16
2.2.3. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΚΑΙ ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΟΥ ΕΚΛΕΚΤΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ	17
2.2.4. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΤΟΥ <i>R. solani</i>	18
2.2.5. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΤΟΥ <i>R. solani</i> ΑΠΟ ΕΔΑΦΟΣ ΑΜΠΕΛΩΝΩΝ	18
2.2.6. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΤΟΥ <i>R. solani</i> ΑΠΟ ΕΔΑΦΟΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ	
ΓΑΡΥΦΑΛΙΑΣ.....	19
2.2.7. ΑΠΟΜΟΝΩΣΕΙΣ ΑΠΟ ΑΣΘΕΝΗ ΦΥΤΑ.....	19
2.2.8. ΔΙΑΤΗΡΗΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΜΟΝΩΣΕΩΝ.....	20
2.2.9. ΤΕΧΝΙΚΗ ΔΟΚΙΜΩΝ ΑΝΑΣΤΟΜΩΣΗΣ.....	20
2.2.10. ΧΡΩΣΗ ΠΥΡΗΝΩΝ	24
2.2.11. ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΤΕΛΕΙΑΣ ΜΟΡΦΗΣ ΤΟΥ <i>Rhizoctonia solani</i>	26
2.2.12. ΔΟΚΙΜΗ ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑΣ ΣΤΗ ΓΑΡΥΦΑΛΙΑ	28
2.3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	31
2.3.1. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΤΟΥ <i>R. solani</i> ΑΠΟ ΦΥΤΑ ΚΑΙ ΕΔΑΦΟΣ.....	31
2.3.2. ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΤΕΛΕΙΑΣ ΜΟΡΦΗΣ	35
2.4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ & ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	41
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	44

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Με την παρούσα εργασία έγινε μια προσπάθεια μελέτης διαφόρων απομονώσεων του μύκητα *Rhizoctonia solani* στη γαρυφαλιά. Για το σκοπό αυτό αρχικά έγιναν απομονώσεις από δείγματα χώματος αγρού γαρυφαλλιάς και αφού αυτές εντάχθηκαν σε ομάδες αναστόμωσης έγινε δοκιμή ποθογένειας με στελέχη του μύκητα διαφορετικών ομάδων αναστόμωσης.

Εκτός από την περιγραφή και ανάλυση αυτού του πειράματος, που γίνεται στο δεύτερο κεφάλαιο της εργασίας, στο πρώτο κεφάλαιο γίνεται μια ανασκόπηση σχετικά με τα τελευταία δεδομένα όσον αφορά την παθογένεια του *Rhizoctonia Solani* και της ταξινόμησής του κατά ομάδες αναστόμωσης.

Ακόμα θεώρησα σκόπιμο να συμπεριληφθούν σ' αυτή την εργασία και οι χωρίς αποτελέσματα προσπάθειες για τον σχηματισμό καρποφοριών της τέλει μορφής (βασίδια), που έγιναν κατά την διάρκεια της εργασίας, ελπίζοντας ότι οι πληροφορίες αυτές μπορεί να φανούν χρήσιμες σε μελλοντικές αντίστοιχες προσπάθειες.

Θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στον επιβλέποντα την εργασία μου καθηγητή του Τ.Ε.Ι. Καλαμάτας κ. Αναστάσιο Ηλιόπουλο για τις χρήσιμες υποδείξεις του και τη γενικότερη επίβλεψη της εργασίας, τον Δρα Δημήτριο Λάσκαρη για την πολύτιμη βοήθεια του στην καθοδήγηση και επίβλεψη των πειραμάτων, καθώς και το προσωπικό του εργαστηρίου μυκητολογίας του Μπενακείου Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου και όλους όσους συνέβαλαν στην πραγματοποίηση αυτής της πτυχιακής εργασίας.

Αδαμαντία Γιαννακοπούλου

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο μύκητας *Rhizoctonia solani* είναι ένα διαδεδομένο σε όλο τον κόσμο παθογόνο φυτών με μεγάλο αριθμό ξενιστών.

Η ποικιλομορφία που παρουσιάζει το είδος αυτό όσον αφορά την μορφολογία, φυσιολογία και παθογένεια των διαφόρων απομονώσεων, έχει δημιουργήσει την ανάγκη για αναθεώρηση της συστηματικής του. Το πρόβλημα αυτό είναι δύσκολο γιατί η συστηματική των μυκήτων βασίζεται στα μορφολογικά τους χαρακτηριστικά και είναι γνωστό ότι ο *R. solani* δεν σχηματίζει κονιδιοφόρους, αγενή σπόρια ή άλλους μορφολογικούς χαρακτήρες που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για να διαφοροποιήσουν ταξινομικές ομάδες μέσα στο είδος.

Προ τριάντα περίπου ετών (Ogoshi, 1972) δόθηκε μια λύση στο πρόβλημα αυτό με την χρήση της ιδιότητας των υφών ομολόγων στελεχών του μύκητα να αναστομώνονται* μεταξύ τους. Η έρευνα έδειξε ότι τα στελέχη του *R. solani* μπορούν να καταταχθούν σε συγκεκριμένες ομάδες αναστόμωσης και η κατάταξη αυτή, όπως φαίνεται και από τον αυξανόμενο αριθμό των σχετικών δημοσιεύσεων τυγχάνει γενικής αποδοχής.

Τα ερωτήματα που τίθενται μετά από την αποκάλυψη των ομάδων αναστόμωσης στον *R. solani* είναι πολλά. Το πιο ουσιώδες ερώτημα είναι ο ρόλος που παίζουν οι ομάδες αναστόμωσης στην παθογένεια και την επιδημιολογία των ασθενειών που προκαλούν. Οι γνώσεις μας επάνω στο θέμα αυτό είναι λίγες και αποσπασματικές. Ειδικότερα για την Ελλάδα, εκτός από μία πτυχιακή μελέτη (Βαλαλά, 1989), που έγινε στο ίδιο εργαστήριο με την παρούσα, δεν έχει δημοσιευθεί άλλη ερευνητική εργασία σχετική με ομάδες αναστόμωσης στον *R. solani*. Ο μύκητας αυτός είναι γνωστό παθογόνο της γαρυφαλλιάς όπου μπορεί να προξενήσει σημαντικές απώλειες σε νεαρά φυτά. Ο μύκητας απομονώθηκε από αγρό που καλλιεργείται επι σειρά ετών η γαρυφαλλιά για να συγκριθεί η επίδραση που μπορεί να έχει η μακρόχρονη παρουσία ενός ξενιστή στον πληθυσμό του στο έδαφος. Αυτό που κυρίως ενδιαφέρει είναι αν η παρουσία της γαρυφαλλιάς ασκεί πίεση επιλογής σε συγκεκριμένες ομάδες αναστόμωσης και σε παθογενή στελέχη. Για σύγκριση χρησιμοποιήθηκε έδαφος από καλλιέργεια αμπέλου που δεν θεωρείται ξενιστής του μύκητα.

* Αναστόμωση: Ένωση υφών μυκήτων του ίδιου ή διαφορετικών στελεχών.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΡΩΤΟ

Ο ΜΥΚΗΤΑΣ *Rhizoctonia solani* ΩΣ ΠΑΘΟΓΟΝΟ

1.1. ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΤΟΥ *Rhizoctonia solani*

Το γένος *Rhizoctonia* ιδρύθηκε από τον De Candolle (1815) προκειμένου να ενταχθεί ένα παθογόνο ριζών που δεν έκανε σπόρια, ο μύκητας *Rhizoctonia crocorum* DC ex Fr. Η έλλειψη σπορίων και η ελλιπής περιγραφή των λοιπών μορφολογικών χαρακτήρων, οδήγησε στην περιγραφή, μέχρι σήμερα, μιας εκατοντάδας σχεδόν ειδών του γένους *Rhizoctonia*, πολλά από τα οποία διαφέρουν, τόσο μεταξύ τους, όσο και με την αρχική περιγραφή του γένους. Μεταξύ αυτών των ειδών είναι και ο μύκητας που ο Julius Kuhn παρατήρησε σε προσβλημένους κονδύλους πατάτας και τον ονόμασε *Rhizoctonia solani* Kuhn.

Από την πρώτη του περιγραφή το 1858 μέχρι σήμερα, έχει αναγνωριστεί σαν ένας κοσμοπολίτικος μύκητας που απαντά σε καλλιεργούμενα και μη εδάφη και είναι σοβαρό παθογόνο, με πολύ μεγάλο αριθμό φυτών ξενιστών.

Οι μύκητες του γένους *Rhizoctonia*, είναι στειροί μύκητες (*mycellia sterilia*) δηλαδή δεν παράγουν αγενή σπόρια και έχουν τέλεια μορφή βασιδιομύκητα. Η αναγνώριση τους βασίζεται στα χαρακτηριστικά του μυκηλίου και της αποικίας τους (Parmeter & Whitney, 1970; Ogoshi, 1987), που θα μπορούσαν να συνοψισθούν ως εξής:

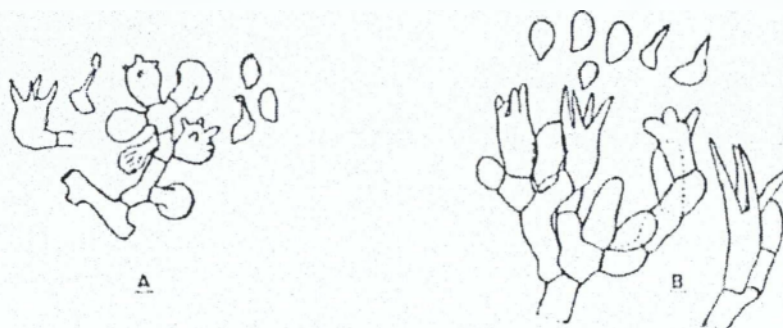
1. Σε νεαρές βλαστικές υφές μια διακλάδωση εμφανίζεται κοντά στο ακραία σέπτο.
2. Ένα δεύτερο σέπτο σχηματίζεται στην διακλάδωση κοντά στο σημείο πρόσφυσης με την κύρια υφή.
3. Η υφή της διακλάδωσης παρουσιάζει στένωση στο σημείο πρόσφυσης με την κύρια υφή.
4. Το σέπτο στην *Rhizoctonia* είναι δολιπόρο.
5. Το μυκήλιο δεν έχει κρίκους (*club connections*).
6. Δεν σχηματίζονται κονίδια (πλην των μονιλοειδών κυττάρων).
7. Σκληρώτια απλά, μη διαφοροποιημένα σε φλοιό (*rind*) και *medulla*.
8. Δεν σχηματίζουν ριζομόρφα.

Παρόλο που το σύνολο αυτό των χαρακτήρων μπορεί σαφώς να ξεχωρίσει τους μύκητες του γένους αυτού, αφήνει περιθώρια για σύγχυση και πολλές από τις απομονώσεις που αρχικά αναγνωρίστηκαν σαν *Rhizoctonia* spp απεδείχθη ότι ήταν άλλα γένη.

Υπάρχει μεγάλη διαφοροποίηση στα είδη *Rhizoctonia* spp. Τα είδη αυτά μπορεί να είναι παθογόνα με πολλούς ξενιστές, σαπρόφυτα ή μυκόρριζες σε ορχεοειδή. Οι απομονώσεις του γένους *Rhizoctonia* μπορούν να χωριστούν σε τρεις ομάδες (Ogoshi, 1987):

Η μια ομάδα έχει πολυπύρρηνο μυκήλιο (πάνω από 2 πυρήνες σε κάθε τμήμα της υφής που χωρίζεται από δύο σέπτα), χοντρό μυκήλιο (6-10 μm) και η τέλεια μορφή είναι *Thanatephorus cucumeris*, Donk, και η ατελής μορφή του *Rhizoctonia solani* (βλέπε σχήματα 1 Β και 2).

Μια άλλη ομάδα έχει διπύρρηνο μυκήλιο (σπανιότερα 1-3 πυρήνες) λεπτότερο μυκήλιο και τέλεια μορφή *Ceratobasidium*, Rogers (σχήμα 1Α).



Σχήμα 1 Α. Βασίδια και βασιδιοσπόρια του *Ceratobasidium* sp. Β. Βασίδια και βασιδιοσπόρια του *Thanatephorus cucumeris*.

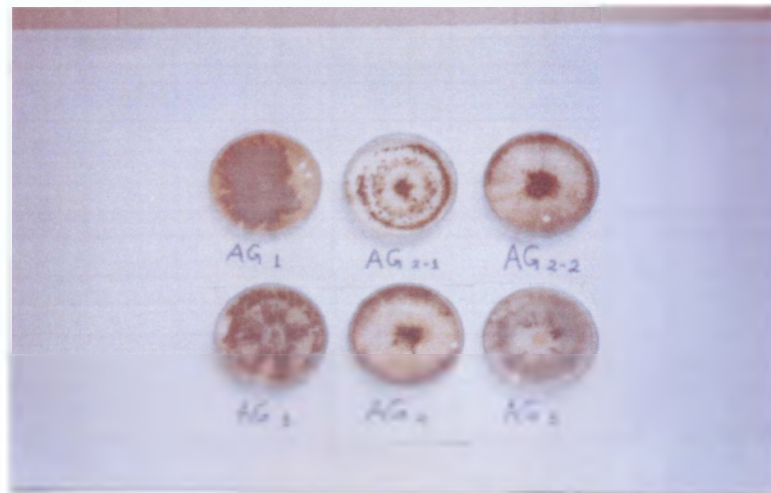


Σχήμα 2 A. Χαρακτηριστική διακλάδωση υφών μυκηλίου του *R. solani* με δολιπόρα σέπτα. B. Μονίλιοειδή κύτταρα του *R. solani*.

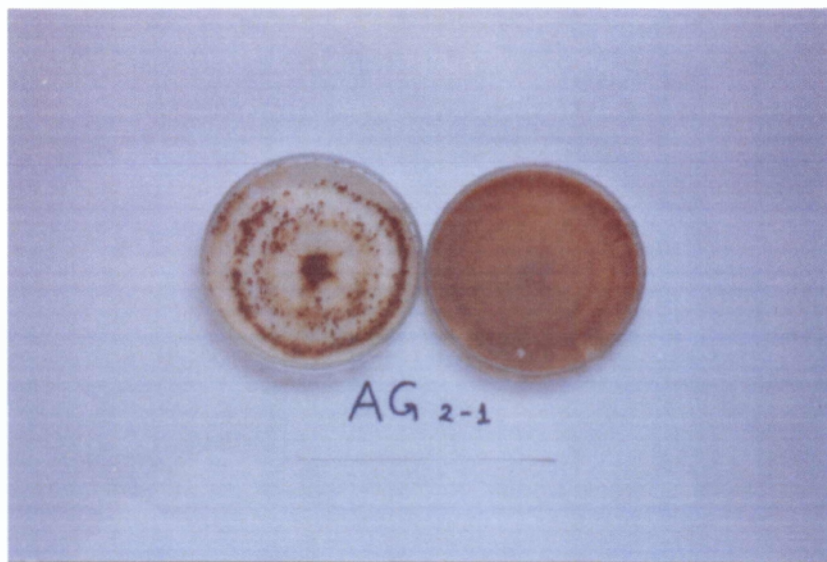
Η τρίτη ομάδα περιλαμβάνει τις *R. oryzae* και *R. zaeae*, που είναι πολυπύρηνες και η τέλεια μορφή τους είναι *Waitea Warcup & Talbot*. Όταν ο *R. solani* καλλιεργείται σε PDA αναπτύσσεται αρκετό γρήγορα. Η αποικία είναι λευκή αρχικά και αργότερα παίρνει ένα καστανό χρώμα. Οι νεαρές υφές είναι υαλώδεις πλάτους μέχρι 12 μm και η διακλάδωση τείνει να είναι ορθογώνια. Το χρώμα των υφών γίνεται κιτρινωπό ή ανοικτό καστανό και είναι παχύτερες έως και 30 μm. Εκτός από τα κανονικά κύτταρα του μυκηλίου που έχουν μια αναλογία μήκους - πλάτους περίπου 5 : 1, σχηματίζονται και άλλα πιο κοντά κύτταρα με αναλογία μήκους - πλάτους περίπου 1-3: 1, που καλούνται μονίλιοειδή κύτταρα (Σχήμα 2, B) και μπορεί να είναι υαλώδη ή καφέ βαρελοειδούς ή ακανόνιστου σχήματος. Μερικοί θεωρούν μάλιστα ότι τα σκληρώτια δημιουργούνται από συμπαγείς μάζες μονίλιοειδών κυττάρων αλλά αυτό δεν είναι σίγουρο γιατί έχουν βρεθεί σε σκληρώτια και κανονικές υφές.

Υπάρχουν μεγάλες διαφορές στην όψη που παίρνει η καλλιέργεια στο PDA από απομόνωση σε απομόνωση, τόσο στο χρώμα του μυκηλίου όσο και στο χρώμα, μέγεθος, αριθμό και διασπορά των σκληρωτίων (βλέπε εικόνες 1 και 2).

Σύμφωνα με τους Parmeter & Whitney (1970), το είδος *R. solani*, διακρίνεται από ένα σύνολο χαρακτήρων. Από αυτούς, πάντα παρόντες είναι το πολυπύρηνο μυκήλιο, το δολιπόρο σέπτο, η χαρακτηριστική διακλάδωση κοντά στο σέπτο, η στένωση της διακλάδωσης και το σέπτο στην αρχή της (Σχήμα 2, A). Χαρακτήρες που συνήθως αλλά όχι πάντα είναι παρόντες είναι τα μονίλιοειδή κύτταρα, τα μη διαφοροποιημένα σε φλοιό.



Εικόνα 1 Καλλιέργειες απομονώσεων του *R. solani* διαφορετικών ομάδων αναστόμωσης, 15 ημερών, σε τριβλία με PDA όπου φαίνονται οι διαφορές στην μορφολογία των αποικιών.



Εικόνα 2 Καλλιέργειες απομονώσεων του *R. solani* που ανήκουν στην ίδια ομάδα αναστόμωσης, 15 ημερών, σε τριβλία με PDA όπου φαίνονται οι διαφορές στην μορφολογία των αποικιών.

και medulla σκληρώτια, η σχετικά μεγάλη διάμετρος των υφών (>5 μ), η γρήγορη ανάπτυξη σε καλλιέργεια και η παθογένεια. Χαρακτήρες που ποτέ δεν απαντούν στον *R. solani* είναι οι μυκηλιακοί κρίκοι, τα κονίδια, τα διαφοροποιημένα σκληρώτια σε φλοιό και medulla, τα ριζόμορφα, και χρωστική άλλη από την καστανή.

Η τέλεια μορφή του *R. solani* ανήκει στο είδος *Thanatephorus cucumeris*. Πριν καταλήξει στο γένος *Thanatephorus* η τέλεια μορφή του *R. solani* είχε αναγνωρισθεί σαν *Hypochnus*, *Corticium*, *Botryobasidium*, *Pellicularia* και *Ceratobasidium*.

Η συστηματική κατάταξη του *Thanatephorus cucumeris* έχει ως ακολούθως:

Οικογένεια	Ceratobasidiaceae
Τάξη	Tulasnellales
Υποκλάση	Hymenomycetes
Κλάση	Basidiomycotina

Το γένος *Ceratobasidium* (διπύρρηνα κύτταρα) ανήκει επίσης στην οικογένεια *Ceratobasidiaceae*.

1.2. ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΑ ΚΑΙ ΖΗΜΙΕΣ

Ο *R. solani* είναι πολύ διαδεδομένος σε καλλιεργούμενα και μη καλλιεργούμενα εδάφη και μάλιστα έχει ευρύ φάσμα ξενιστών. Μπορεί και προσβάλλει τα νεαρά φυτά στα σπορεία προκαλώντας τήξεις σπορείων καθώς και μεγαλύτερα σε ηλικία φυτά προκαλώντας έλκος λαιμού και ριζών και πολλές φορές όταν οι συνθήκες είναι ευνοϊκές μπορεί να προσβάλλει και υπέργεια μέρη του φυτού. Το έλκος του λαιμού παρουσιάζεται λίγο πιο κάτω από την επιφάνεια του εδάφους και εμφανίζεται σαν νεκρωτικές καστανές περιοχές ξηρής συστάσεως, βυθισμένες με σαφή όρια που πολλές φορές καλύπτονται από καστανό μυκήλιο. Το υπέργειο μέρος του φυτού παρουσιάζει χλώρωση, καχεξία, καρούλιασμα των φύλλων και σε πολύ προχωρημένο στάδιο το φυτό μαραίνεται. Στους καρπούς η προσβολή εκδηλώνεται με την μορφή σκληρών κηλίδων χρώματος σκουριάς στην αρχή που αργότερα μεγαλώνουν σε συγκεντρικούς κύκλους, γίνονται καστανές και μαλακώτερες και καλύπτονται από καστανή εξάνθηση. Τα συμπτώματα αυτά βέβαια μπορεί να διαφέρουν από ξενιστή σε ξενιστή. Οσον αφορά την Ελλάδα ο μύκητας έχει βρεθεί σε όλη τη χώρα και προκαλεί ζημιές σε ευρύ φάσμα ξενιστών.

Στη γαρυφαλλιά ο *R. solani* προξενεί ζημιές στα νεαρά φυτά. Η ασθένεια εμφανίζεται νωρίς μετά την φύτευση των μοσχευμάτων και ευνοείται από υψηλή υγρασία και θερμοκρασία.

Τα νεαρά φυτά προσβάλλονται στην περιοχή του λαιμού. Συμπτώματα της προσβολής φαίνονται στις Εικόνες 3 & 4. Η ασθένεια εκδηλώνεται στο υπέργειο μέρος του φυτού με σταδιακή χλώρωση του φυλλώματος και μάρανση. Η σήψη στο λαιμό του φυτού είναι ξηρή και φελλώδης ενώ αν ο λαιμός είναι ακόμα νεαρός και πράσινος εμφανίζεται υγρή και γλοιώδης. Ο μύκητας εισέρχεται στους ξυλώδεις ιστούς και προχωρεί στην

εντεριόνη (Forsberg, 1965). Βρέθηκε ότι προκαλεί ζημιές στη γαρυφαλλιά στη χώρα μας σε αρκετές περιπτώσεις.

Σημαντικό όσον αφορά την επιδημιολογία των ασθενειών που προκαλεί ο μύκητας, είναι ότι μπορεί να ζει σαπροφυτικά στο έδαφος, στα φυτικά υπολείμματα της καλλιέργειας ή και να φιλοξενείται στη ριζόσφαιρα διαφόρων ζιζανιών και όταν οι συνθήκες γίνουν ευνοϊκές προσβάλλει καλλιεργούμενα φυτά.



Εικόνα 3. Φυτά γαρυφαλλιάς προσβεβλημένα από τον μύκητα *R. solani*. Φαίνονται καθαρά τα συμπτώματα προσβολής στο λαιμό των φυτών.



Εικόνα 4. Επιμήκης τομή ενός από τα παραπάνω φυτά όπου φαίνεται το μέγεθος της ζημιάς στην περιοχή του λαιμού

Ακόμη έχει την ικανότητα να παράγει σκληρώτια πεπλατυσμένα καστανού χρώματος ανθεκτικό στις αντίξοες συνθήκες που θεωρούνται όργανα διασποράς και διαδόσεως του παθογόνου. Ο μύκητας μπορεί να διαδοθεί με το νερό άρδευσης, τις καλλιεργητικές εργασίες καθώς και το πολλαπλασιαστικό υλικό.

Όσον αφορά την τέλεια μορφή, τα βασιδιοσπόρια, φαίνεται να παίζουν κάποιο ρόλο στη διάδοσή του. Για την αντιμετώπιση της ασθένειας συνιστάται η απολύμανση του εδάφους που εφαρμόζεται στην υπό κάλυψη καλλιέργεια της γαρυφαλλιάς, και η εφαρμογή μετά την φύτευση του μυκητοκτόνου quintozene (Ανώνυμος, 1985).

1.3. ΟΜΑΔΕΣ ΑΝΑΣΤΟΜΩΣΗΣ

Η μεγάλη ποικιλομορφία και οι διαφορές στην παθογένεια, την μορφολογία των σκληρωτίων, την μορφή της αποικίας, φυσιολογικούς χαρακτήρες κλπ, έκανε τους ερευνητές να πιστέψουν πως ο μύκητας έχει πολλές ταξινομικές ομάδες μέσα στο είδος (intraspecific groups, ISG's). Υπήρξαν πολλές προσπάθειες να διαιρεθεί το είδος *R. solani* σε λογικές ομάδες. Οι προσπάθειες αυτές εντάσσονται σε δυο κατηγορίες.

Αυτές που βασίζονται σε διαφορές στην παθογένεια, μορφή αποικίας, μορφολογία, φυσιολογία, οικολογία (Exner 1953), και αυτές που βασίζονται στην διάκριση ομάδων αναστόμωσης.

Η αναστόμωση των υφών είναι μια ιδιότητα που χαρακτηρίζει όχι μόνο τον μύκητα *R. solani* αλλά και άλλους ανώτερους μύκητες.

Οι αναστομώσεις ευνοούν την ανθεκτικότητα του μυκηλιακού δικτύου και επιτρέπουν την ανταλλαγή γενετικού υλικού.

Αναστομώσεις μπορεί να υπάρξουν μεταξύ διαφορετικών θαλλών του ίδιου είδους αλλά και πιο σπάνια μεταξύ διαφορετικών αλλά συγγενικών μεταξύ τους ειδών (Μπαλής 1987).

Όταν δυο απομονώσεις του *R. solani*, μπουν σε υπόστρωμα καλλιέργειας (συνήθως νερό με άγαρ) το μυκήλιο μεγαλώνει από τις δυο απομονώσεις και επικαλύπτεται. Προσεκτική μικροσκοπική παρατήρηση σε μικρή μεγένθυση δείχνει ότι υφές που ανήκουν στην ίδια ομάδα αναστόμωσης, εμφανίζουν έλξη μεταξύ τους και αναστομώνονται. Αναστομώσεις γίνονται κατά κανόνα μόνον μεταξύ απομονώσεων που ανήκουν στην ίδια ομάδα.

Η διαδικασία σύντηξης των υφών περιλαμβάνει τροπισμό, επαφή των υφών, σταμάτημα της αύξησης, σχηματισμό προεξοχών που μοιάζουν με διακλαδώσεις της υφής, διάλυση του κυτταρικού τοιχώματος, επαφή των πρωτοπλάσμάτων Και συχνά αλλοίωση (νέκρωση) του πρωτοπλάσματος που έρχεται σε σύντηξη.

Όσον αφορά τον μύκητα *R. solani*, παρατηρήθηκε ότι η ικανότητα αναστόμωσης μεταξύ των απομονώσεων μπορεί να κατατάξει την κάθε απομόνωση σε συγκεκριμένη ομάδα αναστόμωσης που συνδέεται με συγκεκριμένες ιδιότητες όπως η παθογένεια στους διάφορους ξενιστές. Έτσι καθιερώθηκαν οι διάφορες ομάδες αναστόμωσης (anastomosis groups), που τα τελευταία χρόνια συνεχώς αυξάνουν σε αριθμό.

Το φαινόμενο της αναστόμωσης των υφών ήταν γνωστό από παλιά. Το 1936 πρώτος ο Schultz κατέταξε τον *R. solani* σε ομάδες αναστόμωσης αριθμώντας τις πέντε ομάδες που βρήκε από I μέχρι V.

Οι Richter & Schneider το 1953 ονόμασαν 6 ομάδες αναστόμωσης που βρήκαν με τα γράμματα A, B, C, D, E, και F. Αργότερα αποδείχθηκε ότι τόσο η ομάδα V του Schultz όσο και η ομάδα F των Richter & Schneider ήταν διπύρηνες και συνεπώς δεν ανήκαν στο είδος *R. solani*. Το ενδιαφέρον των επιστημόνων αναθερμάνθηκε μετά από την εργασία των Parmeter et al (1969), που διέκριναν 4 ομάδες αναστόμωσης (AG-1, AG-2, AG-3, AG-4).

Σπουδαία ήταν η συμβολή Ιαπώνων επιστημόνων στην έρευνα επί των ομάδων αναστόμωσης. Ο Ogoshi (1972) κατέταξε μεγάλο αριθμό απομονώσεων σε ομάδες αναστόμωσης με βάση την εργασία των Parmeter et al και κατέληξε να χωρίσει την ομάδα AG-2 σε δύο υποομάδες τις AG-2-1 και AG-2-2, με βάση την συχνότητα αναστόμωσης μεταξύ στελεχών δύο διαφορετικών υποομάδων, που είναι πολυ σπάνιες, ενώ είναι συχνές μεταξύ στελεχών της ίδιας υποομάδας.

Οι Kuninaga et al (1978) πρόσθεσαν την ομάδα AG-6 και τις απομονώσεις AG-BI (bridging isolates). Οι Homna et al (1983) βρήκαν την ομάδα AG-7 και οι Neate & Warcup (1985) την ομάδα AG-8.

Η ομάδα AG-BI έχει την ικανότητα να αναστομώνει συχνά με την AG-2-2 και σπανιότερα με τις AG-2-1, AG-3, AG-6 και AG-8. Ομοίως η ομάδα αναστόμωσης AG-8 μπορεί να κάνει αναστομώσεις με τις AG-2-1 και AG-2-2. Οι απομονώσεις αυτές είναι ενδιαφέρουσες από φυλογενετικής πλευράς.

Έτσι δημιουργήθηκαν οι διάφορες ομάδες αναστόμωσης (anastomosis groups) του μύκητα *R. solani* που βρέθηκε να σχετίζονται με ορισμένες ιδιότητες όπως πχ. την παθογένεια που εμφανίζουν τα μέλη της ομάδας έναντι ορισμένων ξενιστών. Ωστόσο οι

ομάδες αναστόμωσης εξελίσσονται και βρίσκονται συνεχώς καινούριες ενώ υπάρχουν πολλές απομονώσεις του μύκητα που δεν έχουν ενταχθεί ακόμα σε ομάδα αναστόμωσης. Οι Adams & Butler (1979) μελέτησαν τις ορρολογιές ιδιότητες διαφορετικών ομάδων αναστόμωσης και βρήκαν αντιστοιχία των ομάδων αυτών με τις ορρολογικές ομάδες. Ομοίως οι Kununaga & Yokosawa (1980) βρήκαν αντιστοιχία στην σύνθεση των βάσεων (περιεκτικότητα γουανίνης + κυτοσίνης) και στις ομάδες αναστόμωσης. Οι ίδιοι ερευνητές σε μετέπειτα έρευνές τους (1985) βρήκαν υψηλό βαθμό αντιστοιχίας στην ακολουθία των βάσεων σε στελέχη της ίδιας ομάδας (>90%) ενώ μεταξύ στελεχών διαφορετικών ομάδων η αντιστοιχία ήταν μικρότερη (30-89%). Ομοίως ο Vilgalis (1988), μελέτησε με την ίδια μέθοδο του υβριδισμού του DNA την γενετική συσχέτιση απομονώσεων διαφόρων ομάδων αναστόμωσης και επιβεβαίωσε προηγούμενα ευρήματα. Οι χαμηλότερες τιμές συσχέτισης βρέθηκαν μεταξύ διπύρηνων και πολυπύρηνων απομονώσεων που δικαιολογεί και τον ταξινομικό διαχωρισμό των ομάδων και των τελείων μορφών *Thanatephorus* και *Ceratobasidium*. Απομονώσεις διαφορετικών ομάδων αναστόμωσης είχαν τιμές μικρότερες του 25% ενώ μέλη της ίδιας ομάδας είχαν υψηλό ποσοστό αντιστοιχίας (30-100%).

Η τέλεια μορφή όλων των ομάδων αναστόμωσης ανήκει στο είδος *Thanatephorus cucumeris*. Καμμιά μορφολογική διαφορά δεν διακρίνει την τέλεια μορφή των διαφόρων ομάδων αναστόμωσης, εκτός της ομάδας AG-4, όπου τα βασίδια φέρουν 3 στηρίγματα αντί των τεσσάρων που φέρουν οι άλλες ομάδες αναστόμωσης. Η αδυναμία να διακριθούν οι ομάδες αναστόμωσης με μορφολογικά χαρακτηριστικά είναι και η αιτία που ο *R. solani* θεωρείται ένα είδος και διαιρείται σε υποομάδες αντί κάθε υποομάδα να θεωρηθεί ξεχωριστό είδος.

1.4. ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΩΝ ΟΜΑΔΩΝ ΑΝΑΣΤΟΜΩΣΗΣ

Από όσα παρατέθηκαν μέχρι τώρα είναι φανερό ότι το είδος *R. solani* παρουσιάζει μεγάλη γενετική ποικιλομορφία που θα πρέπει να βρεθεί τρόπος να περιγραφεί. Οι ομάδες αναστόμωσης είναι η πιο χρήσιμη κατάταξη μια και το φαινόμενο αυτό υποδηλώνει δυνατότητα ανταλλαγής γενετικού υλικού μεταξύ στελεχών της ίδιας ομάδας ενώ ομάδες που δεν αναστομώνονται μεταξύ τους (ούτε μέσω ομάδας «γέφυρας»), ακολουθούν χωριστή εξέλιξη. Αυτό ενισχύεται και από τα αποτελέσματα μελέτης της αλληλουχίας των βάσεων του DNA των διαφόρων ομάδων αναστόμωσης (Ogoshi, 1987). Η οικολογική συμπεριφορά είναι χαρακτηριστική ορισμένων ομάδων. Έτσι, π.χ. οι ομάδες AG-6 και AG-BI απομονώθηκαν μόνο από δασικά εδάφη και έπαψαν να απομονώνονται όταν τα εδάφη

καλλιεργήθηκαν ενώ οι ομάδες AG-5, AG-7, και AG-8 απομονώθηκαν μόνο από καλλιεργούμενα εδάφη.

Το είδος της καλλιέργειας παίζει ρόλο στην επικράτηση ορισμένων ομάδων αναστόμωσης (Ogoshi 1983). Ακόμα υπάρχει εξειδίκευση μεταξύ ομάδων αναστόμωσης, ξενιστών και ασθeneιών που προκαλούν. Έτσι είναι γνωστό ότι η ομάδα AG-1 προσβάλλει Leguminosae και Gramineae. Εκτός των άλλων, προσβάλλει τον κολεό του ριζιού (sheath blight), η ομάδα AG-2-1 τα Cruciferae και η ομάδα AG-2-2 τα Chenopodiaceae (τεύτλα), η ομάδα AG-3 προσβάλλει σχεδόν αποκλειστικά σολανώδη, η ομάδα AG-4 Chenopodiaceae, Leguminosae και Solanaceae ενώ η AG-5 απαντά στα Leguminosae και στο έδαφος.

Παρόλα αυτά η συμπεριφορά του μύκητα δεν μπορεί να ερμηνευτεί μόνο από την ομάδα αναστόμωσης που ανήκει. Έτσι συχνά απομονώσεις της ίδιας ομάδας αναστόμωσης με ίδια μορφολογικά χαρακτηριστικά καλλιέργειας, μπορεί να προσβάλλουν διαφορετικούς ξενιστές δημιουργώντας διαφορετικά συμπτώματα (Ogoshi 1987). Η παθογένεια των λοιπών ομάδων δεν είναι γνωστή.

Η γεωγραφική εξάπλωση των ομάδων αναστόμωσης δεν έχει ερευνηθεί συστηματικά αλλά από τις μέχρι τώρα δημοσιεύσεις είναι γνωστό ότι οι ομάδες AG-1, AG-2-1, AG-2 AG-3 και AG-4, έχουν αναφερθεί σε όλο σχεδόν τον κόσμο. Η AG-5 έχει αναφερθεί στην Ιαπωνία, Ταϊβάν, Γερμανία, Ισραήλ, Ηνωμένες Πολιτείες, Καναδά. Η AG-6 σε Ιαπωνία και Ισραήλ, η AG-7 και AG-BI στην Ιαπωνία και η AG-8 στην Αυστραλία. Όμως επειδή οι ομάδες με αριθμό 5, 6, 7, και 8 βρέθηκαν σχετικά πρόσφατα, είναι πολύ πιθανόν να υπάρχουν σε πολλά ακόμα μέρη.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΔΕΥΤΕΡΟ

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑΣ ΔΙΑΦΟΡΩΝ ΑΠΟΜΟΝΩΣΕΩΝ ΤΟΥ *Rhizoctonia solani* ΣΕ ΦΥΤΑ ΓΑΡΥΦΑΛΙΑΣ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ενενήντα μια απομονώσεις του *Rhizoctonia solani* συλλέχτηκαν κατά την διάρκεια της παρούσας εργασίας. Από αυτές οι 58 από αγρό γαρυφαλλιάς και βρέθηκαν όλες ότι ανήκουν στην ομάδα αναστόμωσης AG4 και 33 άλλες από διάφορες καλλιέργειες που εντάχθηκαν σε διάφορες ομάδες αναστόμωσης ενώ μερικές από αυτές βρέθηκαν να είναι διπύρηνες. Η δοκιμή παθογένειας που έγινε σε μοσχεύματα γαρυφαλλιάς με ορισμένες από τις παραπάνω απομονώσεις έδειξε διαφορές στην παθογένεια μεταξύ των στελεχών χωρίς όμως να προκαλέσουν σοβαρά συμπτώματα ασθένειας.

Σε μια προσπάθεια μελέτης του πληθυσμού του παθογόνου μύκητα *Rhizoctonia solani* στη γαρυφαλλιά στη χώρα μας, έγιναν απομονώσεις από έδαφος αγρού που καλλιεργούταν με γαρυφαλλιά επί σειρά ετών και όπου είχαν προηγηθεί επεμβάσεις ηλιοαπολυμάνσεις και προσθήκης ανταγωνιστικών μικροοργανισμών παράλληλα έγιναν απομονώσεις του ίδιου μύκητα από άλλα εδάφη όπως δασικά, αμπελιού βαμβακιού, χρυσάνθεμου κ.α, καθώς και από ασθενή φυτά γαρυφαλλιάς.

Τα αποτελέσματα απομονώσεων του *R. solani* από έδαφος, που έχει προηγουμένως υποστεί διάφορους χειρισμούς, έδειξαν ότι ο πληθυσμός του παθογόνου μειώνεται μετά την εφαρμογή ηλιοαπολύμανσης ή του ανταγωνιστικού μύκητα *Trichoderma harzianum*.

Σαράντα εννέα (49) απομονώσεις του *R. solani* από το έδαφος του αγρού γαρυφαλλιάς βρέθηκαν ότι ανήκουν στην ομάδα αναστόμωσης AG4. Ομοίως εννέα (9) απομονώσεις από άλλους αγρούς γαρυφαλλιάς και ασθενή φυτά ανήκουν στην ίδια ομάδα. Αντιθέτως απομονώσεις από φυτά και έδαφος άλλων καλλιεργειών ή δασικά, ανήκαν σε διάφορες ομάδες αναστόμωσης ή δεν εντάχθηκαν σε ομάδες αναστόμωσης, ήταν διπύρηνες. Οι διπύρηνες απομονώσεις κυριαρχούσαν στα δασικά εδάφη και αμπελώνα. τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η γαρυφαλλιά ως ξενιστής του *R. solani* ασκεί πίεση επιλογής στα παθογόνα στελέχη του μύκητα που ανήκουν στην ομάδα αναστόμωσης AG4.

Οι δοκιμές παθογένειας έδειξαν ότι στελέχη που ανήκαν στις ομάδες αναστόμωσης AG 2-2 και AG 4 είχαν αυξημένη παθογένεια στη γαρυφαλλιά έναντι στελεχών άλλων ομάδων.

Φυτά γαρυφαλλιάς που βρέθηκαν κάτω συνθήκες καταπόνησης (stress) ήταν περισσότερο ευπαθή σε όλα τα στελέχη του μύκητα και ιδιαίτερα στα παθογόνα στελέχη των ομάδων αναστόμωσης AG 2-2 και AG 4.

2.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο μύκητας *R. solani* έχει βρεθεί σε πολύ μεγάλο αριθμό ξενιστών. Ωστόσο, δεν έχουν μελετηθεί επαρκώς οι διαφορές αφ' ενός της παθογένειας των απομονώσεων του μύκητα και αφ' ετέρου του φυτικού γενετικού υλικού. Η σχετικά πρόσφατη έμφαση στην μελέτη των ομάδων αναστόμωσης φέρνει το θέμα πάλι στο προσκήνιο. Θα πρέπει η μελέτη παθογένειας - ανθεκτικότητας να επικεντρωθεί στις απομονώσεις εκείνες που ανήκουν στις ομάδες αναστόμωσης που προκαλούν τις ζημιές.

Ο πληθυσμός του μύκητα συνήθως αυξάνεται κατά την διάρκεια της καλλιεργητικής περιόδου προφανώς λόγω της παρουσίας του ξενιστή. Οι Uí et al (1965) διαπίστωσαν μια τέτοια αύξηση σε καλλιέργεια σακχαροτεύτλου. Οι Inoue & Uí (1974), διαπίστωσαν ότι στις απομονώσεις από αγρό σακχαροτεύτλου κυριαρχούσε η ομάδα AG-2-2. Σε αγρό με καλλιέργεια φασολιού κυριαρχούσε η ομάδα AG-5 και ακολουθούσε η AG-4. Οι Komoto et al 1970) μελέτησαν την επίδραση που είχε η εναλλαγή καλλιεργειών τεύτλου και φασολιού στους πληθυσμούς των ομάδων αναστόμωσης του μύκητα. Με συνεχή καλλιέργεια του σακχαροτεύτλου αυξάνετο ο πληθυσμός των ομάδων AG-2-2 ενώ οι AG-1 και AG-5 μειώνονταν. Με την καλλιέργεια του φασολιού αυξάνονταν η ομάδα AG-5.

Οι Yoshida & Kobayashi (1985) παρατήρησαν έντονη προσβολή της ρίζας του ραπανιού (AG-2-2) μετά από λειμώνια φυτά. Όλα αυτά δείχνουν την μεγάλη σημασία της καλλιέργειας στην συνθεση του πληθυσμού του μύκητα στο έδαφος που θα πρέπει να το παίρνουμε υπόψη στον καθορισμό των αμειψισπορών.

Ο ρόλος των βασιδιοσπορίων στην επιδημιολογία είναι ασαφής. Υπάρχουν αναφορές στην βιβλιογραφία και κυρίως για χώρες όπως η Ιαπωνία όπου βρέθηκε ότι στελέχη της ομάδας AG-2-2 παράγουν βασιδιοσπόρια πάνω στο έδαφος ή πάνω στους ξενιστές που ακολούθως μπορούν να μεταφερθούν και να προκαλέσουν νέες μολύνσεις.

Ένα οικολογικό φαινόμενο που μελετάται τελευταία πολύ στα εδαφογενή παθογόνα είναι η ιδιότητα ορισμένων εδαφών να καταστέλλουν την εκδήλωση της ασθένειας παρά την παρουσία παθογόνου και ξενιστού (suppressive soils). Εδάφη ελαφρά όξινα, που δεν επιτρέπουν την εκδήλωση ασθένειας από *R. solani* έχουν βρεθεί στην Ολλανδία (Jager & Velvis, 1983). Ένα άλλο ενδιαφέρον φαινόμενο είναι η «παρακμή» της ασθένειας (disease decline) όπου σε περιπτώσεις μονοκαλλιέργειας η ένταση της ασθένειας αυξάνει τα πρώτα χρόνια, φτάνει σε ένα μέγιστο, ακολούθως μειώνεται και σταθεροποιείται σε ένα σχετικά χαμηλό και ανεκτικό επίπεδο. Έτσι σε πειράματα με τεύτλα παρατηρήθηκε ότι η ασθένεια αυξήθηκε τα τρία πρώτα χρόνια, τον τέταρτο χρόνο σταθεροποιήθηκε και τον πέμπτο χρόνο μειώθηκε (Ogoshi, 1987).

Πειράματα βιολογικής καταπολέμησης του μύκητα έχουν γίνει πολλά με βακτήρια και μύκητες (Jager & Velvis, 1984). Ενδιαφέρον παρουσιάζουν και μελέτες σχετικά με ιούς που έχουν βρεθεί στην ομάδα AG-4 καθώς και διπλής έλικας RNA (dsRNA) (Anderson, 1982).

2.2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.2.1. ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ ΕΔΑΦΟΥΣ

Η δειγματοληψία του εδάφους γινόταν ως εξής: Σε ορισμένο σημείο του αγρού απομακρύνονταν το επιφανειακό στρώμα εδάφους με τα πολλά φυτικά υπολείμματα, παίρνονταν χώμα από βάθος 5-10 cm. Όλα τα δείγματα χώματος μετά την δειγματοληψία τοποθετούνταν σε πλαστική σακούλα και έμπαιναν όσον το δυνατόν γρηγορότερα στο ψυγείο (5 οC) μέχρι να χρησιμοποιηθούν.

2.2.2. ΧΕΙΡΙΣΜΟΣ ΦΥΤΙΚΩΝ ΥΠΟΛΕΙΜΜΑΤΩΝ ΑΠΟ ΤΟ ΕΔΑΦΟΣ

Για την απομόνωση του *R. solani* από φυτικά υπολείμματα στο έδαφος χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος διαχωρισμού φυτικών υπολειμμάτων των Boosalis & Scharen (1959). Κατ' αυτή τη μέθοδο από κάθε δείγμα χώματος λαμβάνονταν μια ποσότητα χώματος, περίπου 5 g, έμπαιναν σε μία κωνική φιάλη των 3 l μαζί με ένα περίπου λίτρο

νερού βρύσης. Το αιώρημα ανακινιόταν δυνατά και αφήνοταν να ηρεμήσει για 30'. Μετά το υπερκείμενο νερό χύνονταν σε ένα κόσκινο 60 mesh (0,3 χιλιοστά άνοιγμα) που συγκρατούσε τα αιωρούμενα φυτικά υπολείμματα. Η εργασία αυτή επαναλαμβανόταν 2-3 φορές με το ίδιο χώμα, μέχρι να συλλεγεί αρκετή ποσότητα φυτικών υπολειμμάτων. Τα φυτικά υπολείμματα που συλλέγονταν με αυτό τον τρόπο μεταφέρονταν σε διηθητικό χαρτί για να στεγνώσουν και μετά σε τριβλία με εκλεκτικό υλικό (βλ. παρ. 2.2.3.). Η επιλογή των τεμαχίων γινόταν κατά το δυνατόν τυχαία. Σε κάθε τριβλίο εμπαιναν 9 τεμάχια και επωάζονταν στους 25 °C για 24-48 ώρες.

2.2.3. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΚΑΙ ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΟΥ ΕΚΛΕΚΤΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ

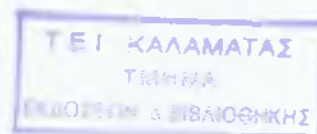
Το εκλεκτικό υλικό για την απομόνωση του *R. solani* (Ko & Hora, 1971) περιείχε σε ένα λίτρο νερού τα ακόλουθα συστατικά:

- 1 g K_2HPO_4 ,
- 0,5 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$,
- 0,5 g KCl,
- 0 mg $FeSO_4 \cdot 7H_2O$,
- 0,2 g $NaNO_2$,
- 0,4 g gallic acid,
- 90 mg dexon (Bayer AG 70%),
- 50 mg chloramphenicol (Sigma),
- 50 mg streptomycin (Exportor Vio Medexport) και
- 20 g άγαρ.

Για την παρασκευή του υλικού, αρχικά προστίθενται τα ανόργανα άλατα και το άγαρ σε 1 λίτρο νερού και το υλικό θερμαίνεται μέχρι να έρθει σε βρασμό και να διαλυθεί το άγαρ. Κατόπιν το υλικό αποστειρώνεται για 20 λεπτά σε πίεση μιας ατμόσφαιρας στον υγρό κλίβανο. Όταν βγει από τον κλίβανο αφήνεται να κρυώσει και όταν είναι περίπου 50 °C, προστίθενται τα αντιβιοτικά που είναι ευπαθή στις υψηλές θερμοκρασίες.

Το υλικό μοιραζόταν σε γιάλινα τριβλία Petri διαμέτρου 9 cm, περίπου 10 ml υλικού ανά τριβλίο. Τα τριβλία χρησιμοποιούνταν αμέσως ή φυλάσσονταν για μικρό χρονικό διάστημα στους 5 °C, κλεισμένα σε πλαστική σακούλα, μέχρι να χρησιμοποιηθούν.

2.2.4. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΤΟΥ *R. solani*



Τα τριβλία επωάζονταν για μια μέρα στους 25 οC και εξετάζονταν, τοποθετώντας ολόκληρο το τριβλίο κάτω από το μικροσκόπιο και με αντικειμενικό φακό X 10. Επειδή ο μύκητας *R. solani* μεγαλώνει γρήγορα σ' αυτό το υλικό, ήταν δυνατόν να ανιχνεύονται νεαρές υφές του μύκητα ακόμη και μετά από επώαση 24 ωρών. Οι υφές αυτές όμως δεν ήταν ακόμα αρκετά μεγάλες ώστε να μεταφερθούν. Ακόμα επειδή και άλλοι μύκητες, όπως του γένους *Fusarium* και άλλα απροσδιόριστα είδη που δεν παρεμποδίζονται ικανοποιητικά από το εκλεκτικό υλικό άρχιζαν να αναπτύσσονται, η μεταφορά γίνονταν την δεύτερη ημέρα επώασης όταν οι υφές του *R. solani* είχαν αυξηθεί σημαντικά σε σχέση με τους άλλους μύκητες και ήταν πλέον εμφανής η διάκριση των τεμαχίων φυτικών υπολειμμάτων που έδωσαν αποικία του *R. solani*. Η συλλογή των απομονώσεων που δημιουργήθηκε μ' αυτό τον τρόπο διατηρήθηκε σε σωλήνες με Potato Dextrose Agar (PDA). Για την παρασκευή ενός λίτρου από αυτό το υλικό βράζονται 200 g πατάτας και το εκχύλισμα στραγγίζεται. Προστίθενται 15 g γλυκόζης και 15 g agar, συμπληρώνεται ο όγκος με απεσταγμένο νερό στο ένα λίτρο, θερμαίνεται μέχρι να λιώσει το άγαρ και αποστειρώνεται για 20 λεπτά σε μία ατμόσφαιρα.

Το σκέτο άγαρ (PA) παρασκευάζεται με προσθήκη 20 g άγαρ σε 1 λίτρο απεσταγμένο νερό και ακολουθεί αποστείρωση σε πίεση μιας ατμόσφαιρας για 20 λεπτά.

2.2.5. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΤΟΥ *R. solani* ΑΠΟ ΕΔΑΦΟΣ ΑΜΠΕΛΩΝΩΝ

Προκειμένου να διαπιστωθεί κατά πόσο ο μύκητας *R. solani* υπάρχει και σε εδάφη που καλλιεργείται φυτό που δεν είναι ξενιστής του μύκητα, επιλέχτηκε το αμπέλι μια πολυετής καλλιέργεια που δεν έχει αναφερθεί - τουλάχιστον στην Ελλάδα - ότι προσβάλλεται από αυτόν τον μύκητα. Για το σκοπό αυτό επιλέχτηκε ένας αμπελώνας στο Πικέρμι Αττικής απ συγκεντρώθηκαν 15 δείγματα εδάφους από ισάριθμες θέσεις του αμπελώνα. Συγχρόνως πάρθηκαν και μεμονωμένα δείγματα από αμπελώνες της περιοχής Μαραθώνα.

Από κάθε δείγμα εδάφους απομονώθηκαν 27 τεμάχια φυτικών υπολειμμάτων που επωάστηκαν σε τριβλία με εκλεκτικό υλικό.

2.2.6. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΤΟΥ *R. solani* ΑΠΟ ΕΔΑΦΟΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΓΑΡΥΦΑΛΙΑΣ

Για τη μελέτη αυτή χρησιμοποιήθηκαν δείγματα εδάφους προερχόμενα από πειραματικό αγρό υπαίθριας καλλιέργειας γαρυφάλλου στην περιοχή Τροιζηνίας. Ο αγρός αυτός καλλιεργείται με γαρυφαλλιά επι σειρά ετών και έχει εγκατασταθεί πείραμα μελέτης του μύκητα *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* από το Εργαστήριο Μυκητολογίας του Μ.Φ.Ι. Οι επεμβάσεις που είχαν εφαρμοστεί στο έδαφος αν και δεν αφορούν άμεσα ούτε σχεδιάστηκαν για την παρούσα μελέτη, έχουν ενδιαφέρον γιατί αφορούν την καταπολέμηση ενός εδαφογενούς παθογόνου, Αυτές ήταν:

- 1) Ηλιοαπολύμανση (SS)
- 2) Ενσωμάτωση στο έδαφος του ανταγωνιστή μύκητα *Trichoderma harzianum* (T)
- 3) Ενσωμάτωση στο έδαφος του βακτηρίου *Pseudomonas fluorescens*
- 4) Εφαρμογή του απολυμαντικού εδάφους Dazomet (D)
- 5) Ηλιοαπολύμανση και κατόπιν προσθήκη στο έδαφος του βακτηρίου *P. fluorescens* (SSB).
- 6) Ηλιοαπολύμανση και κατόπιν προσθήκη στο έδαφος του μύκητα *Trichoderma harzianum* (SST)
- 7) Μάρτυρας (C)

Η απομόνωση του μύκητα *R. solani* έγινε με διαχωρισμό των φυτικών υπολειμμάτων από το έδαφος και κατόπιν τοποθέτηση τους σε εκλεκτικό υλικό. Υπήρχαν 4 επαναλήψεις σε κάθε επέμβαση και από κάθε μία πάρθηκε ένα δείγμα. Από κάθε δείγμα εδάφους πάρθηκαν 27 τεμάχια φυτικών υπολειμμάτων που τοποθετήθηκαν σε τριβλία με εκλεκτικό υλικό (3 τριβλία με 9 τεμάχια το καθένα).

2.2.7. ΑΠΟΜΟΝΩΣΕΙΣ ΑΠΟ ΑΣΘΕΝΗ ΦΥΤΑ.

Κατά καιρούς έρχονταν στο εργαστήριο μυκητολογίας του Μπενακείου Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου δείγματα φυτών για εξέταση, με προσβολή από *R. solani*. Τα φυτά πλένονταν με νερό βρύσης και κατόπιν κόβονταν μικρά τεμάχια ιστών από τα σημεία

της προσβολής. Τα τεμάχια πλένονταν σε τρεχούμενο νερό βρύσης επί μια περίπου ώρα στέγνωσαν με διηθητικό χαρτί και τοποθετούταν σε

εκλεκτικό υλικό. Η εξέταση των αποικιών και η μεταφορά σε σωλήνες με PDA γινόταν όπως περιγράφηκε στην προηγούμενη παράγραφο.

2.2.8. ΔΙΑΤΗΡΗΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΜΟΝΩΣΕΩΝ

Οι απομονώσεις του *R. solani* διατηρήθηκαν καθ' όλη την διάρκεια της παρούσας μελέτης, σε σωλήνες με PDA και μεταφορά σε καινούριο υλικό κάθε 3-4 μήνες. Παράλληλα έγινε δοκιμή μακράς διατήρησης με την μέθοδο του Butler (1980). Η δοκιμή αυτή κρίθηκε αναγκαία λόγω του μεγάλου αριθμού απομονώσεων του μύκητα που συγκεντρώθηκε κατά την διάρκεια της μελέτης αυτής, λόγω των κινδύνων να χάσουν οι απομονώσεις κάποιες από τις ιδιότητές τους (π.χ. παθογένεια) και για την ασφαλή μακρόχρονη διατήρηση των στελεχών που εντάσσονται στη συλλογή του ΜΦΙ. Κατά την μέθοδο αυτή παρασκευάστηκε μίγμα με 96% έδαφος και 4% (κατά βάρος) πίτυρα. Τα υλικά αυτά αφέθηκαν να ξεραθούν στον αέρα και μετά κοσκινίστηκαν και ζυγίστηκαν. Χρησιμοποιήθηκαν γυάλινα φιαλίδια (μπιζού) διαστάσεων 5X 1,5 cm με μεταλλικό βιδωτό πώμα. Σε καθένα από αυτά τοποθετήθηκαν 2,5-3 μίγματος χώματος-πιτύρων και 1 ml νερό βρύσης, κατόπιν αποστειρώθηκαν για 20 λεπτά στην 1 ατμόσφαιρα και ακολούθησε και δεύτερη αποστείρωση μετά από 48 ώρες. Μετά την μόλυνση τα φιαλίδια επώαστηκαν στους 27 °C για 10 ημέρες και μετά τοποθετήθηκαν στους -25 °C.

2.2.9. ΤΕΧΝΙΚΗ ΔΟΚΙΜΩΝ ΑΝΑΣΤΟΜΩΣΗΣ

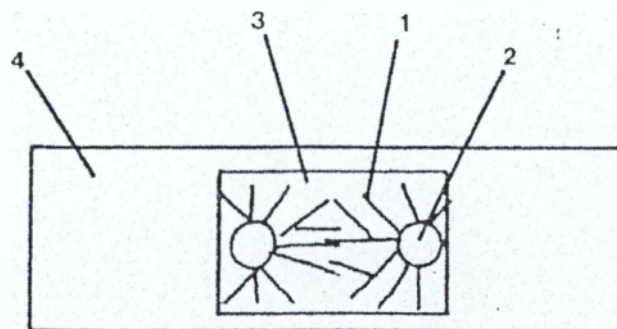
Προκειμένου να βρεθεί σε ποια ομάδα αναστόμωσης ανήκαν οι απομονώσεις που συλλέχτηκαν κατά την παρούσα εργασία, χρησιμοποιήθηκαν σαν “δοκιμαστές”, απομονώσεις γνωστής ομάδας από την συλλογή του εργαστηρίου μυκητολογίας του Μπεννακείου Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου. Τόσο οι δοκιμαστές όσο και οι άγνωστες απομονώσεις αρχικά καλλιεργούνταν σε τριβλία με PDA για 2-3 μέρες στους 25 °C ώστε να μεγαλώσουν αρκετά οι αποικίες.

Η δοκιμή αναστόμωσης γινόταν πάνω σε αντικειμενοφόρους που είχαν σκέτο άγαρ (ΡΑ) με τον εξής τρόπο: Από γυάλινα τριβλία που είχαν πολύ μικρή ποσότητα ΡΑ 2% έτσι

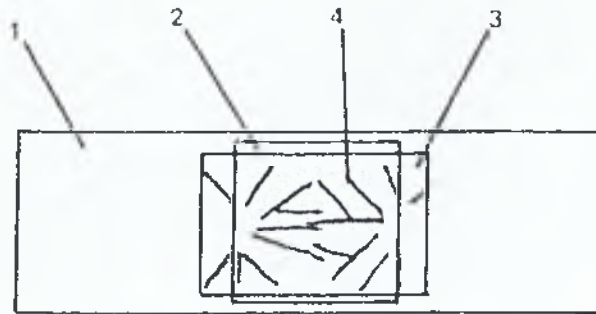
που να σχηματίζεται μια λεπτή στοιβάδα στον πυθμένα του, κόβονταν κομμάτια άγαρ διαστάσεων 2,5 X 3 cm και τοποθετούταν πάνω σε μιά αντικειμενοφόρο. Η αντικειμενοφόρος είχε προηγουμένως απολυμανθεί με εμβάπτιση σε οινόπνευμα και κάψιμο. Από τις καλλιέργειες των απομονώσεων κόβονταν δίσκοι άγαρ 5 mm από την παρυφή της αποικίας και τοποθετούταν πάνω στα κομμάτια του ΡΑ, πάνω στην αντικειμενοφόρο, κοντά στις μικρές πλευρές του. Στην μια πλευρά έμπαινε η άγνωστη απομόνωση και στην άλλη η γνωστή. Οι δίσκοι απείχαν μεταξύ τους περίπου 2,5-3 cm. Η διάταξη αυτή περιγράφεται στο Σχήμα 3. Οι αντικειμενοφόροι κατόπιν τοποθετούταν σε μικρές πλαστικές λεκάνες που στον πυθμένα τους είχαν υγρά διηθητικό χαρτί και όλη η λεκάνη τοποθετούταν σε καθαρή σακούλα από πολυαιθυλένιο για να μην έχει απώλειες υγρασίας. Η επώαση γινόταν στους 25 οC για 24 έως 48 ώρες. Κατά το χρονικό αυτό διάστημα νέες υφές αναπτύσσονταν από τους δίσκους και γινόταν μια επικάλυψη που επέτρεπε αναστομώσεις μεταξύ των διαφορετικών στελεχών εφόσον αυτά ήταν της ίδιας ομάδας. Η χρονική διάρκεια επώασης ώστε να ειδικαλυθούν τα δυο μυκήλια εξαρτιόταν από την ταχύτητα που μεγάλωναν οι διάφορες απομονώσεις.

Οι αντικειμενοφόροι μετά από επώαση, εξετάζονταν μακροσκοπικά για να διαπιστωθεί αν οι υφές από τα δύο στελέχη είχαν συναντηθεί και υπήρχε και αρκετή επικάλυψη. Η ανίχνευση των αναστομώσεων γινόταν στο μικροσκόπιο αφού πρώτα πάνω στο κομμάτι ΡΑ με τις υφές τοποθετείτο καλυπτρίδα. Η παρατήρηση γινόταν σε μεγέθυνση X100 και ασαφή σημεία εξετάζονταν σε μεγαλύτερες μεγεθύνσεις. Ο χαμηλός φωτισμός βοηθούσε να διακρίνονται οι αναστομώσεις.

Οι εικόνες 5, 6, 7 και 8 δείχνουν αναστομώσεις υφών όπως φαίνονται στο μικροσκόπιο.



1. Υφή μυκηλίου
2. Μυκηλιακός δίσκος 5 mm
3. Κομμάτι Ρ. Α.
4. Αντικειμενοφόρος



1. Αντικειμενοφόρος
2. Καλυπτρίδα
3. Κομμάτι Ρ.Α.
4. Μυκηλιακές υφές

Σχήμα 3. Απεικόνιση τεχνικών των δοκιμών αναστόμωσης



Εικόνα 5 Όψη του μυκηλίου κατά την δοκιμή αναστόμωσης στο σημείο αλληλοκάλυψης των δύο αποικιών (μικρή μεγέθυνση). Η μορφολογία του μυκηλίου επιτρέπει τον προσδιορισμό της προέλευσης του (στην εικόνα τα βέλη δεχθούν την φορά αύξησης. Στο κέντρο διακρίνονται αναστομώσεις).



Εικόνα 6 Αναστομώσεις υφών εικόνας 5 σε μικροσκόπιο αντιθέσεως φάσεως. Οι υφές στα σημεία αναστόμωσης (βέλη) είναι σκοτεινότερου χρώματος (άδειες).



Εικόνα 7



Εικόνα 8

Εικόνες 7 & 8. Αναστομώσεις υφών της εικόνας 6, σε μεγαλύτερη μεγέθυνση.

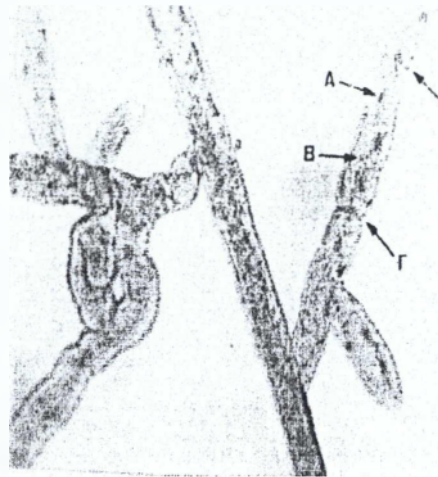
A, σημείο αναστόμωσης όπου το ένα μυκήλιο είναι κενό πρωτοπλάσματος
B & Γ σημεία όπου αμφότερα τα μυκήλια είναι κενά.
Το μυκήλιο με πρωτόπλασμα είναι στην εικόνα γκριζο και κοκκώδες.

2.2.10. ΧΡΩΣΗ ΠΥΡΗΝΩΝ

Για την χρώση πυρήνων χρησιμοποιήθηκε διάλυμα χρωστικής που παρασκευάστηκε με την προσθήκη 1% μπλέ της ανιλίνης (aniline blue) σε υδατικό διάλυμα γλυκερίνης 50%. Το διάλυμα αυτό οξινίστηκε ελαφρά με υδροχλωρικό οξύ. Η μέθοδος αυτή χρώσης των πυρήνων αναπτύχθηκε από τους Tu & Kimbrough (1973).

Από τις προς εξέταση καλλιέργειες, ηλικίας μιας περίπου εβδομάδας σε PDA κοβόταν ένα τεμάχιο 5 mm τοποθετείτο σε μια αντικειμενοφόρο και προσθέτοταν μια σταγόνα χρωστικής. Το σύνολο συμπιεζόταν με μια καλυπτρίδα και μετά 10 λεπτά εξετάζοταν στο μικροσκόπιο με μεγέθυνση X400. Οι πυρήνες βάφονταν μπλε και διακρίνονταν με πολύ δυνατό φωτισμό σαν σφαιρικές ή ελλειψοειδείς περιοχές με χρωματισμό βαθύτερο από την υπόλοιπη υφή (εικόνες 9, 10 και 11). Τα σέπτα φαίνονταν καλά και διακρίνονταν τα παρενθωσώματα που βάφονταν σκούρα μπλε. Συνήθως εξετάζονταν τα μονιλοειδή κύτταρα που είναι πολλά μαζί και έχουν σαφές περίγραμμα με ευδιάκριτο σέπτο και όχι τα νεαρά ακραία κύτταρα, επειδή σε αυτά συμβαίνουν μιτώσεις που μπορεί δημιουργήσουν σύγχυση.

Σε δοκιμές που έγιναν με την χρωστική cotton blue, βρέθηκε πως η χρωστική αυτή βάφει εντονότερα τους πυρήνες σε σχέση με την λοιπή υφή, όμως τα σέπτα δεν διακρίνονται καλά με αποτέλεσμα να μην είναι δυνατό να μετρηθεί με σιγουριά ο αριθμός των πυρήνων στο κύτταρο.

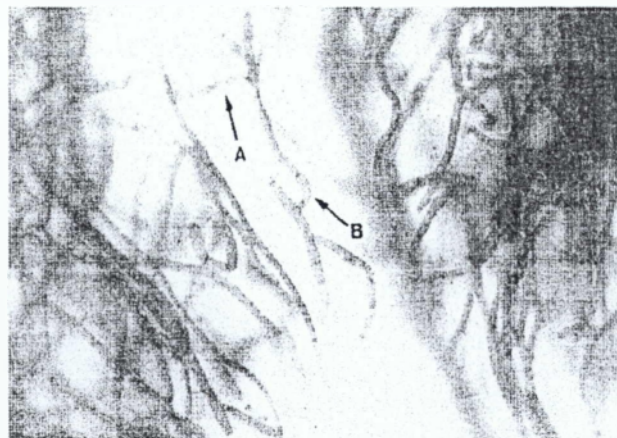


Εικόνα 9



Εικόνα 10

Εικόνες 9 & 10. Πολυπύρρηνο μυκήλιο του μύκητα *R. solani*. Χρησιμοποιήθηκε η χρωστική aniline blue. Διακρίνονται σαφώς τρεις πυρήνες σε κάθε «κύτταρο» (A), αλλά υπάρχουν και άλλοι πυρήνες εκτός εστίασης (B). Στην εικόνα αυτή φαίνεται η μορφολογία των σέπτων (Γ).



Εικόνα 11. Διπύρρηνο μυκήλιο. Η χρώση έγινε με aniline blue. Ο διπύρρηνος χαρακτήρας του μυκηλίου είναι εμφανής στα σημεία A και B.

2.2.11. ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΤΕΛΕΙΑΣ ΜΟΡΦΗΣ ΤΟΥ *Rhizoctonia solani*.

Η τέλεια μορφή του μύκητα (βασιδιακή) είναι ο πιο σίγουρος τρόπος αναγνώρισής του. Κατά τη διάρκεια της εργασίας αυτής έγιναν πολλές προσπάθειες για να επιτύχουμε τον σχηματισμό βασιδιοσπορίων από πολλές απομονώσεις του μύκητα. Αν και τα αποτελέσματα ήταν αρνητικά, είναι χρήσιμο να αναφερθούν οι προσπάθειες αυτές αφού μπορεί να δώσουν χρήσιμες πληροφορίες για τυχόν μελλοντικές ανάλογες προσπάθειες.

α) Μέθοδος των Uchida *et al.* (1986) σε υλικό με άγαρ.

Σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή παρασκευάστηκε υλικό V8 10% και 2%. Πυκνό εμπορικό εκχύλισμα λαχανικών (V8, Campbell), ρυθμιζόταν σε pH 6,3 με προσθήκη NaOH (15 ml 1N NaOH σε 400 ml V8). Κατόπιν παρασκευάζονταν 10% V8-agar (100 ml V8, 2 g CaCO₃, 18 g agar και 880 ml απεσταγμένο νερό) και 2% V8- agar (20 ml V8, 2 g CaCO₃, 18 g agar και 960 ml απεσταγμένο νερό). Τα υλικά μοιράστηκαν σε τριβλία 9 cm και μολύνθηκαν με στελέχη του *R. solani* και επωάστηκαν για 10 ημέρες στους 28 °C, και σε συνεχή φωτισμό, 1 μέτρο κάτω από 2 λάμπες φθορίου. Την ενδέκατη ημέρα η θερμοκρασία μειώθηκε στους 24 °C και από την δωδέκατη ημέρα γίνονταν συχνοί έλεγχοι για βασιδία και βασιδιοσπόρια.

β) Μέθοδος του Flentje σε υλικό με άγαρ (1956).

Κατά την μέθοδο αυτή χρησιμοποιήθηκε Potato-marmite-dextrose-agar (PMDA) και soil extract agar (SEA). Το πρώτο υλικό παρασκευάστηκε με 200 g πατάτας που κόπηκε σε λεπτές φέτες και θερμάνθηκε μαζί 500 ml απεσταγμένου νερού στους 85-90 °C σε υδατόλουτρο, για 30 λεπτά. Κατόπιν το εκχύλισμα στραγγίστηκε με τουλπάνι και αναμείχθηκε με 500 ml νερού όπου είχαν διαλυθεί 15 g agar, 20 h δεξτρόζη και 1 g marmite (εμπορικό σκεύασμα yeast extract). Το υλικό αυτό μπήκε σε γυάλινους σωλήνες. Το soil extract παρασκευάστηκε με 1kg ξηρό κοσκινισμένο έδαφος που προστέθηκε 1 λίτρο απεσταγμένο νερό και αποστειρώθηκε για 30 λεπτά στη 1 ατμόσφαιρα. Το αιώρημα χρώματος-νερού παρέμεινε για μια νύχτα και κατακάθησαν όλα τα στερεά. Το διαυγές υπερκείμενο νερό πέρασε από κοινό διηθητικό φίλτρο, προστέθηκαν 1 δεξτρόζη, 0,1 g yeast ext fact, 0,2 g KH₂PO₄ και 20 g agar και ο όγκος συμπληρώθηκε στο 1 λίτρο. Το pH του υλικού μετρήθηκε πριν να αποστειρωθεί και ήταν κοντά στο 7. Η αποστείρωση έγινε στην 1 atm επί 20 λεπτά. Κατόπιν το υλικό μοιράστηκε σε γυάλινα τριβλία. Οι σωλήνες με PM μολύνθηκαν με τα πιο κάτω στελέχη του μύκητα *R. solani*.

<u>Ομάδα αναστόμωσης</u>	<u>Στελέχη</u>
AG1	62.
AG2-1	4στ, 31β, 31γ.
AG2-2	29α, 26, 67, 50, 51, 60, 70.
AG3	76, 78, 79.
AG4	5β, 7α, 16β, 30β, 35α, 41.
AG5	75.

Οι σωλήνες επώαστηκαν στους 25 °C για 7 μέρες και μετά κομμάτια της καλλιέργειας χρησιμοποιήθηκαν για να μολύνουν τριβλία με SEA που επώαστηκαν και αυτά με την σειρά τους στους 25 οC για 7 μέρες. Κατόπιν τα τριβλία τοποθετήθηκαν στο εργαστήριο σε σκιερό μέρος και σε θερμοκρασία δωματίου όπου και παρέμειναν για διάστημα 20 περίπου ημερών και γινόταν τακτικά έλεγχος για τυχόν εμφάνιση βασιδιοσπορίων. Η τροποποίηση της παραπάνω μεθόδου που προτείνουν οι Garza-Chara & Anderson (1966) δοκιμάστηκε επίσης. Κατ' αυτήν ο μύκητας αναπτύσσεται σε PMDA για 72 ώρες στους 25 οC στο σκοτάδι. Από την άκρη της αποικίας κόβονται κομμάτια agar και μολύνουν τριβλία με σκέτο agar 2% σε νερό. Τα τριβλία επωάζονται στους 25 οC στο σκοτάδι για 8 μέρες και μετά τοποθετούνται σε σκιερό μέρος στους 25-27 οC. Γίνεται τακτικά έλεγχος για τυχόν εμφάνιση βασιδίων και βασιδιοσπορίων. γ) Μέθοδος των Kangatharalingam & Carson (1988):

Κόπηκαν δίσκοι διηθητικού χαρτιού (Whatman No1) και εμβαπτίσθηκαν σε 5% υδατικό διάλυμα Dithane M-45 Wettable powder. Σε τριβλία με 2% water agar τοποθετήθηκαν ασηπτικά οι εμβαπτισμένοι στο μυκητοκτόνο δίσκοι, γύρω στα 2-3 cm από την περιφέρεια των τριβλίων. Κατόπιν κόπηκαν δίσκοι 5 mm από αποικίες *R. solani* ηλικίας 3-4 ημερών και τοποθετήθηκαν σε απόσταση 3 cm από τους δίσκους χαρτιού. Τα τριβλία καλύφθηκαν με φύλλο αλουμινίου και επώαστηκαν στους 25 οC. Μετά από επώαση 5-7 ημερών τα τριβλία εξετάστηκαν. Ενώ είχε δημιουργηθεί ζώνη παρεμπόδισης όπως περιγράφεται στη μέθοδο, δεν διαπιστώθηκε η ύπαρξη βασιδίων, ακόμα και μετά επώαση 30 ημερών. Το πείραμα επαναλήφθηκε με στελέχη από όλες τις ομάδες αναστόμωσης, με δύο τριβλία ανά ομάδα αναστόμωσης.

δ) Μέθοδος του Flentje σε υλικό με άγαρ και χόμα (1956).

Σε 250 ml PDA προστέθηκαν 50 ml V8, 1 gr agar, και 0,75 gr yeast extract. Το υλικό μπήκε σε τριβλία και αναπτύχθηκαν σ' αυτό στελέχη του *R. solani* σε θερμοκρασία 25 °C. Όταν οι αποικίες του μύκητα αναπτύχθηκαν σε όλη την επιφάνεια του τριβλίου, αφαιρέθηκε το σκέπασμα και τοποθετήθηκε ένα στρώμα χόματος πάχους 1 cm, και

τοποθετήθηκαν σε σκοτεινό μέρος στους 28 °C. Το χώμα διαβρεχόταν τακτικά ώστε να παραμένει συνέχεια υγρό. Μετά από 2-3 ημέρες από την προσθήκη του χώματος, η επιφάνεια αυτού καλύφθηκε από μυκήλιο του μύκητα.

2.2.12. ΔΟΚΙΜΗ ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑΣ ΣΤΗ ΓΑΡΥΦΑΛΙΑ.

Παρασκευή μολύσματος:

Στελέχη του μύκητα *R. solani* αναπτύχθηκαν σε υλικό αποτελούμενο από άμμο σε αναλογία 98% κατά βάρος και καλαμποκάλευρο 2%. Στο μίγμα προστέθηκε απεσταγμένο νερό σε ποσότητα ίση με το 60% της υδατοϊκανότητας της άμμου. Για τον υπολογισμό της υδατοϊκανότητας της άμμου, μια ποσότητα από αυτή απλώθηκε για 2 μέρες να στεγνώσει στον αέρα και κατόπιν ορισμένη ποσότητα ζυγίστηκε και τοποθετήθηκε σε κλίβανο θερμοκρασίας 100 °C για 2-3 ώρες και ξαναζυγίστηκε για να υπολογιστεί η υγρασία που περιείχε η άμμος που ξεράθηκε στον αέρα. Μετά στην ποσότητα αυτή της άμμου, προστέθηκε περίσσεια νερού, αφέθηκε να στραγγίσει και κατόπιν ζυγίστηκε για να βρεθεί η υδατοϊκανότητά της.

Σε ευρύστομες κωνικές φιάλες των 500 ml τοποθετήθηκαν 200 γραμμάρια από το μίγμα άμμου αλεύρου και αποστειρώθηκαν σε υγρό κλίβανο. Κατόπιν κάθε φιάλη μολύνθηκε με 2 δίσκους άγαρ διαμέτρου 5 mm που κόπηκαν από καλλιέργειες *R. solani* σε PDA ηλικίας 10 ημερών, και επώασθηκαν για 10 μέρες σε θερμοκρασία 25 °C. Οι φιάλες κάθε τόσο ανακινούνταν ισχυρά προκειμένου το μόλυσμα να αναπτυχθεί ομοιόμορφα μέσα σ' αυτές. Για κάθε στέλεχος του μύκητα χρησιμοποιήθηκαν 2 φιάλες δηλαδή συνολικά 400 gr μολύσματος.

Η ποικιλία γαρυφαλιάς που χρησιμοποιήθηκε στο πείραμα ήταν η White Sim 2002 . Για κάθε στέλεχος του μύκητα που δοκιμάστηκε χρησιμοποιήθηκαν 400 gr μολύσματος που ανακατεύτηκαν πολύ καλά με 3 kg μίγματος χώματος και τύρφης 1:1 που είχε αποστειρωθεί με ατμό πολλούς μήνες πριν. Με το μίγμα χώματος-μολύσματος γέμισαν πλαστικά κύπελα διαμέτρου 10 cm με διάτρητη βάση και φυτεύτηκαν τα έρριζα μοσχεύματα, ένα σε κάθε κύπελλο (εικ. 12). Για κάθε στέλεχος του μύκητα υπήρχαν 15 φυτά γαρυφαλιάς. Χρησιμοποιήθηκαν οι απομονώσεις AG1, AG2-1, AG2-2, AG3, AG4, AG5, X20, Γ45 και Γ49 καθώς και χώμα χωρίς μόλυσμα (μάρτυρας). Η προέλευση των απομονώσεων που χρησιμοποιήθηκαν σ' αυτό το πείραμα φαίνεται στον πίνακα 1.

Πίνακας 1 Απομονώσεις του μύκητα *R. solani* που χρησιμοποιήθηκαν για την δοκιμή παθογένειας.

<u>Στέλεχος</u>	<u>Ομάδα αναστόμωσης</u>	<u>Προέλευση</u>
Sc 220	AG1	Από την συλλογή του R.T. Sherwood, Pennsylvania
Ps4	AG2-1	Από την συλλογή του A. Ogoshi
Rh3/T	AG2	Από την συλλογή του L.L. Burpee, Guelph
Sc222	AG3	Από την συλλογή του R.T. Sherwood, Pennsylvania
SN1	AG4	Από την συλλογή του A. Ogoshi
GMI	AG5	Από την συλλογή του A. Ogoshi
X20	Διπύρηνη	Από έδαφος αγρού σιτηρών, Σούλι Αττικής
Γ45	AG4	Από έδαφος καλλιέργειας γαρυφαλλιάς, Πόρος
Γ49	AG4	Από έδαφος καλλιέργειας γαρυφαλλιάς, Πόρος

Τα στελέχη Sc220, PS4, Rh3/T, Sc222, SN1 και GMI ανήκουν στην συλλογή του ΜΦΙ και χρησιμοποιήθηκαν και σαν δοκιμαστές στα τεστ αναστόμωσης.

Τα κύπελλα με τα μοσχεύματα μετά την φύτευση τοποθετήθηκαν σε θερμοκήπιο με θερμοκρασία 22 οC και τεχνητό φωτισμό και κύκλο ημέρας-νύχτας 12 ώρες. Το πότισμα τις πρώτες μέρες ήταν συχνό για να αποφύγουμε αποτυχίες στην μεταφύτευση και αργότερα όταν οι γαρυφαλλιές εγκαταστάθηκαν αραιώσε.

Η πρώτη δειγματοληψία έγινε 40 μέρες περίπου μετά την φύτευση. Αρχικά έγινε μια μακροσκοπική εξέταση των νεαρών γαρυφαλιών όπου παρατηρήθηκε σε άλλες επεμβάσεις περισσότερο και σε άλλες λιγότερο, μια μάρανση και χλώρωση των κατωτέρων φύλλων του στελέχους (τα φύλλα που οι κόμβοι τους ήταν μέσα στο χώμα). Μετρήθηκαν τα χλωρωτικά και τα μαραμμένα φύλλα σε κάθε φυτό.

Προκειμένου να βρεθεί κατά πόσο είχε επουισθεί η ριζοσφαίρα από τον μύκητα, η μπάλα του χώματος έβγαινε προσεκτικά από το κύπελο και πολλά ριζίδια αποκαλύπτονταν στην επιφάνεια της μπάλας. Με μία λαβίδα κόβονταν 5 ριζίδια μήκους 2-3 cm από διαφορετικά σημεία της μπάλας. Αφού πάρθηκαν τα τεμάχια ριζών η μπάλα χώματος τοποθετήθηκε πάλι στο κύπελο. Τα τεμάχια ριζών αφού πλένονταν ελαφρά για να απομακρυνθεί το έδαφος τοποθετούταν επί αντικειμενοφόρου παράλληλα με το μήκος της και πάνω τους έμπαινε καλυπτρίδα. Η διάταξη περιγράφεται στο σχήμα 4. Κατόπιν η αντικειμενοφόρος με τα ριζίδια τοποθετούταν στο μικροσκόπιο και μετατοπιζόταν σε διαδρομές κάθετη προς την διεύθυνση των ριζιδίων. Κατά την μετατόπιση γινόταν καταμέτρηση των υφών με μορφολογικά χαρακτηριστικά του *R. solani*, που έτεμναν μία νοητή ευθεία διερχόμενη από το μέσον του μικροσκοπικού πεδίου και κάθετη προς την φορά των ριζών. Η μέθοδος αυτή ονομάζεται μέθοδος των τομών (intersection) προτάθηκε

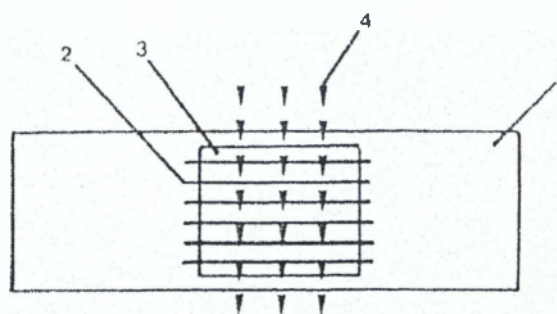
από τον Newman (1966) και τροποποιήθηκε από τους Γιουβαννέτι & Morse (1980). Σε κάθε αντικειμενοφόρο ακολουθούταν 3 κάθετες διαδρομές, μια στην μέση της καλυπτρίδας και οι άλλες δύο συμμετρικά προς αυτή στο 1/4 του πλάτους της.

Αφού έγινε η πρώτη αυτή δειγματοληψία, αφαιρέθηκε τελείως το υπέργειο μέρος από 5 γαρυφαλλίες σε κάθε επέμβαση και 10 μέρες μετά έγινε μιά δεύτερη δειγματοληψία και καταμέτρηση υφών του *R. solani*, τόσο στα φυτά που αφαιρέθηκε το υπέργειο μέρος όσο και στα κανονικά.

Η αξιολόγηση της παθογένειας των στελεχών του *R. solani*, έγινε με εξαγωγή των φυτών, πλύσιμο σε νερό βρύσης, επιμήκη τομή του στελέχους στην περιοχή του λαιμού και βαθμολόγηση των συμπτωμάτων. Η αξιολόγηση έγινε με μιά κλίμακα 0-5 όπου 0 ήταν τα εντελώς υγιή φυτά και 5 αυτά με πλήρως κατεστραμένο λαιμό (Εικόνα 16). Η πρώτη δειγματοληψία έγινε σε 6 φυτά από κάθε στέλεχος του μύκητα, 40 ημέρες μετά την φύτευση και η δεύτερη και τελευταία σε 8 φυτά, 90 ημέρες μετά την φύτευση.



Εικόνα 12. Μοσχεύματα γαρυφαλλιάς στο θερμοκήπιο, φυτεμένα σε κύπελλα με χώμα μολυσμένο με στελέχη του *R. solani*



Σχήμα 4 Πειραματική διάταξη που χρησιμοποιήθηκε για την μέτρηση των υφών του μύκητα *R. solani* στις ρίζες γαρυφαλλιάς

1. Αντικειμενοφόρος
2. Ριζίδιο
3. Καλυπτρίδα
4. Διαδρομή κατά την έννοια της οποίας έγινε η μέτρηση των υφών.

2.3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

2.3.1. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΤΟΥ *R. solani* ΑΠΟ ΦΥΤΑ ΚΑΙ ΕΔΑΦΟΣ

Στον Πίνακα 2 αναφέρονται οι απομονώσεις του *R. solani* που έγιναν από φυτά και από έδαφος κατά την διάρκεια των εργασιών αυτής της μελέτης. Ο αριθμός των απομονώσεων από φυτά σχετικά με εκείνον από το έδαφος ήταν μικρός, επειδή και ο αριθμός ασθενών φυτών από *R. solani* που έφθασαν στο ΜΦΙ ήταν μικρός. Ο κύριος όγκος των απομονώσεων ήταν από εδάφη.

Παρόλο που η μελέτη αυτή πληθυσμών *R. solani* στο έδαφος είναι μικρής κλίμακας, διακρίνεται μια τάση να απομονώνονται στελέχη ορισμένων ομάδων αναστόμωσης σε αγρούς με συγκεκριμένη καλλιέργεια. Έτσι από έδαφος που καλλιεργείται γαρυφαλλιά καθώς και από τα λίγα ασθενή φυτά γαρυφαλλιάς, απομονώθηκαν στελέχη του *R. solani* που ανήκαν αποκλειστικά στην ομάδα αναστόμωσης

Ο αριθμός των απομονώσεων που επιτεύχθηκε από τα εδάφη αμπελώνων ήταν σχετικά μικρός. Από τον αμπελώνα στο Πικέρμι εξετάστηκαν 15 δείγματα. Από κάθε δείγμα πάρθηκαν 27 τεμάχια φυτικών υπολειμμάτων που επώαστηκαν σε τριβλία με

εκλεκτικό υλικό. Από αυτά μόνο ένα δείγμα χώματος έδωσε αποικίες του *R. solani* (απομονώσεις X7-X10) που όλες ανήκαν στην ομάδα AG2-1.

Όσον αφορά τα μεμονωμένα δείγματα χώματος από αμπελώνες άλλων περιοχών, συλλέχθηκαν οι απομονώσεις X23, X27, X28, X29 και X30 που μετά από χρώση των πυρήνων τους βρέθηκαν ότι έχουν διπύρηνα κύτταρα και αναστόμωσαν όλες μεταξύ τους ενώ δεν αναστόμωσαν με καμμία διπύρηνη απομόνωση από αυτές που συλλέγησαν ούτε με τις καλλιέργειες - δοκιμαστές. Πιθανώς τα διπύρηνα στελέχη να έχουν τέλεια μορφή του γένους *Ceratobasidium*.. Η ατελής μορφή των στελεχών αυτών δεν θεωρείται *R. solani* αν και μοιάζουν στα λοιπά μορφολογικά στοιχείο. Ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι αριθμοί απομονώσεων *R. solani* από εδάφη με καλλιέργεια γαρυφαλιάς που είχαν υποστεί διάφορες επεμβάσεις βιολογικής καταπολέμησης του *Fusarium* sp. (βλ. πίν.2.)

Πίνακας 2. Απομονώσεις μυκήτων με μορφολογικά χαρακτηριστικά του *R. solani*

a/a	Καλλιέργεια	Περιοχή	Ημερομηνία	Ομάδα αναστόμωσης
X1	Βαμβάκι/ έδαφος	Θήβα	31/8/89	AG4
X2	Φράουλα /φυτά	Θεσ/νίκη	30/7/90	AG4
X3	Πεπονιά /φυτά	Πρέβεζα	17/7/89	--
X4	Lillium/ φυτά	--	11/7/90	AG4
X5	Χλοοτάπητας	Κηφισιά	11/7/90	-
X6	Ποινσέτια /φυτά	--	20/9/90	Διπύρηνη
X7	Αμπελώνας /έδαφος	Πικέρμι	30/11/90	AG2-1
X8	Αμπελώνας/ έδαφος	Πικέρμι	30/11/90	AG2-1
X9	Αμπελώνας /έδαφος	Πικέρμι	30/11/90	AG2-1
X10	Αμπελώνας /έδαφος	Πικέρμι	30/11/90	AG2-1
X11	Χρυσάνθεμο έδαφος	Μαραθώνας	7/12/90	--*
X12	Χρυσάνθεμο έδαφος	Μαραθώνας	7/12/90	--
X13	Χρυσάνθεμο έδαφος	Μαραθώνας	7/12/90	--
X14	Χρυσάνθεμο έδαφος	Μαραθώνας	7/12/90	--
X15	Αγγινάρα έδαφος	Σχοινιάς	7/12/90	--
X16	Δασικό έδαφος	Αγ. Πέτρος	7/12/90	--
X17	Αμπέλι έδαφος	Πικέρμι	7/12/90	--
X18	Σιτηρά, έδαφος	Σούλι, Αττικ	7/12/90	--
X19	Δασικό έδαφος	Αγ. Πέτρος	7/12/90	--
X20	Σιτηρά, έδαφος	Σούλι, Αττικ.	7/12/90	Διπύρηνη
X21	Δασικό έδαφος	Διόνυσος	7/12/90	Διπύρηνη
X22	Δασικό έδαφος	Διόνυσος	7/12/90	Διπύρηνη
X23	Αμπελώνας, έδαφος	Πικέρμι	7/12/90	Διπύρηνη
X24	Αγγινάρα, έδαφος	Σχοινιάς	7/12/90	--
X25	Χρυσάνθεμο, έδαφος	Μαραθώνας	7/12/90	--
X26	Αμπελώνας, έδαφος	Πικέρμι	30/12/90	Διπύρηνη
X27	Αμπελώνας, έδαφος	Πικέρμι	30/12/90	Διπύρηνη
X28	Αμπελώνας, έδαφος	Πικέρμι	30/12/90	Διπύρηνη
X29	Αμπελώνας, έδαφος	Πικέρμι	30/12/90	Διπύρηνη
X30	Αμπελώνας, έδαφος	Πικέρμι	30/12/90	Διπύρηνη
X31	Αγγινάρα, έδαφος	Σχοινιάς	7/12/90	--
X32	Αγκινάρα, έδαφος	Σχοινιάς	7/12/90	--
X33	Δασικό έδαφος	Διόνυσος	7/12/90	--

Γ1	Γαρυφαλιά, φυτό	Πόρος	26/7/89	AG4
Γ2	Γαρυφαλιά, φυτό	Πάρος	31/7/90	AG4
Γ3	Γαρυφαλιά, φυτό	Πόρος	6/9/90	AG4
Γ4	Γαρυφαλιά, φυτό	Πάρος	28/8/90	AG4
Γ5	Γαρυφαλιά, φυτό	Πόρος	12/9/90	AG4
Γ6	Γαρυφαλιά, φυτό	Πάρος	13/9/90	AG4
Γ7	Γαρυφαλιά, φυτό	Πόρος	13/9/90	AG4
Γ8	Γαρυφαλιά, φυτό	Πάρος	13/9/90	AG4
Γ9 μέχρι Γ58	Γαρυφαλιά, έδαφος	Πόρος	11/10/90 έως 20/11/90	Όλες AG4

* Δεν ενετάχθη σε ομάδα αναστόμωσης

Πίνακας 3 Αριθμός αποικιών του μύκητα *R. solani* που εμφανίστηκαν σε τριβλία με εκλεκτικό υλικό όταν τοποθετήθηκαν σ αυτά τεμάχια φυτικών υπολειμμάτων προερχόμενα από έδαφος με καλλιέργεια γαρυφαλιάς που είχε προηγουμένως υποστεί διάφορες επεμβάσεις (βλέπε παρ. 2.2.6.).

	Επέμβαση				Σύνολο
	1	2	3	4	
B	3	0	7	3	13
T	0	0	0	0	0
D	1	7	3	1	12
SS	0	0	0	0	0
SST	0	0	0	0	0
SSB	10	0	0	2	12
C	5	3	1	1	10

B = ανταγωνιστικό βακτήριο,

T = *Trichoderma*,

D = Dazomet,

SS = ηλιοσπολύμανση,

SST = ηλιοσπολύμανση και ανταγωνιστικό βακτήριο,

SSB = ηλιοσπολύμανση και ανταγωνιστικό βακτήριο,

C = Μάρτυρας.

Οι διαφορές μεταξύ των επεμβάσεων δεν είναι στατιστικά σημαντικές.

2.3.2. ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΤΕΛΕΙΑΣ ΜΟΡΦΗΣ

Παρά τις επίπονες προσπάθειες που έγιναν δεν έγινε δυνατός ο σχηματισμός της τέλειας μορφής. Δοκιμάστηκαν όλες σχεδόν οι μέθοδοι που αναφέρονται στην βιβλιογραφία. Ο πιθανός αιτίες αποτυχίας θα πρέπει να αποδοθούν είτε σε ακατάλληλες συνθήκες πειραματισμού, που δεν μπορέσαμε να προσδιορίσουμε είτε σε γενετική διαφοροποίηση των απομονώσεων λόγω μακράς διατήρησής τους σε τεχνητό υπόστρωμα. Για να αποφευχθεί κατά το δυνατόν αυτό το ενδεχόμενο χρησιμοποιήθηκε μεγάλος αριθμός απομονώσεων όλων των ομάδων αναστόμωσης.

2.3.3. ΔΟΚΙΜΗ ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑΣ

Η αξιολόγηση της παθογένειας των στελεχών που δοκιμάστηκαν έγινε με τρεις τρόπους:

- α. Με μέτρηση του αριθμού των μαραμένων ή χλωρωτικών φύλλων 40 ημέρες μετά τη φύτευση.
- β. Με μέτρηση των υφών του μύκητα σε 3 διαδοχικές δειγματοληψίες την 10^η, 20^η και 40^η ημέρα .
- γ. Με εκτίμηση του βαθμού προσβολής των ριζών .

Στον πίνακα 4 φαίνονται τα αποτελέσματα της μέτρησης των μαραμένων ή χλωρωτικών φύλλων που έγινε 40 ημέρες μετά την φύτευση. Βρέθηκε ότι στα στελέχη AG2-2, Γ45 και Γ49 ο αριθμός των φύλλων με τα συμπτώματα αυτά ήταν αυξημένα σε σχέση με τον μάρτυρα και η διαφορά ήταν στατιστικά σημαντική σε επίπεδο σημαντικότητας $p=0.05^*$. Παρόλα τα πρώτα αυτά αποτελέσματα όπου φαίνεται μια διαφοροποίηση ως προς την παθογένεια των στελεχών του *R. solani* που δοκιμάστηκαν, η εξέταση του λαιμού των φυτών που έγινε την 40η ημέρα από την φύτευση έδωσε μια ελαφρά ζημιά στα φυτά που μολύνθηκαν με τα πω πάνω στελέχη που όμως ήταν στατιστικά

* Η στατιστική ανάλυση και οι πολλαπλές συγκρίσεις με την μέθοδο LSD ή Duncan έγιναν με τη βοήθεια ηλεκτρονικού υπολογιστή.

σημαντικά διάφορη του μάρτυρα ($p=0.05$)*, μόνο για το στέλεχος A02. Η ζημιά που εμφάνιζαν τα φυτά ήταν μέλλον επιφανειακή και αφορούσε κυρίως τον κολεό των κατώτερων φύλλων (εικόνες 13, 14 και 15). Τα φυτά στην συνέχεια ανέλαβαν και αυτό φαίνεται στην δεύτερη δειγματοληψία όπου ο δείκτης ασθένειας στα ανέπαφα φυτά είναι μηδενικός σε όλα τα στελέχη του μύκητα, ενώ σε εκείνα που αφαιρέθηκε το υπέργειο τμήμα, ο παραμένων “λαιμός” παρουσίαζε σημαντικά αυξημένη ζημιά σε σχέση με τον μάρτυρα ($p=0.05$),* και για όλα τα στελέχη που δοκιμάστηκαν εκτός του AG2-1.

Στο διάγραμμα 1 εμφανίζεται ο αριθμός των υφών του *R. solani* στις ρίζες των φυτών γαρυφαλλιάς. Δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των στελεχών του μύκητα που δοκιμάστηκαν αλλά γενικά, ο αριθμός των υφών αυξήθηκε σημαντικά ($p=0.001$), * στα φυτά που κόπηκε το υπέργειο μέρος.

Πίνακας 4. Μακροσκοπικά συμπτώματα σε μοσχεύματα γαρυφαλλιάς που φυτεύτηκαν σε έδαφος μολυσμένο με διάφορα στελέχη του *R. solani*

Στέλεχος	Φύλλα με χλώρωση ¹	Φύλλα με μάρανση	Φύλλα με χλώρωση & μάρανση
AG1	0,33	0,20 α ²	0,53α
AG2-1	0,80	0,33 α	1,13 αβγ
AG2-2	0,33	1,93 δ	2,27 γ
AG3	0,20	0,93 αβγ	1,13 αβγ
AG4	0,73	0,33 α	1,07 αβ
AG5	0,93	0,07 α	1,00 αβ
Γ45	0,60	1,40 βγδ	2,00 βγ
Γ49	0,20	1,80 γδ	2,00 βγ
X20	0,80	0,67 αβ	1,47 αβγ
C0,67	0,40 α	1,07 αβ	

Μέσος όρος 15 επαναλήψεων σε κάθε επέμβαση.

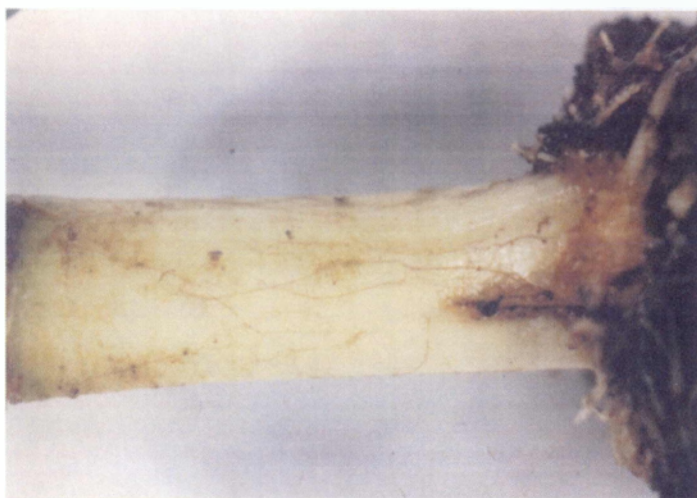
* Η στατιστική ανάλυση και οι πολλαπλές συγκρίσεις με την μέθοδο LSD ή Duncan έγιναν με τη βοήθεια ηλεκτρονικού υπολογιστή.

¹ Δεν είχαν σημαντικές στατιστικά διαφορές ($p=0,05$)

² Αριθμοί της ίδιας στήλης που συνοδεύονται από διαφορετικό γράμμα, διαφέρουν σημαντικά ($p=0,05$)



Εικόνα 13. Μόσχευμα γαρυφαλλιάς που ανεπτύχθη σε έδαφος μολυσμένο με *R. solani*, στέλεχος Γ45. Διακρίνεται ζημιά στην βάση του στελέχους και στα κατώτερα φύλλα.



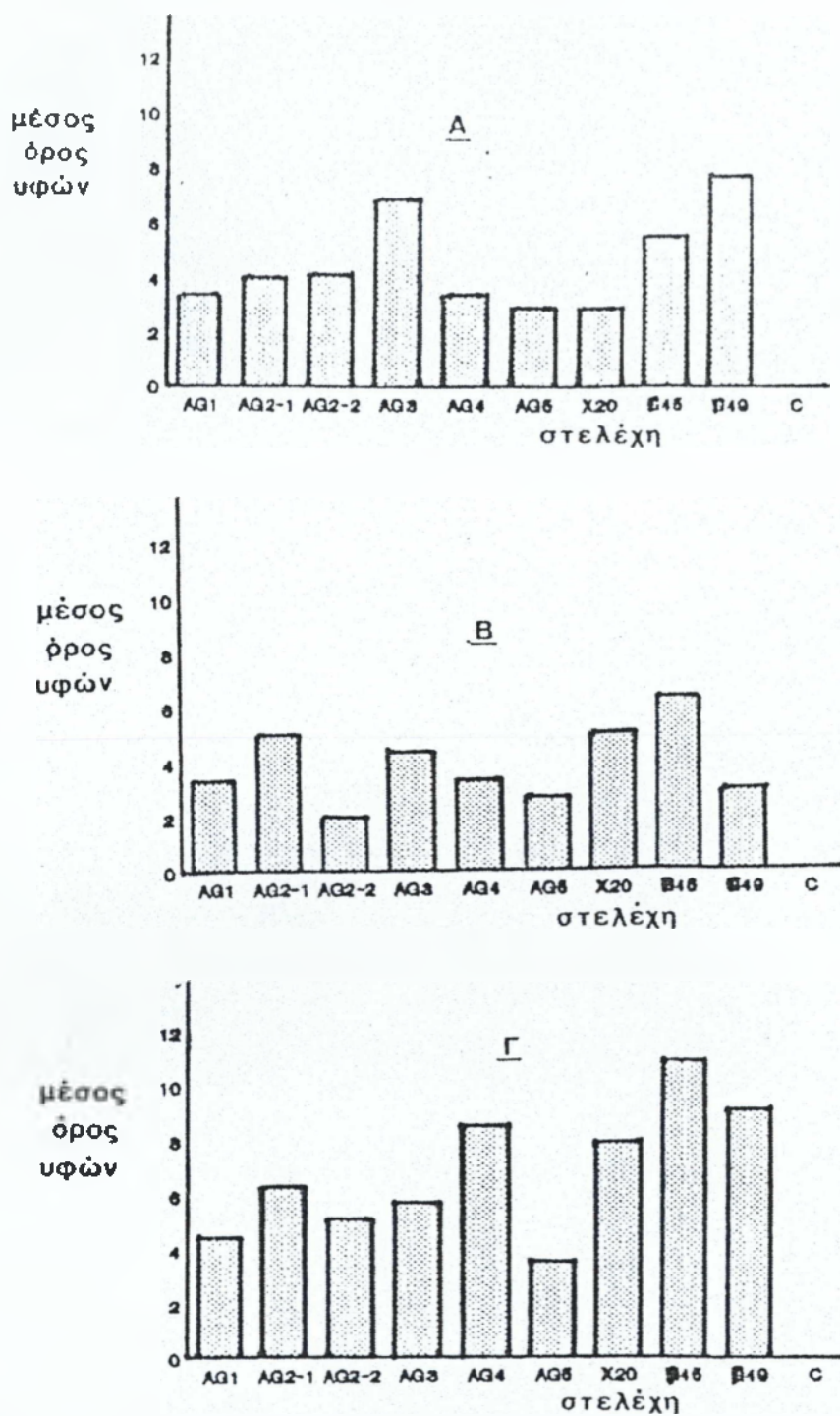
Εικόνα 14. Μόσχευμα γαρυφαλλιάς που ανεπτύχθη σε έδαφος μολυσμένο με *R. solani*, στέλεχος Γ45. Διακρίνονται οι χαρακτηριστικές υφές του μύκητα.



Εικόνα 15. Επιμήκης τομή στελέχους μοσχεύματος γαρυφαλλιάς που ανεπτύχθη σε έδαφος μολυσμένο με *R. solani*. Στην εικόνα φαίνεται καθαρά πως η ζημιά που προκάλεσε ο μύκητας είναι μόνο επιφανειακή.



Εικόνα 16. Επιμήκης τομή στελεχών 5 μοσχευμάτων γαρυφαλλιάς που αναπτύχθηκαν σε χώμα μολυσμένο με *R. solani* όπου φαίνεται η διαβάθμιση της προσβολής (κλίμακα 0-5)



Διάγραμμα 1. Μέσος όρος υφών του δ. που μετρήθηκαν κατά μήκος ριζών γαρυφαλλιάς που αναπτύχθηκαν σε έδαφος μολυσμένο με διάφορα στελέχη του μύκητα.

A. Πρώτη δειγματοληψία.

B. δεύτερη δειγματοληψία.

Γ. δεύτερη δειγματοληψία, φυτά που τους αφαιρέθηκε η κόμη την 50η ημέρα.

Πίνακας 5 Δείκτης ασθeneίας¹ σε έρριζα μοσχεύματα γαρυφαλλιάς που φυτεύτηκαν σε χώμα μολυσμένο με στελέχη του μύκητα *Rhizoctonia solani*.

1η Δειγματοληψία Φυτά 40 ημερών		2η Δειγματοληψία Φυτά 90 ημερών	
Στέλεχος του μύκητα	ανέπαφα	ανέπαφα	με κομμένο στέλεχος
AG1	0.00α	0.00	5.00γ
AG2-1	0.00α	0.00	2.60αβ
AG2	0.75 β	0.00	5.00γ
AG3	0.00 α	0.00	4.20βγ
AG4	0.25 αβ	0.00	5.00 γ
AG5	0.00 α	0.00	3.60 βγ
G45	0.25 αβ	0.00	5.00 γ
G49	0.40 αβ	0.00	5.00 γ
X20	0.00α	0.00	5.00 γ
Control	0.00 α	0.00	0.80 α

¹ Μέσοι όροι από δειγματοληψία που έγινε στο λαιμό των φυτών με την κλίμακα βαθμολόγησης 0-5

2.4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ & ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση του *R. solani* από τα φυτικά υπολείμματα, δίνει αρκετά ακριβή εικόνα του πληθυσμού του μύκητα στο έδαφος. Ο Flowers (1976), αναφέρει πως μερικά στελέχη του μύκητα είναι ευαίσθητα στο γαλλικό οξύ που περιέχει το υλικό, αλλά εμείς δεν διαπιστώσαμε κάτι τέτοιο.

Από δοκιμές που έγιναν, φαίνεται πως το εκλεκτικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση του μύκητα, επιτρέπει την γρήγορη ανάπτυξη στελεχών του μύκητα που ανήκουν σε όλες τις ομάδες αναστόμωσης του *R. solani* ενώ καταστέλλει την ανάπτυξη βακτηρίων και των περισσότερων άλλων μυκήτων. Η μέθοδος αυτή αποδείχτηκε ικανοποιητική και για την απομόνωση μυκήτων του γένους *Rhizoctonia* με διπύρηνα κύτταρα. Αυτό επιβεβαιώθηκε και από την εργασία της Βαλαλά (1989), και έχει χρησιμοποιηθεί για τον ίδιο σκοπό εκτενώς (Sweetingham et al 1986, Vincelli & Beaupre, 1989).

Αν και η ταχύτητα ανάπτυξης του μύκητα *in vitro* επιταχύνεται όταν προστεθούν στο υλικό αυξητικοί παράγοντες όπως βιοτίνη, φολλικό οξύ, ινοσιτόλη κ.α. ο μύκητας είναι αυτότροφος για τις ουσίες αυτές με ελάχιστες εξαιρέσεις (Ogoshi 1987). Η μέθοδος αυτή είναι πολύ απλή και προτιμήθηκε άλλων μεθόδων όπως η χρησιμοποίηση δολωμάτων (bait techniques), και η χρησιμοποίηση εδάφους ως έχει ή μετά από κοσκίνισμα. (Ko & Hora, 1971).

Η ταυτοποίηση των απομονώσεων σαν *R. solani* βασίστηκε στην αναγνώριση των χαρακτήρων του είδους που αναφέρονται στο 1.1. Η ακρίβεια του προσδιορισμού αυτού επιβεβαιώθηκε για τις περισσότερες απομονώσεις, με τις δοκιμές αναστόμωσης, με εξακριβωμένα στελέχη (δοκιμαστές). Πολλές προσπάθειες να πετύχουμε την τέλεια μορφή του μύκητα, που είναι χαρακτήρας αδιαμφισβήτητος, δεν έδωσαν αποτέλεσμα και είναι αγνωστό αν αυτό οφείλεται στα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν ή στις συνθήκες πειραματισμού.

Η αποκλειστική παρουσία της Ομάδας αναστόμωσης AG4 στο έδαφος αγρού γαρυφαλλιάς είναι μια ένδειξη ότι η καλλιέργεια του φυτού αυτού ασκεί ισχυρή επιλεκτική πίεση στην σύνθεση του πληθυσμού του μύκητα στο έδαφος. Το αποτέλεσμα αυτό συμφωνεί εν μέρει με αυτό των Trujillo et al (1988), που απομόνωσαν τον μύκητα από 11

αγρούς γαρυφαλλιάς. Από τις 308 απομονώσεις που εξέτασαν οι παραπάνω συγγραφείς, οι 207 ανήκαν στην ομάδα αναστόμωσης AG4. Από τους αγρούς που εξετάστηκαν μόνο σε 5 βρέθηκαν στελέχη που ανήκαν στην ομάδα AG2-2 και σε δύο αγρούς στελέχη της AG2-1.

Ενδιαφέρον έχει και η επίδραση των διαφόρων επεμβάσεων επί του πληθυσμού του μύκητα στο έδαφος. Αν και οι διαφορές στους αριθμούς απομονώσεων που επιτεύχθηκαν από τα εδάφη αυτά δεν είναι στατιστικά σημαντικές, είναι ενδεικτικές της επίδρασης ορισμένων παραγόντων όπως της ηλιοαπολύμανσης και του μύκητα *Trichoderma*, 7)ιώσά που φαίνεται ότι ασκούν δραστική μείωση στον πληθυσμό του μύκητα στο έδαφος. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με αυτά των Elad και Hadar (1981), που βρήκαν ότι προσθήκη του μύκητα *T. harzianum* μείωσε τον δείκτη ασθένειας κατά 70%, και θα μπορούσαν να χρησιμεύσουν στην καταπολέμηση του μύκητα.

Η μικρή ή μηδαμινή παθογένεια των στελεχών που δοκιμάστηκαν μπορεί να οφείλεται τόσο στην απώλεια της παθογένειας που συμβαίνει σε ορισμένες απομονώσεις που διατηρούνται σε τεχνητό υπόστρωμα. Μια άλλη εκδοχή είναι ότι οι πειραματικές συνθήκες δεν ήταν οι κατάλληλες. Κατά τον Carling (1990), διαφοροποίηση στην μολυσματικότητα των απομονώσεων ανάλογα με την θερμοκρασία. Η ομάδα αναστόμωσης AG4 ευνοείται από σχετικά υψηλές θερμοκρασίες. Βρέθηκε να είναι πιο παθογένης στην πατάτα στους 21,1 °C ενώ η AG3 ήταν πιο παθογένης στους 10 και 15,5 °C. Η δοκιμή παθογένειας σ' αυτή τη μελέτη έγινε σε θερμοκρασία 22 °C και θα ήταν ενδιαφέρον να εξεταστεί η μολυσματικότητα στελεχών του μύκητα και σε άλλες θερμοκρασίες. Τέλος μια τρίτη εκδοχή είναι η πιθανή ανθεκτικότητα του ξενιστή. 1-Ι τελευταία αυτή περίπτωση καταδείχθηκε όταν ο λαιμός και οι ρίζες βρέθηκαν κάτω από συνθήκες ισχυρού stress όταν αυτά στερήθηκαν των προϊόντων της φωτοσύνθεσης μετά από την αφαίρεση του υπεργείου τμήματος. Κάτω από τις συνθήκες αυτές όλα σχεδόν τα στελέχη του μύκητα προκάλεσαν ζημιά μεγαλύτερη από αυτήν του μάρτυρα (αμόλυντο χώμα). Το ίδιο συνέβη και με τον αριθμό υφών και συνεπώς τον εποικισμό των ριζών, που αυξήθηκε στις ρίζες των παραπάνω φυτών, για όλα σχεδόν τα στελέχη που δοκιμάστηκαν. Το πείραμα αυτό δείχνει ότι όταν οι φυτικοί ιστοί εξασθενήσουν τότε προσβάλλονται εύκολα από όλα τα στελέχη του *R. solani* ακόμα και από μη παθογόνα.

Αν και στο πείραμα παθογένειας κανένα στέλεχος του *R. solani* που δοκιμάστηκε δεν έδωσε τόσο σοβαρά συμπτώματα, όπως αυτά που παρατηρούνται στον αγρό σε περιπτώσεις σοβαρής προσβολής, εντούτοις διαπιστώθηκαν διαφορές ως προς την παθογένεια μεταξύ των στελεχών. Από αυτά, τα στελέχη των ομάδων AG2-2 και AG-4 είχαν την μεγαλύτερη παθογένεια. Οι Trujillo et al (1988), απομόνωσαν *R. solani* από

ασθενή φυτά γαρυφαλλιάς που ανήκαν στις ομάδες AG4 και AG2-2. Όμως μόνο στελέχη της ομάδας AG2-2 βρέθηκαν παθογενή στην γαρυφαλλιά ενώ στελέχη της ομάδας AG4 και της AG2-1 που απομονώθηκε από έδαφος αγρού γαρυφαλλιάς δεν είχαν παθογένεια στην γαρυφαλλιά.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Ανώνυμος, 1985. Σύγχρονη Γεωργική Τεχνολογία, Αφιέρωμα Φυτοπροστασία, σελ. 61.
- Adams, G.C. & Butler, E.E. (1979). Serological relationships among anastomosis groups of *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology* 69, 629-633.
- Anderson, N.A. (1982). The genetics and pathology of *Rhizoctonia solani*. *Ann. Rev. Phytopathol.* 20, 329-347.
- Βαλαλά, Θ. (1989). Καταμέτρηση και μελέτη των πληθυσμών του μύκητα *Rhizoctonia solani* από καλλιεργούμενα εδάφη και από φυτά ξενιστές. Πτυχιακή μελέτη.
- Boosalis, M.G. & Scharen, A.L. (1959). Methods for microscopic detection of *Aphanomyces euteiches* and *Rhizoctonia solani* and for isolation of *Rhizoctonia solani* associated with plant debris. *Phytopathology* 49, 192-198.
- Burpee, L.L.; Sanders, P.L. and Cole, J.R. (1978). A staining technique for nuclei of *Rhizoctonia solani* and related fungi. *Mycologia* 70, 1281-1283.
- Butler, E.E. 13. (1980). A method for longtime culture storage of *Rhizoctonia solani*, *Phytopathology* 70, 820-8.
- Carling, D. E. & Leiner, R. H. (1990). Effect of temperature on virulence of *Rhizoctonia solani* on potato. *Phytopathology* 80, 930-934
- Carling, D. E.; Leiner, R.H. and Kebler, K.M. (1987). Characterization of a new anastomosis group (AG-9) of *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology*, 77, 1609-1612.
- De Candolle, A. P. (1815). Memoire sur les rhizoctones, nouveau genre de champignons qui attaque les racines des plantes et en particulier celle de la luzerne cultivce. *Mem. Mus. d'Hist. Nat.* 2, 209-216.
- Δημητριάδη, Σ., Παναγοπούλου, Χ. και Στάθη, Π. (1979). Παρατηρηθείσαι εις την Ελλάδα ασθένειαι των καλλιεργουμένων φυτών. Έκδοσις Μ.Φ.Ι. Κηφισιά, σελ. 153.
- Elad, Y. & Hadar, Y. (1965). Biological control of *Rhizoctonia solani* by *Tirichoderma harzianum* in carnation. *Plant Disease*, 675-677.
- Exner, B. (1953). Comparative studies of four *Rhizoctonias* occurring in Louisiana. *Mycologia* 45, 698-719.
- Flentje, N. T. (1956). Studies on *Pellicularia filamentosa* (Pat) Rogers. *Transactions of the British Mycological Society* 39, 343-356.
- Forsberg, J. L. (1965). *Diseases of Ornamental Plants*. University of Illinois Press 208 pp.
- Garza-Chapa & Anderson (1966). Behavior of single basidiospore isolates and heterocaryons of *Rhizoctonia solani* from flax. *Phytopathology* 56, 1260-1268.
- Giovannetti, M. & Morse, B. (1980). An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytol.* 84, 489-500.
- Homma, Y., Yamashita, Y., Ishii, M. (1983). A new anastomosis group (AG-7) of *Rhizoctonia solani* Kuhn from Japanese radish fields. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 49, 184-90.
- Ichielevich - Auster, M.; Sneh, B.; Koltin, Y. and Barash, I. (1985). Suppression of damping-off caused by *Rhizoctonia* species by a nonpathogenic isolate of *R. solani*. *Phytopathology* 75, 1080-1084.
- Inoue, S. & Ui, T. (1974). Grouping of *Rhizoctonia solani* isolated from plants and soils in Tokashi district. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 40, 120-121.
- Jager, G. & Velvis, H. (1983). Suppression of *Rhizoctonia solani* in potato fields. I. Occurrence. *Neth. J. Plant Pathol.* 89, 2 1-29.
- Jager, G. & Velvis, H. (1984). Biological control of *Rhizoctonia solani* on potatoes by antagonists. 2. Sprout protection against soil borne *R. solani* through seed inoculation with *Venicillium higtatum*. *Netherlands Journal of Plant Pathology* 90, 29-33.

- Kangatharalingam, N. & Carson, M.C. (1988). Technique to induce sporulation in *Thanatephorus cucumeris*. *Plant Disease* 72, 146-148.
- Ko, W. H. & Hora, F.K. (1971). A selective medium for the quantitative determination of *Rhizoctonia solani* in soil. *Phytopathology*, 61, 707-710.
- Kobayashi, N. & Ko, W.H. (1985). Nature of suppression of *Rhizoctonia solani* in Hawaiian soils. *Transactions of the British Mycological Society* 84, 691-694.
- Komoto, M., Kanzawa, K., Ui, T. (1970). Continuous cropping of sugar beet and strains of *Rhizoctonia solani* in field soil. *Bull. Sugar Beet Res. Supp* 11, 57-62.
- Kuninaga, S., Yokosawa, R. and Ogoshi, R. (1978). Anastomosis grouping of *Rhizoctonia solani* Kuhn isolated from non cultivated soils. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 44, 591-598.
- Kuninaga, S. & Yokosawa, R. (1980). A comparison of DNA base compositions among anastomosis groups in *Rhizoctonia solani* Kuhn. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 46, 150-158.
- Kuninaga, S. & Yokosawa, R. (1985). DNA base sequence homology in *Rhizoctonia solani* Kuhn, VI. Genetic relatedness among seven anastomosis groups. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 51, 127-132.
- Μπαλής, Κ. Δ. (1987). Εισαγωγικά Μαθήματα Μυκητολογίας, σελ. 26.
- Neate, S.M. & Warcup, J.H. (1985). Anastomosis grouping of some isolates of *Thanatephorus cucumeris* from agricultural soils in South Australia. *Transactions of the British Mycological Society* 85, 615-620.
- Newman, E.I. (1966). A method of estimating the total length of root in a sample. *J. App. Ecol.* 3, 139.
- Ogoshi, A. (1972). Groupings of *Rhizoctonia solani* Kuhn with hyphal anastomosis. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 38, 177-122.
- Ogoshi, A. (1987). Ecology and pathogenicity of anastomosis and intraspecific groups of *Rhizoctonia solani* Kuhn. *Annual Review of Phytopathology*. 25, 125-143.
- Ogoshi, A. & Ui, T. (1983). Diversity of clones within an anastomosis group of *Rhizoctonia solani* Kuhn in a field. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 49, 239-245.
- Παναγόπουλος, Χ. Γ. (1987). Ασθένειες Καρποφόρων Δένδρων και Αμπέλου, σελ. 199-200, Εκδόσεις Καραμπερόπουλος, Αθήνα.
- Parmeter, J. R., Sherwood, R. T. and Platt, W. D. (1969). Anastomosis grouping among isolates of *Thanatephorus cucumeris*. *Phytopathology* 59, 1200-1278.
- Parmeter, J. R. & Whitney, (1970). Taxonomy and nomenclature of the imperfect state. Pages 7-19 In: *Rhizoctonia solani: Biology and Pathology*. J.R. Parmeter Jr. (Ed.), University of California Press, Berkeley.
- Pirone, P., Dodge, B. and Rickett, H. (1960). *Diseases and Pests of Ornamental Plants*. Third Edition pp. 324-325.
- Richter, H. & Schneider, R. (1953). Untersuchungen zur morphologischen und biologischen Differenzierung von *Rhizoctonia solani* K. *Phytopathol. Z.* 20, 167-226.
- Schultz, H. (1936). Vergleichende Untersuchungen zur Oecologie, Morphologie Systematik der "Vermehrungspilgen" *Arb. Biol. Reichsanst Land und Forstwirtschaft Berlin* 22, 1-41.
- Sweetingham, M.N., Cruickshank, R. H. and Wong D. H. (1986). Pectic zymograms and taxonomy and pathogenicity of *Ceratobasidiaceae*. *Transactions of the British Mycological Society* 86, 305-311.
- Trujillo, E.E.; Shimabucu, R.; Cavin, C. A. and Aragaki, M. (1988). *Rhizoctonia solani* anastomosis groupings in carnation fields and their pathogenicity to carnation. *Plant Disease*. 72, 863-865.
- Tu, C. C. and Kimbrough, J. W. (1973). A rapid staining technique for *Rhizoctonia solani* and related fungi. *Mycologia* 65, 941-943.
- Uchida, J. Y., Aragaki, M. and Yahata, P. S. (1986). Basidiospore formation by *Ceratobasidium* sp on agar. *Mycologia* 78, 587-592.

- Ue, Y., Mitsui, Y., Suzui, T., Ogoshi, A., Ro, T. (1965). Variation in activity of *Rhizoctonia solani* Kuhn in sugarbeet field soils. *Bull. Sugar Beet Res.* 4, 101-112.
- Vilgalis, R. (1988). Genetic relatedness among anastomosis groups in *Rhizoctonia solani* as measured by DNA/DNA hybridization. *Phytopathology*, 78, 698-702.
- Vincelli, P. C. & Beaupre, C., M-S. (1989). Comparisons of media for isolating *Rhizoctonia solani* from soil. *Plant Disease* 73, 1014-1017.
- Yamanoto, D. T. & Uchida, J. Y. (1982). Rapid nuclear staining of *Rhizoctonia solani* and related fungi. *Mycologia* 74, 145-148.
- Yoshida, M. & Kobayashi, K. (1985). On the occurrence of root rot of radishes in recently reclaimed fields. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 51, 329.