

ΤΕΙ ΔΥΤΙΚΗΣ ΕΛΛΑΔΟΣ
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ
ΘΕΡΜΟΚΗΠΙΑΚΩΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ & ΑΝΘΟΚΟΜΙΑΣ

Π Τ Υ Χ Ι Α Κ Η Μ Ε Λ Ε Τ Η

**Επίδραση των ανοσοποιημένων φυτών μελιτζάνας με τη
χρήση του αμινοξέος L-cystine στη βλαστικότητα
μικροσκληρωτίων του μύκητα *Verticillium dahliae***

ΣΟΥΖΑΝΑ Α. ΠΑΝΑΓΙΩΤΟΠΟΥΛΟΥ

11495

ΜΕΣΟΛΟΓΓΙ 2013

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Καθηγητής Εφαρμογών ΤΕΙ Μεσολογγίου

ΠΑΠΑΠΑΝΑΓΙΩΤΟΥ ΑΡΙΣΤΕΙΔΗΣ, Εισηγητής

Επίκουρος Καθηγήτρια ΤΕΙ Μεσολογγίου

ΚΑΡΑΝΑΣΤΑΣΗ ΕΙΡΗΝΗ, Μέλος

Εργαστηριακός Συνεργάτης ΤΕΙ Μεσολογγίου

ΜΠΙΛΑΛΗΣ ΜΑΡΚΟΣ, Μέλος

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Με την ολοκλήρωση της πτυχιακής μου μελέτης στα πλαίσια των προπτυχιακών μου σπουδών στο ΤΕΙ Μεσολογγίου, Σχολή Τεχνολογίας Γεωπονίας, Τμήμα Θερμοκηπιακών Καλλιεργειών & Ανθοκομίας θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον Εισηγητή Καθηγητή Εφαρμογών ΤΕΙ Μεσολογγίου κ. Παπαπαναγιώτου Αριστείδη για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπό μου ως προς την ανάθεση του εν λόγω ερευνητικού θέματος.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επιστημονικό Συνεργάτη στον Τομέα της Φυτοπροστασίας-Φυτοπαθολογίας του ΤΕΙ Καλαμάτας Δρ. Αντωνόπουλο Δημήτριο τόσο για την πολύτιμη βοήθεια και καθοδήγησή του, καθώς και για τις χρήσιμες συμβουλές του, ιδιαίτερα περί των τεχνικών της Φυτοπαθολογίας, κατά την εκτέλεση των πειραμάτων μου χωρίς τις οποίες η ολοκλήρωση της παρούσας μελέτης δεν θα ήταν δυνατή, όσο και για τη διόρθωση και παρουσίαση της πτυχιακής μου μελέτης.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Επίκουρη Καθηγήτρια του ΤΕΙ Μεσολογγίου Δρ Καραναστάση Ειρήνη και τον Εργαστηριακό Συνεργάτη του ΤΕΙ Μεσολογγίου κ. Μπιλάλη Μάρκο, για τη διόρθωση και βαθμολόγηση αυτής της μελέτης.

Π Ε Ρ Ι Ε Χ Ο Μ Ε Ν Α

Περίληψη	4
Εισαγωγή	5
Ο φυτοπαθογόνος μύκητας <i>Verticillium dahliae</i>	5
Συμπτώματα.....	6
Ο βιολογικός κύκλος της ασθένειας.....	7
Η επιδημιολογία της ασθένειας.....	8
Το μικροσκληρώτιο του <i>Verticillium dahliae</i>	8
Τρόποι αντιμετώπισης της βερτισιλλίωσης.....	10
α) Καλλιεργητικά μέτρα.....	10
β) Ανθεκτικές ποικιλίες.....	10
γ) Χημική καταπολέμηση.....	11
δ) Ηλιοσπολύμανση.....	11
ε) Βιολογική αντιμετώπιση.....	12
Μηχανισμοί δράσεως των βιολογικών παραγόντων.....	12
α) (Τροφικός) ανταγωνισμός.....	12
β) Αντιβίωση.....	13
γ) Παρασιτισμός.....	13
δ) Αποικισμός.....	14
Φυτικοί παρεμποδιστές και μηχανισμοί άμυνας του φυτού.....	14
α) Φυτοαλεξίνες.....	14
β) Λιγνιτοποίηση και άλλοι δομικοί φραγμοί.....	16
γ) Αντίδραση υπερευαισθησίας.....	17
δ) Θύλακες λιγνίνης ή καλλόζης.....	17
ε) Χημικές μορφές ενεργού οξυγόνου.....	17
στ) Πρωτεΐνες παθογένεσης.....	18
Η έννοια και σημασία της ριζόσφαιρας.....	18
Στόχος πτυχιακής μελέτης.....	21
Υλικά και Μέθοδοι	22
Φυτικό υλικό.....	22
Λίπανση σποροφύτων.....	22
Απομόνωση του μύκητα <i>Verticillium dahliae</i>	22
Δημιουργία μικροσκληρωτίων.....	22
Παραλαβή μικροσκληρωτίων.....	23
Έλεγχος βλαστικότητας μικροσκληρωτίων.....	23
Επεξεργασία των μικροσκληρωτίων.....	24
Ψεκασμός φυτών μελιτζάνας με το L-cystine.....	24
Μεταφύτευση των φυτών μελιτζάνας σε διαφανή λυόμενα δοχεία.....	24
Προσθήκη των μικροσκληρωτίων στα λυόμενα δοχεία.....	25
Παρατήρηση των μικροσκληρωτίων στο μικροσκόπιο.....	26
Η βερτισιλλίωση σε φτά μελιτζάνας ψεκασμένα με το L-cystine.....	28
Έλεγχος της αντικυκητιακής δράσης του L-cystine στο <i>Verticillium dahliae</i>	29
Αποτελέσματα	30
Επίδραση ανοσοποιημένων φυτών μελιτζάνας με το L-cystine στη βλαστικότητα των μικροσκληρωτίων του <i>Verticillium dahliae</i>	30
Η βερτισιλλίωση σε φτά μελιτζάνας ψεκασμένα με το L-cystine.....	32
Έλεγχος της αντικυκητιακής δράσης του L-cystine στο <i>Verticillium dahliae</i>	33
Συζήτηση-Συμπεράσματα	34
Βιβλιογραφία	37
Παράρτημα (μετρήσεις πειραμάτων).....	42
Επίδραση ανοσοποιημένων φυτών μελιτζάνας με το L-cystine στη βλαστικότητα των μικροσκληρωτίων του <i>Verticillium dahliae</i>	42
Η βερτισιλλίωση σε φτά μελιτζάνας ψεκασμένα με το L-cystine.....	47
Έλεγχος της αντικυκητιακής δράσης του L-cystine στο <i>Verticillium dahliae</i>	50

Π Ε Ρ Ι Λ Η Ψ Η

Οι αδρομυκώσεις που προκαλεί ο μύκητας *Verticillium dahliae* επιφέρουν σημαντικές οικονομικές επιπτώσεις σε πολλές ετήσιες και πολυετείς καλλιέργειες. Οι επιπτώσεις αυτές επιτείνονται γιατί η αντιμετώπιση του μύκητα είναι ιδιαίτερα δυσχερής, αφού σε επίπεδο γεωργικής εφαρμογής δεν υπάρχουν αποτελεσματικά φυτοπροστατευτικά προϊόντα. Εκτός από την αναζήτηση αποτελεσματικών χημικών ουσιών, μία εναλλακτική προσέγγιση στην αντιμετώπιση της βερτισιλλίωσης αποτελεί η δυνατότητα χρήσης των μεθόδων και μέσων της βιολογικής αντιμετώπισης και ειδικότερα η ανοσοποίηση των φυτών.

Στην παρούσα μελέτη μελετήθηκε στο θερμοκήπιο η επίδραση των ανοσοποιημένων φυτών μελιτζάνας ποικιλίας Black Beauty, μέσω του ψεκασμού τους με το αμινοξύ L-cystine συγκέντρωσης 3 mM, ενάντια στη βλαστικότητα των μικροσκληρωτίων (πυκνότητα σε στεφιακό υλικό 0.75% άγαρ: 5 μικροσκληρώτια ανά 2 mm³) του εδαφογενούς παθογόνου *V. dahliae* και κατ' επέκταση στην ανάπτυξη της ασθένειας στον εν λόγω ξενιστή της. Η βλαστικότητα των μικροσκληρωτίων, καθώς επίσης ο μέσος αριθμός των υφών και το μέσο μήκος (μm) της υφής κάθε βλαστημένου μικροσκληρωτίου του μύκητα *V. dahliae* στη ριζόσφαιρα των φυτών μελιτζάνας μελετήθηκε με τη χρήση λυόμενων δοχείων από διαφανές υλικό (Plexiglas). Η βλαστικότητα των μικροσκληρωτίων μειώθηκε περίπου 2% στα ακρορρίζια των φυτών, τα οποία αποτελούν στρατηγικής σημασίας θέσεις για την είσοδο του παθογόνου εντός των φυτικών ιστών, στα ανοσοποιημένα φυτά μελιτζάνας σε σχέση με το μάρτυρα (αψέκαστα φυτά). Αναφορικά με το μέσο μήκος της κάθε υφής και το μέσο αριθμό των υφών ανά βλαστημένο μικροσκληρώτιο, δεν παρουσιάστηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο επεμβάσεων.

Επιπλέον, μελετήθηκε η εξέλιξη της βερτισιλλίωσης στον ανωτέρω ξενιστή ψεκασμένος με το L-cystine συγκέντρωσης, επίσης, 3 mM, καθώς αυτός μολύνθηκε με την παρουσία 15 μικροσκληρωτίων ανά g εδαφικού μείγματος. Η ένταση/δριμύτητα της ασθένειας (ποσοστό ασθένειας: σχετικό AUDPC) στα φυτά που είχαν ψεκαστεί με το L-cystine εκτιμήθηκε περίπου κατά 35% λιγότερο και στατιστικώς σημαντικά διάφορο με αυτή του μάρτυρα (αψέκαστα φυτά). Επιπλέον, το L-cystine δεν επέδειξε *in vitro* αντιμυκητιακή δράση ενάντια αποικίας του *V. dahliae* αποδεικνύοντας, ότι πράγματι τα φυτά μελιτζάνας ανοσοποιούνται (διέγερση λανθανόντων μηχανισμών άμυνας του φυτού ενάντια στο παθογόνο).

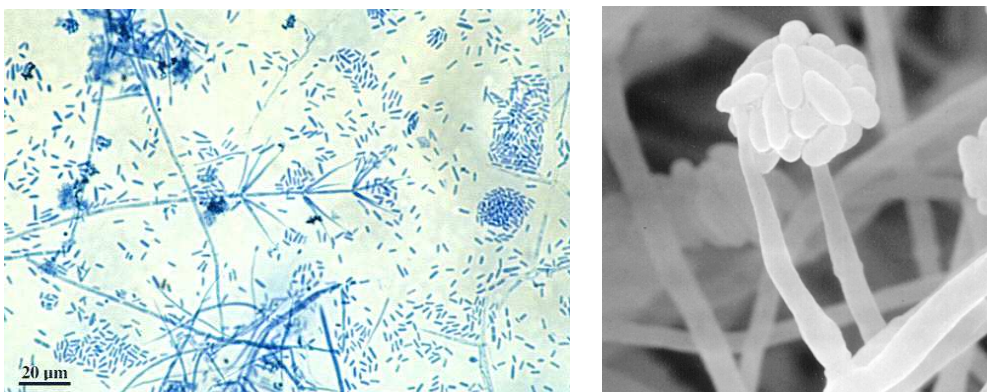
Η εργασία αποτελεί αναφορά της αξιολόγησης της επίδρασης ανοσοποιημένων φυτών με τη χρήση του L-cystine τόσο ως προς τη βλαστικότητα των μικροσκληρωτίων του μύκητα *V. dahliae* στα ακρορρίζιά τους, όσο και της εξέλιξης της εν λόγω ασθένειας σε φυτά μελιτζάνας. Κατά την ανοσοποίηση των φυτών φαίνεται ότι δεν υφίσταται σημαντική επίδραση στη βλαστικότητα των μικροσκληρωτίων του *V. dahliae*, αλλά κυρίως αποτροπή της μόλυνσης των φυτών ή/και μείωση του ρυθμού προσβολής, αποίκησης και διασποράς των υφών του εδαφογενούς παθογόνου εντός των φυτικών ιστών μελιτζάνας, σε σχέση με το μάρτυρα. Οι πιθανές βιοχημικές αλλαγές που πιθανών έχουν ενεργοποιηθεί στις ρίζες των ανοσοποιημένων φυτών μελιτζάνας μετά τον ψεκασμό τους με το L-cystine είναι προς συζήτηση και προτείνονται προς μοριακή και φασματοσκοπική διερεύνηση.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο φυτοπαθογόνος μύκητας *Verticillium dahliae*

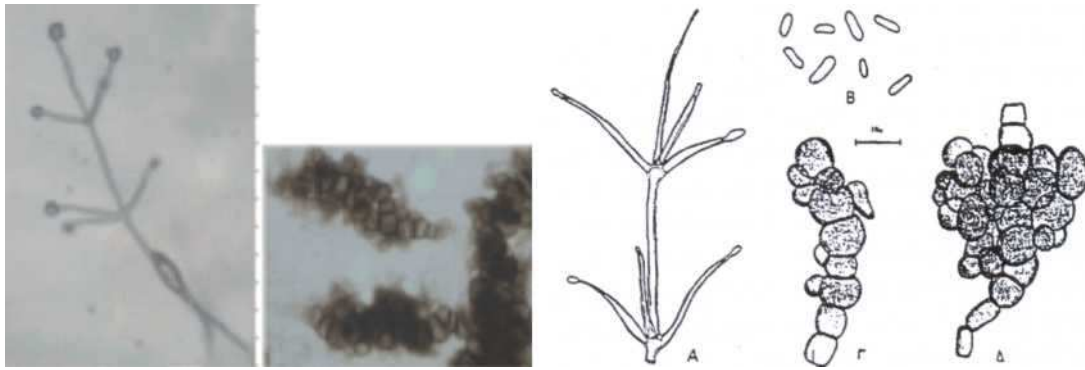
Η βερτισιλλίωση είναι μια πολύ σοβαρή, πολλές φορές βραδέως εξελισσόμενη, ασθένεια των φυτών, που οφείλεται σε προσβολή μέσω του ριζικού συστήματος των αγγείων του ξύλου από τους αδηλομύκητες *Verticillium dahliae* (μορφή μικροσκληρωτιακή) και *V. albo-atrum* (μορφή σκούρου διαχειμάζοντος μυκηλίου) (Barbara & Clewes, 2003). Στις ετήσιες και πολυετείς καλλιέργειες, ο μύκητας *V. dahliae* αποτελεί στη χώρα μας το αποκλειστικό αίτιο για την εκδήλωση της ασθένειας, εκτός από την τομάτα και πατάτα που απαντάται και το είδος *V. albo-atrum* (Tjamos, 1981). Η βερτισιλλίωση ανήκει γενικότερα στις μυκητολογικές ασθένειες που ονομάζονται αδρομυκώσεις και είναι ευρύτατα διαδεδομένη προκαλώντας μεγάλες οικονομικές ζημιές στις τροπικές και υποτροπικές χώρες (Tjamos, 1989).

Ο μύκητας *V. dahliae* ανήκει στην οικογένεια Moniliaceae της τάξεως Moniliales των αδηλομυκήτων (Alexopoulos *et al.*, 1996) και σχηματίζει μαύρα μικροσκληρώτια διαστάσεων (80-120×15-50) μm (Király *et al.*, 1970). Το παθογόνο δεν έχει κινητά κύτταρα και εγγενείς φάσεις αναπαραγωγής. Το μυκήλιό του φέρει εγκάρσια διαφράγματα (Deuteromycotina) και σχηματίζει στείρες μυκηλιακές υφές ή υφές που παράγουν τα κονίδια (Hyphomycetes) (Király *et al.*, 1970). Ο μύκητας σχηματίζει ελεύθερους, άφθονους, ανορθωμένους, υαλώδεις, πολυκύτταρους κονιδιοφόρους που διακλαδίζονται χαρακτηριστικά σε σπονδύλους που καταλήγουν σε 3-4 πλάγια, κοντά, μονοκύτταρα φιαλίδια. Το μέγεθος των φιαλιδίων κυμαίνεται (16-35×1-2,5) μm και σε σπάνιες περιπτώσεις τα φιαλίδια μπορεί να φέρουν διακλαδώσεις. Στην κορυφή κάθε φιαλιδίου παράγονται διαδοχικά πολλά κονίδια, τα οποία συγκρατούνται μεταξύ τους με μια κολλώδη ουσία και έτσι σχηματίζονται μικρές κεφαλές κονιδίων (Εικόνα 1). Η απελευθέρωση των κονιδίων γίνεται με το νερό (Παναγόπουλος, 1993). Τα σπόρια κυρίως είναι υαλώδη και έχουν σχήμα ελλειψοειδές έως ακανόνιστο, υποκυλινδρικό και μεγέθους (2,5-8×1,4-3,2) μm (Hawksworth *et al.*, 1970). Γενικά δεν έχουν, αλλά μπορεί να φέρουν ένα, εγκάρσιο διάφραγμα (Παναγόπουλος, 1993).



Εικόνα 1. Αριστερά κονιδιοφόροι και κονίδια του μύκητα *Verticillium dahliae* (<http://www.mycology.adelaide.edu.au/gallery/photos/vert1.gif>), ενώ δεξιά κορυφή του φιαλιδίου που φέρει τα κονίδια (<http://www.ubpb.gwdg.de/~forschergruppe/Bilder/verticillium.gif>).

Το μυκήλιο είναι πολυκύτταρο και δεν σχηματίζει χλαμυδοσπόρια, παρά μόνο μικροσκληρώτια σκούρου χρώματος ως διαχειμάζουσες μορφές. Τα μικροσκληρώτια σε θρεπτικά υποστρώματα αρχίζουν να σχηματίζονται στο κέντρο της αποικίας από μια υφή με επαναλαμβανόμενες εκβλαστήσεις (Εικόνα 2), έχουν χρώμα μαύρο, είναι κομβολογιοειδή ή βοτρυοειδή και αποτελούνται από διογκωμένα, σχεδόν σφαιρικά, κύτταρα. Το μέγεθος και το σχήμα των μικροσκληρωτίων ποικίλει από επίμηκες έως σφαιρικό διαμέτρου 15-150 μm (Hawke & Lazarovits, 1994).



www.agroinformacion.com/img/upload/Noticias/Olivar/Verticilosis/2.gif A: Κονιοφόρος με σπονδυλωτή διακλάδωση
B: Κονίδια
Γ: Νεαρό μικροσκληρώτιο
Δ: Ώριμο μικροσκληρώτιο

Εικόνα 2. Καρποφορίες του μύκητα *Verticillium dahliae*.

Συμπτώματα

Η βερτισιλλίωση στην Ελλάδα προκαλεί έντονα συμπτώματα στο τέλος της άνοιξης και τέλος καλοκαιριού-αρχές φθινοπώρου (ο μύκητας *V. dahliae* αναπτύσσεται σε θερμοκρασίες 21-27°C), ενώ σε υψηλότερες θερμοκρασίες (καλοκαίρι) η επέκταση της ασθένειας είναι βραδεία (Pegg, 1974; Τζάμος, 2004). Η ασθένεια αρχικώς εκδηλώνεται με το μαρασμό μεμονωμένων φύλλων ή φυλλιδίων και τα ασθενή φυτά εμφανίζουν το σύνδρομο του βραδέως μαρασμού, το οποίο πολλές φορές εμφανίζεται με τη μορφή ημιπληγίας. Στο έλασμα των κατωτέρων φύλλων εμφανίζεται αρχικά μεσονεύρια χλώρωση και στη συνέχεια νέκρωση των χλωρωτικών ιστών, μαρασμός (φύλλο «σημαία») και πτώση των φύλλων. Τα συμπτώματα αυτά εκδηλώνονται αργότερα και στα ανώτερα φύλλα. Τα προσβεβλημένα φυτά γίνονται καχεκτικά και τελικά μπορεί να ξηραθούν (Παναγόπουλος, 1993). Φυτά οποιασδήποτε ηλικίας μπορεί να προσβληθούν και τα πιο έντονα συμπτώματα εμφανίζονται κυρίως μετά το στάδιο της καρπόδεσης. Τα προσβεβλημένα φυτά παράγουν λιγότερους και μικρότερους καρπούς σε σχέση με τα υγιή (Horst, 1990).

Το χαρακτηριστικό, αλλά μη παθογνωμονικό¹, σύμπτωμα της ασθένειας είναι ο καστανός ή βαθυκάστανος μεταχρωματισμός των αγγείων του ξύλου, που εμφανίζεται σε επιμήκη ή εγκάρσια τομή του στελέχους (Εικόνα 3). Σε μικροσκοπική εξέταση εγκάρσιων τομών του στελέχους από προσβεβλημένα φυτά παρατηρούνται άφθονες μυκηλιακές υφές μέσα στα αγγεία του ξύλου. Ο μεταχρωματισμός είναι εμφανής στις ρίζες και επεκτείνεται σε όλο το μήκος των στελεχών (ή μόνο στη μία πλευρά του στελέχους ή σε όλα τα αγγεία), ακόμη και στα αγγεία των καρπών ορισμένων φυτών (Παναγόπουλος, 1993). Στην ελιά, ο μεταχρωματισμός των αγγείων του ξύλου είναι συνήθως ανύπαρκτος (Παναγόπουλος, 1993).

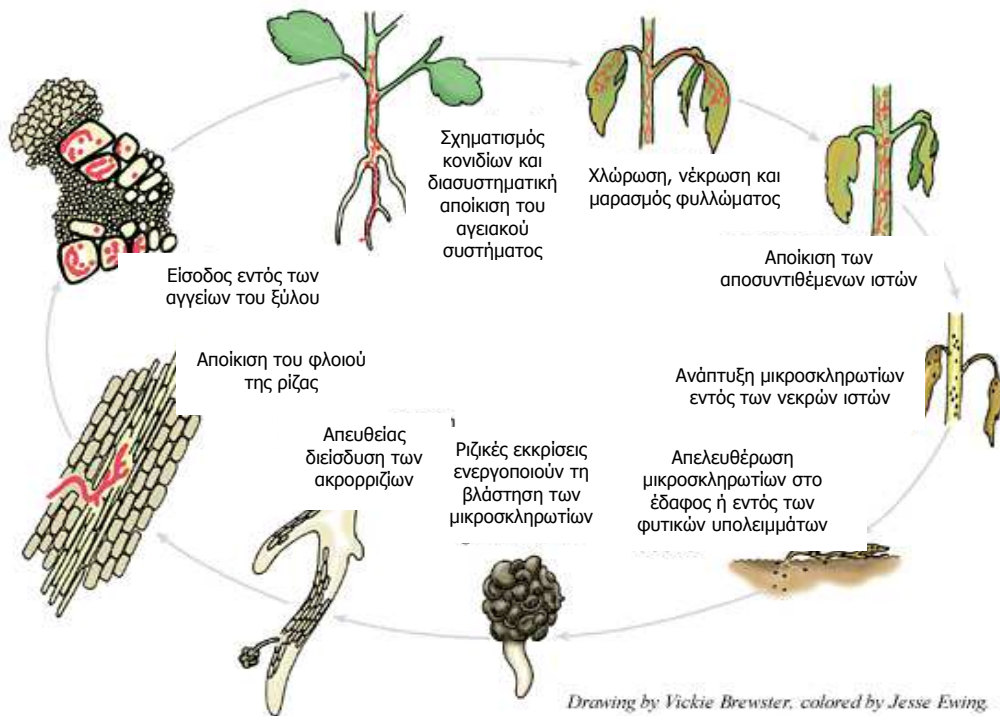


Εικόνα 3. Καστανός μεταχρωματισμός στα αγγεία του ξύλου σε φυτό ξενιστή του *V. dahliae* (www.bssp.org.uk/ndr/July2004/2004-06-02.jpg).

¹ Ο καστανός μεταχρωματισμός στα αγγεία των ετήσιων φυτών δεν αποτελεί παθογνωμονικό σύμπτωμα των αδρομυκώσεων, γιατί μπορεί να προκληθεί και από άλλα αίτια, π. χ. τοξικότητα αχώνευτης κοπριάς, υπερβολική λίπανση, ζεστό νερό (Τζάμος, 2004). Για αυτούς τους λόγους θα πρέπει να να διενεργείται και η εργαστηριακή εξέταση των φυτών με απομονώσεις στα κατάλληλα τεχνητά υποστρώματα.

Ο βιολογικός κύκλος της ασθένειας

Ο βιολογικός κύκλος της βερτισιλλίωσης (Εικόνα 4) μπορεί να διακριθεί σε τρία στάδια: το παρασιτικό στάδιο, το οποίο ακολουθείται από ένα μικρής διάρκειας σαπροφυτικό, και το στάδιο διαχείμανσης. Η μυκηλιακή κατασκευή που απομένει κατά το στάδιο διαχείμανσης² ονομάζεται μικροσκληρώτιο, το οποίο σχηματίζεται σε αποσυντιθέμενους και νεκρούς φυτικούς ιστούς του κάθε ξενιστή (Horst, 1990). Η βλάστηση των μικροσκληρωτίων είναι άκρως ευαίσθητη στην εδαφική μυκόσταση και λαμβάνει χώρα μόνο σε παρουσία υψηλών συγκεντώσεων θρεπτικών στοιχείων.



Εικόνα 4. Ο βιολογικός κύκλος της ασθένειας, που προκαλείται από το μύκητα *Verticillium dahliae*. (<http://www.apsnet.org/education/LessonsPlantPath/Verticillium/Images/verticullumcycle.JPG>)

Το παρασιτικό στάδιο ξεκινά όταν η βλαστανούσα υφή μολύνει τον ξενιστή στα ακρορριζία ή στα σημεία έκφυσης των ριζικών τριχιδίων (Gerik & Huisman, 1988). Τα μικροσκληρώτια βλαστάνουν συνήθως με υφή, ως το αποτέλεσμα της ευνοϊκής επιδράσεως των εκκρίσεων της ρίζας (Emmaty & Green, 1969). Οι εν λόγω εκκρίσεις είναι υψηλότερες στη ζώνη επιμηκύνσεως της ρίζας και οι περισσότερες από τις αρχικές επαφές γίνονται σε αυτή τη θέση (Huisman, 1982). Ο μύκητας έχει τη δυνατότητα να διαπερνά απευθείας τα κύτταρα στα ριζικά τριχίδια, στην καλύπτρα της ρίζας και στα επιδερμικά κύτταρα της περιοχής αυξήσεως της ρίζας. Αρχικά ο μύκητας διαπερνά ένδο- ή μεσοκυτταρικώς την επιδερμίδα-παρέγχυμα-ένδοδερμίδα και καταλήγει στα αγγεία του ξύλου (Huisman & Gerik, 1989). Στη συνέχεια, η ανάπτυξη επιτυγχάνεται μέσω της αναπτύξεως των υφών και της μεταφοράς των κονιδίων που παράγονται εντός των αγγείων του ξύλου του φυτού και μπορούν να μετακινηθούν ταχύτατα σε μεγάλες σχετικά αποστάσεις μέσω του ανιόντος ρεύματος. Τα κονίδια παγιδεύονται στα εγκάρσια τοιχώματα των αγγείων και είναι ικανά να βλαστήσουν και να μολύνουν μεμονωμένους βλαστούς σε διάφορα μέρη του υπέργειου τμήματος των φυτών. Η βλαστική υφή μπορεί να διαπεράσει τα τοιχώματα και να αναπτυχθεί σε γειτονικό αγγείο (Gerik & Huisman, 1985). Λόγω της ενζυματικής δράσης του μυκηλίου, τα αγγεία μεταχρωματίζονται από την οξειδωση

² Το παθογόνο επιβιώνει επίσης ως μυκήλιο ή κονίδια στα προσβεβλημένα υπολείμματα της καλλιέργειας, ετήσιων κυρίως φυτών, ωστόσο οι μορφές αυτές δεν συμβάλλουν στη μεγάλης διάρκειας επιβίωση του παθογόνου σε σύγκριση με τα μικροσκληρώτια (Green, 1969).

των φαινολικών ενώσεων στα τοιχώματα των αγγείων του ξύλου και στα γειτονικά παρεγχυματικά τους κύτταρα. Παράλληλα, σχηματίζονται οι τυλώσεις που φράσσουν την κυκλοφορία του νερού και των ανόργανων θρεπτικών στοιχείων (Huisman & Gerik, 1989). Αργότερα, στο υπέργειο τμήμα του φυτού εμφανίζονται μακροσκοπικώς τα συμπτώματα της ασθένειας.

Το σαπροφυτικό στάδιο του παθογόνου ξεκινά καθώς οι ιστοί του μολυσμένου φυτού αποσυντίθενται. Το μυκήλιο του παθογόνου που καταλαμβάνει τα αγγεία του ξύλου εισέρχεται στα εφαπτόμενα παρεγχυματικά κύτταρα και αποικίζει τον αποδιοργανωμένο φυτικό ιστό και σχηματίζει πολυάριθμα μικροσκληρώτια. Ακολούθως, τα μικροσκληρώτια ενσωματώνονται στο έδαφος με τα μολυσμένα φυτικά υπολείμματα, όπου και απελευθερώνονται σταδιακά για να ολοκληρωθεί με αυτό τον τρόπο ο βιολογικός κύκλος του παθογόνου. Ο φυτικός ιστός λοιπόν που έχει προσβληθεί αποσυντίθεται και καταρρέει μετά το πέρας της καλλιέργειας. Ουσιαστικά πρόκειται για έναν κύκλο όπου μικροσκληρώτια νεκρώνονται, ενώ άλλα σχηματίζονται και απελευθερώνονται στο έδαφος είτε κατόπιν μόλυνσης ξενιστών, είτε κατόπιν σχηματισμού τους στο ριζικό σύστημα διάφορων φυτών.

Αν και η βερτισιλλίωση αποτελεί μια τυπική εδαφογενής ασθένεια, η μόλυνση όμως ορισμένων καλλιεργειών π.χ. πατάτας ή μηδικής μπορεί να επιτελεσθεί και από τα φύλλα ή τομές κλαδέματος. Σε φυσικές όμως συνθήκες οι πιθανότητες μόλυνσης των φυτών από τα υπέργεια μέρη είναι πολύ μικρές (Παναγόπουλος, 1993).

Η επιδημιολογία της ασθένειας

Οι αδρομυκώσεις θεωρούνται μονοκυκλικές ασθένειες (Τζάμος, 2004). Ο πληθυσμός του μύκητα *V. dahliae* εξαρτάται από την καλλιεργητική ιστορία του αγρού, γιατί η απελευθέρωση των μικροσκληρωτίων, διασπορά τους και ενσωμάτωσή τους στο έδαφος από τα μολυσμένα φυτικά υπολείμματα διαρκεί τουλάχιστον ένα έτος (Schnathorst, 1981; Mol & van Riessen, 1995). Η ανάπτυξη και ένταση της ασθένειας εξαρτάται από την επιβίωση και πυκνότητα του μολύσματος, από το ποσοστό βλαστικότητας των μικροσκληρωτίων και τον αριθμό των βλαστανόντων υφών, τη φυλή του παθογόνου, τον τρόπο διασποράς του παθογόνου στο έδαφος, την ποικιλία του φυτού, το έδαφος, τη θερμοκρασία του εδάφους και του αέρα, τα ζιζάνια, τις βροχοπτώσεις και τις αρδεύσεις, τη συγκαλλιέργεια και τις καλλιεργητικές επεμβάσεις (Παναγόπουλος, 1993; Hawke & Lazarovits, 1994; Mol *et al.*, 1996; Xiao *et al.*, 1997).

Ο μύκητας *V. dahliae* συμπεριφέρεται ως υποχρεωτικό παράσιτο, καθώς μολύνει ζωντανούς φυτικούς ιστούς και δεν αποικίζει την οργανική ουσία του εδάφους, διότι στερείται σαπροφυτικής ικανότητας. Επομένως, η διασπορά του παθογόνου συντελείται μόνο παθητικά. Η τοπική διασπορά των μολυσμάτων λαμβάνει χώρα με το νερό, τα υπολείμματα της καλλιέργειας, τα ζιζάνια και με το έδαφος που μεταφέρεται με τα εργαλεία και τα μηχανήματα κατεργασίας (Παναγόπουλος, 1993). Σε μεγάλες αποστάσεις το παθογόνο μεταφέρεται κυρίως με το μολυσμένο πολλαπλασιαστικό υλικό (φυτάρια ετήσιων φυτών, μοσχεύματα, εμβόλια, κόνδυλοι πατάτας, σπόρος). Ιδιαίτερη μνεία πρέπει να γίνει και για τον άνεμο, όπου στη μηδική τα κονίδια του παθογόνου έχουν αναφερθεί ως ανεμομεταφερόμενα μετά την κοπή της στον αγρό (Isaac & Heal, 1961). Επίσης, ο μύκητας μπορεί να μεταφερθεί σε μεγάλες αποστάσεις με τη δύνη και το στροβιλισμό του ανέμου, καθώς και με τα φύλλα μολυσμένων ξενιστών, όπως ελιάς και βαμβακιού (Τζάμος, 2004).

Το μικροσκληρώτιο του *Verticillium dahliae*

Τα μικροσκληρώτια (Εικόνα 5) είναι τα όργανα διατήρησης του μύκητα *V. dahliae* (Ashworth *et al.*, 1972) με τα οποία επιβιώνει στο έδαφος έως και 13-14 χρόνια (Wilhelm, 1955). Πρόκειται για σχηματισμούς που αποτελούνται από τη διαπλοκή μικρού αριθμού κυττάρων, χωρίς την παρουσία

φλοιού (Coley-Smith & Cooke, 1971). Όλα τα κύτταρα ενός μικροσκληρωτίου δεν είναι εκτεθειμένα στις βιολογικές και φυτικές επιδράσεις στο έδαφος. Σχηματίζονται κατά το σαπροφυτικό στάδιο του παθογόνου, όταν οι προσβεβλημένοι από το παθογόνο φυτικοί ιστοί νεκρωθούν (Menzies & Griebel, 1967; Green, 1969). Η πρωταρχική λειτουργία του μικροσκληρωτίου στο έδαφος είναι να φέρει σε επιτυχή επαφή το παθογόνο με το ευαίσθητο όργανο του ξενιστή (Coley-Smith & Cooke, 1971). Η βλάστηση των μικροσκληρωτίων απαιτεί εξωγενή θρεπτικά στοιχεία, όπως ριζικές εκκρίσεις ξενιστών ή μη-ξενιστών (Schreiber & Green, 1963), για την ανάσχεση του φαινομένου της μυκόστασης του εδάφους (Emmaty & Green 1969; Coley-Smith & Cooke, 1971). Τα μικροσκληρώτια του μύκητα *V. dahliae* βλαστάνουν με την ανάπτυξη υφών, ενώ αναφέρεται ότι μπορούν να παράγουν στο έδαφος εφήμερα κονίδια (Ashworth *et al.*, 1972) ή κονιδιοφόρο (Αντωνόπουλος, 1998).

Τα μικροσκληρώτια αποτελούνται από κύτταρα ποικίλου μεγέθους, σχήματος, πάχους κυτταρικών τοιχωμάτων και βαθμού χρώσεως (Gordee & Porter, 1961; Schreiber & Green, 1963). Διακρίνονται τρία είδη κυττάρων: α) με παχιά τοιχώματα, μελανά, κύτταρα που φέρουν μιτοχόνδρια και κυττόπλασμα και αλληλοσυνδέονται μέσω των πόρων των εγκάρσιων χωρισμάτων (septa), β) με λεπτά τοιχώματα, σαλώδη ή ελαφρώς χρωματισμένα κύτταρα σε στενή επαφή με τα πρώτα, και γ) τις μικρές και λεπτών τοιχωμάτων υφές που πλέκονται στη μικροσκληρωτιακή μάζα. Τα σαλώδη κύτταρα είναι απενεργοποιημένα, ενώ τα κύτταρα που φέρουν τη μελανίνη μπορούν να βλαστήσουν μέσω των πόρων των εγκάρσιων τοιχωμάτων. Η μελανίνη είναι χρωστική σκούρου μαύρου χρώματος (Bell *et al.*, 1976) και σχηματίζεται υπό μορφή κόκκων στην εξωτερική πλευρά των κυτταρικών τοιχωμάτων των μικροσκληρωτίων και στο ινώδες δίκτυο που περιβάλλει τα κυτταρικά τοιχώματα (Wheeler *et al.*, 1976). Σε πολλούς μύκητες η μελανίνη είναι φαινολικό παράγωγο με πρόδρομο ένωση την τυροσίνη, ωστόσο στο μύκητα *V. dahliae* είναι ινδολικό παράγωγο (Bell *et al.* 1976; Stipanovic & Bell, 1976). Σκοπός της είναι να προστατεύει τα κυτταρικά τοιχώματα των μυκήτων από τη δράση των υδρολυτικών ενζύμων χιτινάσης και ένδο-β-1,3-γλουκανάσης, τα οποία παράγονται από τους φυσικούς ανταγωνιστές του μύκητα στο έδαφος και προκαλούν τη λύση των κυτταρικών τοιχωμάτων. Ακόμα, η μελανίνη φαίνεται να προστατεύει το μύκητα από την UV ακτινοβολία, ξήρανση και ακραίες τιμές θερμοκρασίας, όπου ο βαθμός προστασίας της είναι ανάλογος με τη συγκέντρωσή της στα μικροσκληρώτια (Bell & Wheller, 1986). Η επιβίωση των μικροσκληρωτίων στο έδαφος ευνοείται από ξηρικές αερόβιες συνθήκες (Coley-Smith & Cook, 1971).

Τα μικροσκληρώτια εντοπίζονται κυρίως σε βάθος έως 30 cm από την επιφάνεια του εδάφους, αν και έχουν παρατηρηθεί και σε βάθος 1 m (Schnathorst, 1981). Επίσης, έχουν την ικανότητα να βλαστάνουν στο έδαφος περισσότερες από μία φορές κατά τη διάρκεια αρδεύσεων και αποξηράνσεων του εδάφους. Ωστόσο, η επαναλαμβανόμενη βλάστησή τους οδηγεί σε συνεχή μείωση του ποσοστού βλαστικότητάς τους, σε ελάττωση του μεγέθους της βλαστικής υφής (Farley *et al.*, 1971) και ενδεχομένως τα καθιστά πιο ευαίσθητα στη μυκόσταση του εδάφους (Emmaty & Green, 1969 Coley-Smith & Cooke, 1971; Mol & van Riessen, 1995).

Τα μικροσκληρώτια περιέχουν σε μεγάλες ποσότητες ουσίες με υψηλή ενέργεια τόσο σε αδιάλυτη, όσο και σε διαλυτή μορφή. Ένα από τα βασικότερα γεγονότα στη φυσιολογία των μικροσκληρωτίων κατά τη διάρκεια της βλάστησής τους είναι η μετατροπή των αδιάλυτων αποθηκευμένων ουσιών σε διαλυτούς υδατάνθρακες (Coley-Smith & Cooke, 1971). Βασική αποθηκευτική ουσία είναι τα λιπίδια ή



Εικόνα 5. Μικροσκληρώτια του μύκητα *V. dahliae* που πάνω σε φυτικούς ιστούς ξενιστού του.

<http://www.mtt.fi/ktl/ksu/perunaryhma/kuvat/mikrosklerootio.io>

πολυσακχαρίτες (γλουκάνες). Τα λιπίδια και οι αδιάλυτοι υδατάνθρακες φαίνεται να είναι σημαντικές ενώσεις αποθήκευσης. Οι διαλυτοί υδατάνθρακες είναι κυρίως μαννιτόλη, τρεχαλόζη και σε μικρότερες ποσότητες γλυκόζη, φρουκτόζη, μαννόζη, αραμπιτόλη και ινοσιτόλη.

Τρόποι αντιμετώπισης της βερτισιλλώσης

Σύμφωνα με το «τετράεδρο της ασθένειας», τα ασθενή φυτά είναι το αποτέλεσμα αλληλεπίδρασης φυτού, παθογόνου, περιβάλλοντος και χρόνου, που επηρεάζεται σαφώς από τον ανθρώπινο παράγοντα (Τζάμος, 2004). Δυσχέρειες στην αντιμετώπιση της βερτισιλλώσης έχουν σχέση α) με τη φύση του παθογόνου (π.χ. ευρεία γεωγραφική διάδοση με ευρύ φάσμα ξενιστών και έλλειψη εξειδίκευσης, καθώς επίσης η παρουσία ανθεκτικών διαχειμαζουσών κατασκευών και παρουσία του στα αγγεία των μολυσμένων φυτών), β) με την επιδημιολογία της ασθένειας (π.χ. μεταφορά του παθογόνου με το έδαφος, νερό, σπόρο και άνεμο ή ύπαρξη ευπαθών ασυμπτωτικών ζιζανίων, που αποτελούν κύρια πηγή μόλυνσεως του εδάφους) και γ) η έλλειψη αποτελεσματικών μυκητοκτόνων και λανθασμένα συστήματα αμειψισποράς (π.χ. χρήση σιτηρών στο παρελθόν, τα οποία προσβάλλονται από το μύκητα και συμβάλλουν στη διασπορά των μικροσκληρωτίων). Ωστόσο, τα μέτρα αντιμετώπισης της βερτισιλλώσης, ανάλογα με το ποιόν από τους παράγοντες ανωτέρω κυρίως επηρεάζουν, μπορούν να ταξινομηθούν:

α) Καλλιεργητικά μέτρα (Γεωργόπουλος & Ζιώγας, 1992; Παναγόπουλος, 1993)

- Αποφυγή δημιουργίας πληγών με τα καλλιεργητικά εργαλεία στο λαιμό και στις ρίζες.
- Η άρδευση των δένδρων να μη γίνεται με αυλάκια, γιατί τα μόλυσματα μεταφέρονται με το νερό στα υγιή δένδρα ή ετήσια φυτά.
- Χρησιμοποίηση υγιούς πολλαπλασιαστικού υλικού σε αμόλυντο αγρό.
- Αποφυγή χρήσης κοπριάς που μπορεί να περιέχει υπολείμματα φυτών ευαίσθητων στο μύκητα.
- Αποφυγή της συγκαλλιέργειας των δένδρων με ετήσια φυτά-ξενιστές, καθώς και αποφυγή της μονοκαλλιέργειας.
- Καταπολέμηση των ζιζανίων πολλά από τα οποία είναι ξενιστές του μύκητα και συμβάλλουν στην αύξηση και διάδοση του μολύσματος.
- Εκρίζωση των προσβεβλημένων φυτών ή αφαίρεση των προσβεβλημένων κλάδων στα δένδρα, απομάκρυνση και καταστροφή τους με το κάψιμο. Η ίδια διαδικασία ακολουθείται και για τα υπολείμματα της καλλιέργειας.
- Αποφυγή υπερβολικών αζωτούχων λιπάνσεων, γιατί ευνοούν την ασθένεια.
- Αποφυγή βαθέως οργώματος-φρεζαρίσματος, επειδή δημιουργούνται πληγές στο ριζικό σύστημα.

β) Ανθεκτικές ποικιλίες

Η χρήση ανθεκτικών ποικιλιών αποτελεί ιδανικό και φθινό τρόπο καταπολέμησης σε σχέση π. χ. με τη χρήση μυκητοκτόνων. Οι ανθεκτικές ή/και ανεκτικές ποικιλίες (*μάλιστα, πολλές φορές ως ασυμπτωτικοί φορείς*) και υποκείμενα δύνανται να επιφέρουν αύξηση των αποδόσεων των καλλιεργειών, αλλά δεν επιδρούν στη μείωση του μολύσματος στο έδαφος και ελοχεύει ο κίνδυνος για την επόμενη ευαίσθητη καλλιέργεια (Τζάμος, 2004).

Παραδείγματα δημιουργίας ή χρήσης ανθεκτικών ποικιλιών, υβριδίων ή υποκειμένων σε διάφορα φυτά για την αντιμετώπιση της βερτισιλλώσης αποτελούν τα υβρίδια και ποικιλίες που έχουν έναν κυρίαρχο γόνο *Ve* και έναν πολλαπλό γόνο, για τη φυλή 1 του παθογόνου σε καλλιέργειες τομάτας (Lynch, 1990). Για τη μελιτζάνα πραγματοποιείται ο εμβολιασμός σε ανθεκτικά στην ασθένεια υποκείμενα τομάτας, π. χ. το KVNTm (Sherf & Macnab, 1986). Στο βαμβάκι απαντώνται οι ανεκτικές

ποικιλίες Zeta 5 και Κορίνα και στην ελιά οι ανεκτικές ποικιλίες Κορωνέικη και Καλαμών (Τζάμος, 2004). Οι ποικιλίες μηδικής παρουσιάζουν διάφορα επίπεδα ανθεκτικότητας στην ασθένεια, ενώ απεδείχθει ότι υπάρχει δυνατότητα δημιουργίας ποικιλιών που δεν εκδηλώνουν τα συμπτώματα της ασθένειας με μεθόδους ιστοκαλλιέργειας (Latunda-Data & Lucas, 1985; Pennypacker *et al.*, 1985).

γ) Χημική καταπολέμηση

Η χρησιμοποίηση χημικών ενώσεων που μπορούν να θανατώσουν το οποιοδήποτε παθογόνο, να παρεμποδίσουν ή να επιβραδύνουν την ανάπτυξη του είναι οποσδήποτε ο συνθηθέστερος τρόπος καταπολέμησης, τουλάχιστον στις περιοχές με ανεπτυγμένη γεωργία. Ωστόσο, δεν υπάρχουν μέχρι σήμερα αγροχημικά σκευάσματα ικανά να αντιμετωπίζουν αποτελεσματικά τη βερτισιλλίωση, παρά σε περιπτώσεις που η χρησιμοποίηση διασυστηματικών μυκητοκτόνων, όπως thiophanate-methyl, carbendazim σε μεγάλες ποσότητες δραστικής ουσίας (24-56 kg/στρ.) ίσως να επιφέρουν κάποια θετικά αποτελέσματα με υψηλό κόστος. Πράγματι, τα διασυστηματικά κινούνται εντός των αγγείων του ξύλου από το έδαφος μαζί με το νερό και τα ανόργανα θρεπτικά στοιχεία προς τα φύλλα, οπότε και απομακρύνονται συνεχώς από τις θέσεις που βρίσκεται το παθογόνο, ενώ η καθοδική τους κίνηση είναι περιορισμένη. Η κίνηση των μυκητοκτόνων μέσω των αγγείων του ηθμού θα ήταν η πλέον υποσχόμενη προσέγγιση, γιατί με τον τρόπο αυτό τα μυκητοκτόνα παραλαμβάνονται από τα φύλλα και μεταφέρονται στο ριζικό σύστημα. Πιθανά μυκητοκτόνα αυτής της κατηγορίας φαίνεται να είναι διάφορες λιποφυλλικές ενώσεις, λόγω της περιορισμένης κινητικότητας που παρουσιάζουν. Όμως έχουν αυξημένη παραμονή τόσο στο έδαφος, όσο και στα φυτά (Τζάμος, 1989). Στην περίπτωση της νέκρωσης των μικροσκληρωτίων στο έδαφος με τη χρήση χημικών ουσιών, οι κυριότερες δυσκολίες είναι: α) η διάσπαση της δραστικής ουσίας του φαρμάκου στο έδαφος, β) η ανεπαρκής επαφή του μυκητοκτόνου με το μικροσκληρώτιο, και γ) οι συνήθως μεγάλες δόσεις δραστικής ουσίας που απαιτούνται για τη νέκρωση των μικροσκληρωτίων σε μεγάλα βάθη.

Η προληπτική χημική καταπολέμηση των εδαφογενών παθογόνων στηρίζεται στην προφυτρωτική απολύμανση του εδάφους και συχνά αποτελεί τη μοναδική διέξοδο της αντιμετωπίσεώς τους. Ένα μέρος των απολυμαντικών που προστίθενται στο έδαφος διαφεύγει στον αέρα (πηητικές ουσίες), ένα άλλο προσροφάται στην οργανική ουσία και την άργιλλο και αδρανοποιείται, ενώ το υπόλοιπο διασπάται κατάληγοντας για το οργανικό μέρος στην οξειδωση σε CO_2+H_2O και για το ανόργανο στην παραμονή του στο έδαφος υπό τη μορφή διαφόρων ενώσεων. Το μειονέκτημα χρήσης των απολυμαντικών εδάφους είναι ότι εκτός από τα εδαφογενή παθογόνα, εξοντώνονται παράλληλα και πολλοί άλλοι μικροοργανισμοί που συνθέτουν την εδαφική μικροχλωρίδα. Συνήθως επιζούν μόνο τα σποριογόνα βακτήρια, μύκητες που ανέπτυξαν ανθεκτικότητα ή και ορισμένα ζιζάνια, ενώ δύο μήνες μετά την απολύμανση επανεμφανίζεται σημαντικός αριθμός των αποικιών της εδαφικής μικροβιοκοινότητας. Σε αυτό το διάστημα εξαιτίας της ελλείψεως της μυκόστασης (βιολογικό κενό) επικρατούν ευνοϊκές συνθήκες για την ανάπτυξη φυτοπαθογόνων μυκήτων, οι οποίοι επαναμολύνουν το έδαφος. Η ένταση και η έκταση των προσβολών είναι μεγαλύτερη από ό,τι θα παρουσιαζόταν εάν το έδαφος δεν απολυμινόταν, ενώ η επαναφορά της μικροβιακής ισορροπίας στο έδαφος πραγματοποιείται μετά από μεγάλο χρονικό διάστημα. Μεταξύ άλλων, ο κυριότερος και δραστικότερος για τη βερτισιλλίωση εκπρόσωπος των απολυμαντικών εδάφους, το βρωμιούχο μεθύλιο, έχει ήδη απαγορευθεί σε υπαίθριες και υπό κάλυψη καλλιέργειες.

δ) Ηλιοαπολύμανση

Η ηλιοαπολύμανση αποτελεί μια τεχνική απολυμάνσεως του εδάφους (Katan, 1981) και η εφαρμογή της έχει δώσει πολύ καλά αποτελέσματα (Αντωνίου, 1995). Αποτελεί μία προληπτική-

θεραπευτική μέθοδος καταπολέμησης του εδαφογενών παθογόνων και εφαρμόζεται κυρίως σε ετήσιες καλλιέργειες θερμοκηπίου. Στη χώρα μας η μέθοδος εφαρμόζεται σε πολλούς νομούς με ικανοποιητικά αποτελέσματα τόσο σε πειραματικό, όσο και σε εμπορικό επίπεδο (Tjamos & Faridis, 1980; Tjamos & Paplomatas, 1988). Για τις θερμοκηπιακές καλλιέργειες είναι ο αποτελεσματικότερος και οικονομικότερος τρόπος αντιμετώπισης της βερτισιλλώσεως μόνη της ή σε συνδυασμό με μειωμένες δόσεις απολυμαντικού εδάφους (Tjamos & Fravel, 1995a,b). Σκοπός της ηλιοαπολυμάνσεως είναι καταστροφή ή μείωση των μολυσμάτων-διαχειμαζουσών μορφών των παθογόνων, που υπάρχουν στα καλλιεργούμενα εδάφη (Chellemi & Olson, 1994). Στις αδρομυκώσεις το τελικό ποσό της ασθένειας εξαρτάται και από το ποσό του αρχικού μολύσματος (Ashworth *et al.*, 1979), οπότε η βερτισιλλώση αντιμετωπίζεται αποτελεσματικότερα με το αν μειωθεί το αρχικό μόλυσμα (Tjamos & Fravel, 1995a,b). Η αποτελεσματικότητα της μεθόδου είναι μακροχρόνια και μπορεί να διαρκέσει ακόμα και για τρεις συνεχόμενες καλλιεργητικές περιόδους (Tjamos & Paplomatas, 1988).

ε) Βιολογική αντιμετώπιση

Η βιολογική αντιμετώπιση ασθενειών περιλαμβάνει τη χρήση κάθε οργανισμού που θα καταστείλει το παθογόνο (disease-suppressors) συμπεριλαμβανομένου και της ανθεκτικότητας του ξενιστού-φυτού (Cook, 1985; Handelsman & Stabb, 1996) με απώτερο στόχο την υγεία του φυτού. Η καταστολή των ασθενειών με τη χρήση παραγόντων βιολογικής αντιμετώπισης είναι η απόρροια αλληλεπιδράσεων μεταξύ του φυτού, του παθογόνου, του βιολογικού παράγοντα, της μικροβιακής χλωρίδας πάνω και γύρω από το φυτό και του φυσικού περιβάλλοντος. Οι προσεγγίσεις της βιολογικής αντιμετώπισης διακρίνονται σε τρεις άξονες (Cook, 1985): α) αντιμετώπισης του μολύσματος του παθογόνου με τη χρήση των καλλιεργητικών τεχνικών της αγρανάπαυσης, αμειψισποράς και άροσης, οι οποίες προσφέρουν το απαιτούμενο χρονικό διάστημα για τη φθορά του μολύσματος από τη δράση των ήδη υπάρχοντων εδαφογενών ανταγωνιστικών μικροοργανισμών και της περαιτέρω αποδιοργάνωσης και αποσύνθεσης των προσβεβλημένων από τα παθογόνα φυτικών υπολειμμάτων, β) της προστασίας της φυτικής επιφάνειας, κυρίως μέσω της απόθεσης των κατάλληλων ανταγωνιστών (βιολογική αντιμετώπιση) και γ) ανοσοποίηση των φυτών.

Μέχρι σήμερα, πλήθος μυκήτων και βακτηρίων με δυνατότητες βιολογικής δράσης εναντίον διαφόρων ασθενειών των φυτών έχει ήδη αναφερθεί. Επίσης, δύναται και η χρήση μη παθογόνων στελεχών των μικροοργανισμών αυτών, η ανοσοποίηση των φυτών με τη χρησιμοποίηση διαφόρων βιοτικών ή αβιοτικών παραγόντων και ο συνδυασμός τοξικών για τα παθογόνα φυτικών υπολειμμάτων (Baker, 1968; Cook, 1985; Subbarao *et al.*, 1999). Όπως προαναφέρθηκε, η ριζόσφαιρα χαρακτηρίζεται από ραγδαίες μεταβολές, συνεχή μικροβιακή δραστηριότητα και υψηλούς πληθυσμούς βακτηρίων συγκριτικά με το υπόλοιπο έδαφος. Αυτή ακριβώς η δυναμική φύση της είναι που τη χαρακτηρίζει ως μια ενδιαφέρουσα περιοχή εκδήλωσης των αλληλεπιδράσεων που οδηγούν στην ασθένεια και τη βιολογική αντιμετώπισή της (Handelsman & Stabb 1996). Οι μηχανισμοί δράσεως της ανταγωνιστικής δραστηριότητας των βιολογικών παραγόντων είναι ο ανταγωνισμός για θρεπτικά στοιχεία, η παραγωγή τοξινών και αντιβιοτικών, ο παρασιτισμός (αποδιοργάνωση κυτταρικών τοιχωμάτων του παθογόνου από τη δράση λυτικών ενζύμων), η ανοσοποίηση, καθώς και συνδυασμός όλων αυτών (Baker, 1968; Chet *et al.*, 1990; Hornby, 1990; Handelsman & Stabb, 1996).

Μηχανισμοί δράσεως των βιολογικών ανταγωνιστών

α) (Τροφικός) Ανταγωνισμός

Οι μικροοργανισμοί ανταγωνίζονται μεταξύ τους για τα βασικά θρεπτικά στοιχεία στο έδαφος και στην περιοχή της ριζόσφαιρας. Ο ανταγωνισμός μεταξύ των βιολογικών παραγόντων και του

παθογόνου με την αποστέρηση των θρεπτικών συστατικών στο δεύτερο μπορεί να οδηγήσει στη μείωση της δράσεώς του. Αναλυτικότερα, οι μεγάλοι βακτηριακοί πληθυσμοί εγκαθίστανται στο ριζικό σύστημα των φυτών, όπου και καταναλώνουν τα ποσά άνθρακα και αζώτου, που είναι απαραίτητα για την ενεργοποίηση των μορφών διαχείμανσης του εκάστοτε παθογόνου ή προσφέρουν την ενέργεια για επακόλουθη αποίκιση της ριζόσφαιρας (Weller, 1988). Το πιο χαρακτηριστικό παράδειγμα αυτής της περιπτώσεως αποτελεί ο θρεπτικός ανταγωνισμός για το σίδηρο.

Τα βακτήρια χρειάζονται σίδηρο σε μορφή συγκεντρώσεις για την ανάπτυξή τους και έτσι έχουν αποκτήσει υψηλής ικανότητας μηχανισμούς δέσμευσης του σιδήρου μέσα στο κύτταρό τους. Ο τυπικός μηχανισμός περιλαμβάνει ένα σιδηροφόρο (μικρού μοριακού βάρους ένωση μεταφοράς Fe^{3+}) που δεσμεύει το σίδηρο και μια πρωτεΐνη που μεταφέρει το σίδηρο μέσα στο βακτηριακό κύτταρο (Neilsands & Nakamura, 1991; Handelsman & Stabb, 1996). Οι σιδηροφόροι επομένως συμβάλλουν στον περιορισμό των ιόντων Fe στη ριζόσφαιρα, στερώντας τον από τα παθογόνα και μειώνοντας με αυτό τον τρόπο την ανάπτυξή τους (Chet *et al.*, 1990). Εκτός από το ρόλο της μεταφοράς του τρισθενούς σιδήρου, οι σιδηροφόροι βοηθούν στην ανάπτυξη του φυτού και μερικοί είναι δυνητικά αντιβιοτικά (Leong, 1986). Σε τελευταίες μελέτες απεδείχθη, ότι η διαθεσιμότητα του σιδήρου στο φυτό επηρεάζει και τη μικροβιακή σύνθεση στη ριζόσφαιρα (Yang & Crowley, 2000).

β) Αντιβίωση

Στη διεθνή βιβλιογραφία υπάρχουν ήδη πολλές αναφορές σχετικά με την παραγωγή αντιμυκητιακών μεταβολιτών (εκτός των μεταλλικών ιόντων και των διαφόρων ενζύμων) *in vitro* και *in vivo* από βακτήρια και μύκητες. Τα αντιβιοτικά είναι οργανικές ενώσεις μικρού μοριακού βάρους που παράγονται κυρίως από τους εδαφογενείς μικροοργανισμούς και σε μικρές συγκεντρώσεις παρεμποδίζουν την ανάπτυξη ή άλλες μεταβολικές διεργασίες άλλων μικροοργανισμών (Fravel, 1988a). Αυτός ο εξειδικευμένος τρόπος ανταγωνισμού πραγματοποιείται είτε με εξειδικευμένους τοξικούς μεταβολίτες μικροβιακής προέλευσης, είτε με μυκοτοξίνες εδάφους, είτε με λυτικούς παράγοντες (Paranizas & Lumsden, 1980), είτε με ένζυμα ή άλλες τοξικές ενώσεις (Fravel, 1988a). Σε πολλά συστήματα βιολογικής αντιμετώπισης που έχουν μελετηθεί, έχει αποδειχθεί ότι ένα ή περισσότερα αντιβιοτικά παίζουν ρόλο στην καταστολή της εκάστοτε ασθένειας.

Η αντιβίωση αποτελεί το βασικότερο τρόπο καταστολής ασθενειών από βακτήρια και πολλές φορές δρα συνεργιστικά με άλλους μηχανισμούς, όπως τον ανταγωνισμό και τον παρασιτισμό (Fravel, 1988a). Η δημιουργία της ζώνης παρεμπόδισης στη διπλή *in vitro* καλλιέργεια (βιολογικός παράγοντας και παθογόνο) οφείλεται στην ταυτόχρονη παραγωγή αντιβιοτικών, τοξικών μεταβολιτών ή/και σιδηροφόρων και αποτελεί κλασικό τρόπο αρχικής αξιολόγησης δυνητικών ανταγωνιστών (Swadling & Jeffries, 1996). Μελέτη μεγάλου αριθμού μικροοργανισμών που παρήγαγαν αντιβιοτικά, το 40% παρουσίασε αντιβίωση *in vitro*, αλλά ένα πολύ μικρό ποσοστό τους ήταν και δυνητικοί ανταγωνιστές εδαφογενών παθογόνων (Fravel, 1988a).

γ) Παρασιτισμός

Οι μικροοργανισμοί που είναι ικανοί να προκαλούν κυτταρόλυση άλλων οργανισμών είναι ευρύτατα διαδεδομένοι στα φυσικά οικοσυστήματα. Διάφοροι μύκητες και βακτήρια παράγουν ένζυμα κυτταρολύσεως και μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως βιολογικοί ανταγωνιστές κατά των μυκήτων, π. χ. *Fusarium* και *Pythium* (Chet *et al.*, 1990). Οι πτητικές ουσίες έχουν μυκητοκτόνες ιδιότητες εναντίον πολλών μυκήτων, αλλά δρουν και ως παράγοντες παραμόρφωσης για ορισμένους από αυτούς, ενώ τα ένζυμα παρεμβάλλονται στη βιολογική αντιμετώπιση μεταξύ του παρασιτισμού και αντιβίωσης (Fravel, 1988a). Παραγωγή ενός ενζύμου από έναν ανταγωνιστή που αποδιοργανώνει το κυτταρικό τοίχωμα

συμμετέχει ταυτόχρονα και στις δύο διαδικασίες. Παράδειγμα αποτελεί ο ανταγωνιστής μύκητας *Talaromyces flavus*, ο οποίος παρασιτεί ορισμένους μύκητες και παράλληλα παράγει την οξειδάση της γλυκόζης από την οποία παράγεται το H₂O₂ που νεκρώνει τα μικροσκληρώτια του *V. dahliae in vitro* και στο έδαφος (Fravel, 1988a; Tjamos & Fravel, 1995b).

Ο μυκοπαρασιτισμός έχει προταθεί ως ο μηχανισμός της βιολογικής αντιμετώπισης από τον *Trichoderma* spp και *Gliocladium virens*. Το παράσιτο αναπτύσσεται με τις διακλαδώσεις των υφών του προς τον ξενιστή-στόχο, περιτυλίσσεται και προσκολλάται σε αυτόν με κατασκευές σαν appressorium, όπου και διατρύπουν το μυκήλιο του παθογόνου. Η πέψη των κυτταρικών τοιχωμάτων του ξενιστή εκπληρώνεται από μια συστοιχία εκκρινόμενων ενζύμων, όπως πρωτεάσες, χιτινάσες και γλουκανάσες (Paravizas & Lumsden, 1980). Αυτά τα ένζυμα συχνά έχουν ατομική δράση ενάντια στους μύκητες και συνεργιστική δράση σε μείγματα ή με τα αντιβιοτικά. Ο Campbell (1983) απέδειξε, ότι με την εφαρμογή μιας απομονώσεως του βακτηρίου *Bacillus* sp. συντελείται η αποδιοργάνωση των υφών του μύκητα *Gaeummanomyces graminis*.

δ) Αποικισμός

Ένας αποτελεσματικός βιολογικός παράγοντας αναπτύσσεται και αποικίζει τη φυτική επιφάνεια που πρόκειται να προστατεύει. Ο βαθμός αποικισμού και το αρχικό μέγεθος του πληθυσμού του βιολογικού παράγοντα σχετίζεται σημαντικά με την καταστολή της ασθένειας, ακόμα και σε χαμηλής πυκνότητας πληθυσμούς. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποικισμού (*ανταγωνισμός θέσης*) αποτελούν τα βακτήρια στη ριζόσφαιρα των φυτών ή οι ζύμες στη φυλλόσφαιρα (Weller, 1988).

ε) Ανοσοποίηση

Ανοσοποίηση (plant immunization) ονομάζεται η λειτουργία της βιολογικής ή βιοχημικής διέγερσης λανθανόντων μηχανισμών αντοχής, ώστε το φυτό να καθίσταται ανθεκτικό απέναντι σε περισσότερα του ενός παθογόνα (Ryan *et al.*, 1995; Sticher *et al.*, 1997). Η ανοσοποίηση εξαρτάται από παράγοντες που παρουσιάζονται στον ξενιστή μόνο όταν προκληθούν από α) κάποιο παθογόνο, β) μικροβιακή ή μη ουσία, γ) ριζοβακτήριο, λόγω του σχηματισμού ενώσεων από την αλληλεπίδραση ξενιστή-παθογόνου (Sequeira, 1983; Sticher *et al.*, 1997; van Loon *et al.*, 1998).

Η ανοσοποίηση αποτελεί φαινόμενο μη εξειδικευμένο, αφού οι μηχανισμοί που συμβάλλουν κάθε φορά είναι διαφορετικοί ανάμεσα στα συστήματα φυτών-παθογόνων, που προκαλούν μόλυνση (Lyon *et al.*, 1995). Τυπικά στοιχεία των μηχανισμών άμυνας του φυτού που διεγείρονται μετά την προσπάθεια του παθογόνου για μόλυνση είναι η αντίδραση υπερευαισθησίας (Hypersensitive Response, HR), η παραγωγή ενώσεων μέσω οξειδωτικής μεταβολικής έκρηξης (Reactive oxygen Species, ROS), η έκφραση των γόνων που συμβάλλουν στην άμυνα του φυτού (gene-for-gene resistance), οι δομικές αλλαγές (εναπόθεση καλλόζης και λιγνιτοποίηση) στο κυτταρικό τοίχωμα του φυτού, η σύνθεση φυτοαλεξινών, η παραγωγή των παρεμποδιστών πρωτεϊνών (proteinase inhibitors) και τα λυτικά ένζυμα γλουκανάσες και χιτινάσες (Lyon *et al.*, 1995). Αυτοί οι τοπικού χαρακτήρα αμυντικοί μηχανισμοί συγκροτούν την επίκτητη τοπική αντοχή (Localized Acquired Resistance, LAR), οι οποίοι λαμβάνουν χώρα στο σημείο της προσβολής και έχουν ως αποτέλεσμα τον περιορισμό της νεκρωτικής κηλίδας. Αντιθέτως, οι μηχανισμοί που συμβάλλουν στην επίκτητη διασυστηματική αντοχή (Systemic Acquired Resistance, SAR) ή στην επαγόμενη διασυστηματική αντοχή (Induced Systemic Resistance, ISR) διεγείρονται με διάφορους τρόπους, κυρίως μέσω της δημιουργίας νεκρωτικής κηλίδας ή της ύπαρξης των ριζοβακτηρίων, αντίστοιχα (Sticher *et al.*, 1997; Molina *et al.*, 1998; Pieterse *et al.*, 1998; van Loon *et al.*, 1998; Siegrist *et al.*, 2000) και έχουν διασυστηματική δράση αυξάνοντας την αντοχή του φυτού σε ακόλουθη προσβολή μολυσματικών

παθογόνων (Ebel & Mithofer, 1998). Η διασυστηματικά επαγόμενη ανοχή συνήθως ακολουθεί αυτή του τοπικού χαρακτήρα (Sequeira, 1983; Sticher *et al.*, 1997). Για την ενεργοποίηση όλων των λανθανόντων αμυντικών μηχανισμών απαιτείται η σύνθεση και η μεταφορά σήματος. Το σήμα είναι βιοχημικός ή φυσικο-ηλεκτρικός παράγοντας που παράγεται στο σημείο διέγερσης και μετακινείται διασυστηματικά, και άρα «προετοιμάζει» (conditioning) τους ιστούς για τη μόλυνση από το ίδιο ή άλλα παθογόνα. Παράγεται στο φύλλο διέγερσης και μετακινείται ταχύτατα και συνεχώς προς όλες τις κατευθύνσεις (ανοδικά και καθοδικά) (Τζάμος, 2004).

Τα φυτά αντιλαμβάνονται τα πολυάριθμα παθογόνα με την παρουσία διαφόρων χημικών ουσιών. Αυτές οι ουσίες κατέχουν το ρόλο του σήματος και αναγνωρίζονται από κατάλληλα συστήματα υψηλής βιοχημικής εξειδίκευσης. Πολυάριθμες χημικές ενώσεις διάφορων χημικών τύπων και κατηγοριών έχουν βρεθεί να έχουν την ικανότητα να ενεργοποιούν αμυντικούς μηχανισμούς του φυτού (Ebel & Mithofer, 1998). Πρόκληση της ανοσοποίησης μπορεί να υπάρξει ως αποτέλεσμα της μόλυνσης από ένα παθογόνο ή από μια σειρά άλλων παραγόντων, όπως: Παθογόνα, Μη παθογόνοι μικροοργανισμοί (σαπρόφυτα), Μη μολυσματικές μορφές παθογόνων μικροοργανισμών, Παθογόνοι μικροοργανισμοί που καθίστανται μη μολυσματικοί από συγκεκριμένες περιβαλλοντολογικές συνθήκες, Ασυμβίβαστες φυλές παθογόνων μικροοργανισμών, Χημικές ενώσεις, Φυτικά εκχυλίσματα (π.χ. οξαλικά άλατα που περιέχονται στο σπανάκι) και Μεγαλομοριακές ενώσεις παθογόνων, (Kessmann *et al.*, 1994; van Loon *et al.*, 1998, Τζάμος, 2004).

Λεπτομερέστερα, οι διεγέρτες διακρίνονται σε βιοτικούς [ολιγοσακχαρίτες (μύκητας: ολιγογλουκάνη, ολιγοχιτίνη, ολιγοχιτοσάνη και προσβεβλημένο φυτό: ολιγογαλακτουρονίνη), Γλυκοπεπίδια και πρωτεΐνες, λιπαρά οξέα, αμινοξέα, διεγέρτες από τα κυτταρικά τοιχώματα ζυμών, μικροβιακοί μεταβολίτες από σαπρόφυτα βακτήρια και μύκητες, σαλικυλικό και γιασμονικό οξύ, αιθυλένιο], σε αβιοτικούς-συνθετικές χημικές ουσίες (2,2 δίχλωρο-3,3-διμεθυλ-κυκλοπροπαν-καρβοξυλικό οξύ, 2,6 δίχλωρο-ισοτονικό οξύ και το εστερικό παράγωγό του, N-φενυλσουλφορονυλ-2-χλώρο-ισονικοτιναμίδη, probenazole, τα διαλύματα K_3PO_4 , K_2PO_4 , Na_3PO_4 , Na_2HPO_4 , EDTA) και ημισυνθετικούς (χημικά τροποποιημένες βιοτικές ενώσεις). Οι διεγέρτες μπορεί να μην έχουν αντιμικροβιακή δράση ή αντιθέτως να έχουν διπλή δράση αναστέλλοντας και την ανάπτυξη του παθογόνου και να επάγουν αμυντικούς μηχανισμούς στο φυτό (Lyon *et al.*, 1995; Ebel & Mithofer, 1998). Προφανώς, γνωρίζοντας τη φύση του διεγέρτη θα υπάρχει και η δυνατότητα της επαγωγής του αμυντικού μηχανισμού των φυτών με σκοπό την αυξημένη προστασία τους από διάφορους παθογόνους μικροοργανισμούς (Baker *et al.*, 2003).

Οι ουσίες που έχουν αναφερθεί ως τα σημαντικότερα σήματα είναι το σαλικυλικό οξύ (van Loon, 1983; Raskin, 1992), το γιασμονικό οξύ (Penninckx *et al.*, 1996; Creelman & Mullet, 1997; Thomma *et al.*, 1998), το αιθυλένιο (Lyon *et al.*, 1995; Sticher *et al.*, 1997), το υπεροξειδίο του υδρογόνου (Chen *et al.*, 1995b; Lee *et al.*, 1995) και η συστεμίνη (Creelman & Mullet, 1997).

ε.1) Επίκτητη διασυστηματική ανοχή, SAR

Η ενεργοποίηση της SAR πραγματοποιείται στις νεκρωτικές κηλίδες σε αλληλεπιδράσεις ξενιστού-παθογόνου συμβατές (ασθένεια) και μη συμβατές (HR) με τη σύνθεση και ακολούθως μεταφορά του σήματος. Με τη δημιουργία νεκρωτικής κηλίδας λόγω προσβολής από παθογόνο έχουμε αύξηση της συγκέντρωσης του σαλικυλικού οξέος (Salicylic Acid, SA), έκφρασης των SAR-γόνων και την εμφάνιση των πρωτεϊνών παθογένεσης (Pathogenesis-Related proteins, PR-proteins) (Delaney, 1995; Sticher *et al.*, 1997; Smith-Becker *et al.*, 1998). Η χρονική διάρκεια που απαιτείται για την ενεργοποίηση και εγκατάσταση της SAR στο φυτό εξαρτάται και από το είδος του φυτού (έχει διαπιστωθεί σε μονοκότυλα και δικότυλα φυτά) και από τον τύπο του επαγωγέα μικροοργανισμού. Το επίπεδο

προστασίας εξαρτάται από το είδος του μικροοργανισμού που χρησιμοποιήθηκε για την αρχική μόλυνση και από την έκταση της νέκρωσης που προκάλεσε (Sequeira, 1983; Sticher *et al.*, 1997).

ε.2) Επαγόμενη διασυστηματική αντοχή, ISR

Ορισμένα στελέχη μη παθογόνων ριζοβακτηρίων έχουν την ικανότητα να προστατεύσουν τα φυτά από τα παθογόνα επάγοντας τους μηχανισμούς αντοχής των φυτών, γνωστοί ως ISR. Η ISR αποτελεί βιοχημικό φαινόμενο φαινοτυπικώς παρόμοιο με τη SAR που επάγεται από τα παθογόνα και σχετίζεται με την ενεργοποίηση του μεταβολικού μονοπατιού των γιασμονικού οξέος (Jasmonic Acid, JA) και αιθυλενίου (van Loon *et al.*, 1998). Αν και η ενεργοποίηση της SAR δεν εξαρτάται πάντα από την έκφραση HR, φθάνει στο μέγιστο επίπεδο της όταν το παθογόνο προκαλεί νέκρωση στο φυτικό ιστό. Αντιθέτως, τα ριζοβακτήρια δεν προκαλούν ορατό σύμπτωμα στον ξενιστή και συνήθως αυξάνουν το ρυθμό ανάπτυξης του φυτού (Liu *et al.*, 1995b; van Loon *et al.*, 1998). Τα ριζοβακτήρια που επάγουν την ISR μέσω της ενεργοποίησης του σήματος παρουσιάζουν την εξειδικευμένη σχέση μεταξύ βακτηρίου και ξενιστού (Pieterse *et al.*, 1996).

Όπως προαναφέρθηκε, τα ριζοβακτήρια (PGPR, σημαντικότερα που ενεργοποιούν την ISR είναι τα *Pseudomonas* και *Bacillus*) ως βιολογικοί παράγοντες είτε επιδρούν στην ενεργοποίηση της ISR και/ή της SAR (Persello-Cartieux *et al.*, 2003; Bloemberg & Lugtenberg, 2001; Walling, 2001) ή εκκρίνουν αντιμικητιακούς μεταβολίτες, όπως πυολουτερίνη (pyoluterin), φεναζίνες (phenazines) και φερογλουσινόλες (phoroglucinols) (Bloemberg & Lugtenberg, 2001) ή εκκρίνουν τα επιφανειοδραστικά κυκλικά πεπτίδια, τα οποία συνεισφέρουν στην αντιμετώπιση των φυτοπαθογόνων (Bloemberg & Lugtenberg, 2001; Walling, 2001). Μάλιστα, πολλά από τα ριζοβακτήρια που επάγουν την ISR έχουν επίσης και την ικανότητα να περιορίσουν άμεσα την ανάπτυξη του παθογόνου (π. χ. παράγοντας αντιβιοτικά), οπότε θα πρέπει κατά τη μελέτη ενεργοποίησης της ISR τα ριζοβακτήρια να απουσιάζουν από το χώρο μόλυνσης του φυτού από το παθογόνο και να παραμένουν σε απόσταση καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος (van Loon *et al.*, 1998).

Τα ριζοβακτήρια που παράγουν σαλικυλικό οξύ και επάγουν την παραγωγή των πρωτεϊνών παθογένεσης θεωρείται ότι επάγουν τη SAR και ISR. Η ISR συνήθως προσδίδει λιγότερη προστασία στα φυτά σε σχέση με την SAR, ωστόσο η ISR μπορεί να ενισχυθεί με την εφαρμογή σαλικυλικού οξέος (συνδυασμός SAR και ISR) (van Loon *et al.*, 1998). Επιπλέον, οι van Wees *et al.* (2000) αναφέρουν, ότι υπάρχει συμβατότητα μεταξύ του SAR και ISR μονοπατιού και ότι οι φαινοτυπικά παρόμοιες ISR και η SAR συγκλίνουν στο τελικό άκρο του μεταβολικού μονοπατιού τους με την αμυντική ικανότητα του φυτού να αυξάνεται ενάντια μεγάλου αριθμού διαφορετικής φύσεως παθογόνων.

Φυτικοί παρεμποδιστές και μηχανισμοί άμυνας του φυτού

α) Φυτοαλεξίνες

Ανάμεσα στους φυσικοχημικούς μηχανισμούς άμυνας του φυτού που ενεργοποιούνται κατά την είσοδο του παθογόνου είναι η τοπική συσσώρευση των φυτοαλεξινών στη θέση προσβολής (Ebel, 1986). Οι φυτοαλεξίνες είναι λιποφυλικής φύσεως αντιμικροβιακές ενώσεις μικρού μοριακού βάρους, οι οποίες συντίθενται και συσσωρεύονται στα φυτά ως το αποτέλεσμα μόλυνσης ή καταπόνησης (Ebel, 1986; Κιός, 1995). Οι φυτοαλεξίνες παρουσιάζουν πολυπλοκότητα στη δομή τους ως τυπικά φυτικά προϊόντα και αποτελούν παράγωγα φαινυλπροπανών, ισοπρενών και ακετυλινών και κατατάσσονται από χημικής απόψεως στα ισοφλαβονοειδή, σεσκουιτερπένια, πολυακετιλένια, διτερπένια, διυθροφενανθέρους και σπιλβένια (Ebel, 1986). Στις ασύμβατες σχέσεις ξενιστού-παθογόνου, οι φυτοαλεξίνες καθώς συσσωρεύονται παρεμποδίζουν την ανάπτυξη του παθογόνου συνεισφέροντας

στην άμυνα του φυτού, ενώ στις περιπτώσεις που έχουμε ασθένεια το παθογόνο είναι ανθεκτικό απέναντι στη συσσώρευση των φυτοαλεξινών καθώς τις αποτοξικοποιεί, καταστέλλει τη συσσώρευσή τους και / ή «αποφεύγει» τη διέγερση της παραγωγής τους (Vance *et al.*, 1980). Ανάμεσα από τους διάφορους τρόπους συνθέσεως των φυτοαλεξινών το μεγαλύτερο ενδιαφέρον έχει το μεταβολικό μονοπάτι της συνθέσεως των αρωματικών ενώσεων. Το ένζυμο-κλειδί σε αυτό το μεταβολικό μονοπάτι είναι η φαινυλαλανίνη αμμώνια λυάση (Phenylalanine ammonia lyase, PAL) (Sequeira, 1983).

β) Λιγνιτοποίηση και άλλοι δομικοί φραγμοί

Η λιγνιτοποίηση αποτελεί ένα σημαντικότατο μηχανισμό για την παρεμπόδιση της αναπτύξεως του παθογόνου μέσα στο φυτικό ιστό, επειδή, μεταξύ άλλων, η λιγνίνη προσδίδει στα κυτταρικά τοιχώματα μεγαλύτερη αντίσταση στη μηχανική διείσδυση από τα παθογόνα και τα καθιστά πιο ανθεκτικά στη διάσπασή τους από τα ένζυμα ή τις τοξίνες που παράγει ο μικροοργανισμός (Vance *et al.* 1980; Sticher *et al.*, 1997). Η λιγνίνη είναι μία πολυμερισμένη αρωματική ένωση, παράγεται κατά τη στιγμή εισβολής κάποιου παθογόνου στο φυτό βάσει του μεταβολικού μονοπατιού των φαινυλπροπανοειδών, είναι μικρού μοριακού βάρους, αδιάβροχη και ανθεκτική στη χημική αποικοδόμησή της από τους μικροοργανισμούς (Vance *et al.*, 1980; Sticher *et al.*, 1997), αποτίθεται στο κυτταρικό τοίχωμα (προστατευτικός φραγμός) με αποτέλεσμα την απομόνωση του παθογόνου από το ίδιο το φυτό. Δημιουργείται από τη δράση των ειδικών ενζύμων πολυφαινολοξειδασών και στη θέση εναπόθεσης της έχουμε έντονο μεταχρωματισμό (Τζάμος, 2004). Κατά το μεταβολικό μονοπάτι βιοσύνθεσης της λιγνίνης κυρίαρχο ρόλο παίζει το ένζυμο PAL (Vance *et al.*, 1980).

γ) Αντίδραση υπερευαισθησίας (Hypersensitive Response, HR)

Η HR αποτελεί έκφραση της αντοχής του ξενιστή σε προσβολές, κατά τις οποίες θανατώνεται ένα κύτταρο ή ένας μικρός αριθμός κυττάρων (η ζημιά δεν είναι ορατή μακροσκοπικά), μόλις το πρωτόπλασμα έρθει σε επαφή με το μικροοργανισμό. Κατά τη διαδικασία αναγνώρισεως του παθογόνου από το φυτό λαμβάνει χώρα σειρά κυτταρολογικών, ιστολογικών και βιοχημικών αλλοιώσεων, οι οποίες τελικά συντελούν στην ταχύτατη νέκρωση των ιστών του ξενιστή. Αυτή η δυνατότητα πρόκλησης νέκρωσης ιστών υφίσταται και στους ευαίσθητους ξενιστές, αλλά σε μικρότερη ένταση σε σχέση με τους ανθεκτικούς (Τζάμος, 2004). Γενικά, υπάρχουν εξειδικευμένοι γόννοι στα κύτταρα των παθογόνων, που είναι υπεύθυνοι για την παραγωγή των εξειδικευμένων διεγερτών του φαινομένου της HR. Για τους μύκητες θεωρείται ότι διεγέρτης της HR είναι οι αυτοί των φυτοαλεξινών, οι οποίες συσσωρεύονται μόνο στην περιοχή που είναι άμεσης επαφής με το παθογόνο. Στα βακτήρια ως διεγέρτες θεωρούνται αντίστοιχα οι χαρπίνες και τα προϊόντα τους (Τζάμος, 2004).

δ) Θύλακες λιγνίνης (lignintubers) ή καλλόζης

Πρόκειται για μηχανισμούς που δρουν κυρίως στις αδρομυκώσεις και παρεμποδίζουν την αγγειακή διείσδυση-εξάπλωση του παθογόνου. Σχηματίζονται στα αγγεία του ξύλου, όπου έχουμε την πλήρωσή τους με θύλακες και έτσι παρεμποδίζεται η προέλαση και ο διασκορπισμός του παθογόνου στα αγγεία. Η διέγερση είναι ορμονικής αιτιολογίας, κυρίως το ινδολοξικό οξύ (Τζάμος, 2004).

ε) Χημικές μορφές ενεργού οξυγόνου (Active Oxygen Species, AOS)

Κατά τη διάρκεια έκφρασης της HR λαμβάνει χώρα και η απελευθέρωση των χημικών μορφών ενεργού οξυγόνου, που δρουν ως τοξικά παράγωγα και άμεσα μειώνουν τη ζωτικότητα του παθογόνου. Μόρια που δρουν στην έκφραση των γόννων άμυνας, των οποίων η έκφραση επηρεάζεται από τα αυξημένα επίπεδα AOS, είναι τα GHS και GSSG και τα παράγωγά τους, καθώς και ο λόγος GHS

/ GSSG. Τα μόρια GHS και GSSG διεγείρουν τη δράση της PAL και τη συσσώρευση των φυτοαλεξινών. Πιθανότατα οι AOS να αποτελούν σήμα επαγωγής της βιοσύνθεσης φυτοαλεξινών, αφού εξωγενής εφαρμογή H₂O₂ ενεργοποιεί το μηχανισμό συσσώρευσης φυτοαλεξινών απουσίας διεγέρτη (Mehdy, 1994).

στ) Πρωτεΐνες παθογένεσης (Pathogenesis-Related Proteins, PR-proteins)

Οι πρωτεΐνες παθογένεσης κωδικοποιούνται από το φυτό-ξενιστή, η σύνθεσή τους ενεργοποιείται σε παρασιτικές ασθένειες ή παρόμοιες καταστάσεις και αποτελεί φαινόμενο μη εξειδικευμένο, μιας και έχουν ανιχνευθεί σε πολλά είδη φυτών διαφόρων οικογενειών. Δεν συσσωρεύονται μόνο τοπικά (γύρω από τη νεκρωτική κηλίδα) στο φύλλο, αλλά και διασυστηματικά κατά τη διέγερση της SAR. Οι πρωτεΐνες παθογένεσης έχουν μικρό μοριακό βάρος, είναι διαλυτές στα οξέα, έχουν μικρό ισοηλεκτρικό σημείο, δεν διασπώνται πρωτεολυτικά, παράγονται και συσσωρεύονται μέσα στο μεσοκυττάριο χυμό ή χυμοτόπιο, δεν έχουν εμφανή ενζυματική δραστηριότητα και έτσι επιβιώνουν σε δυσμενές περιβάλλον (Christ & Mosinger, 1989). Παράγονται τόσο σε ασύμβατες, όσο και σε συμβατές αλληλεπιδράσεις ξενιστού-παθογόνου και συχνά επάγονται ως αντίδραση στη μόλυνση. Συσσώρευση της PR-1a έχει αναφερθεί κατά την έκφραση της ISR με τη χρήση PGRP στελεχών σε διαγονιδιακά φυτά καπνού (Chen *et al.*, 2000a). Αυτές που συσσωρεύονται στο χυμοτόπιο συμβάλλουν στην αμυντική ικανότητα του φυτού μετά από τον αποχωρισμό τους από το κύτταρο, ενώ αυτές των μεσοκυττάρων χώρων είναι σε άμεση επαφή με το παθογόνο διαπερνώντας τον ιστό (Sticher *et al.*, 1997). Οι ομόλογες πρωτεΐνες που απαντώνται σε υγιείς ιστούς, αλλά δεν συντίθενται κατά την προσβολή του φυτικού ιστού από το παθογόνο ονομάζονται «πρωτεΐνες παρόμοιες με τις πρωτεΐνες παθογένεσης» (PR-Like proteins, PRLs) (van Loon & van Strien, 1999). Στον Πίνακα 1 αναφέρονται οι ομάδες ταξινόμησης των πρωτεϊνών παθογένεσης βάσει του βαθμού ομολογίας στην αλληλουχία των αμινοξέων, την ορρολογική συγγένεια και / ή την ενζυματική ή βιολογική δράση, καθώς και ο τρόπος δράσης.

Πίνακας 1. Ομάδες και ιδιότητες των πρωτεϊνών παθογένεσης (van Loon & van Strien, 1999)

ΟΜΑΔΕΣ	ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ	ΟΜΑΔΕΣ	ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ
PR - 1	Άγνωστες	PR - 8	Χιτινάση τύπου III
PR - 2	1,3-β-γλουκανάσες	PR - 9	Περοξειδάση
PR - 3	Χιτινάση τύπου I, II, IV, V, VI, VII	PR - 10	Ριβονουκλεάση*
PR - 4	Χιτινάση τύπου I, II	PR - 11	Χιτινάση τύπου I
PR - 5	Thaumatococin-like*	PR - 12	Ντιφενσίνη
PR - 6	Παρεμποδιστές πρωτεϊνών	PR - 13	Θειονίνη
PR - 7	Ενδοπρωτεϊνάση	PR - 14	Πρωτεΐνη μεταφοράς λιπιδίων

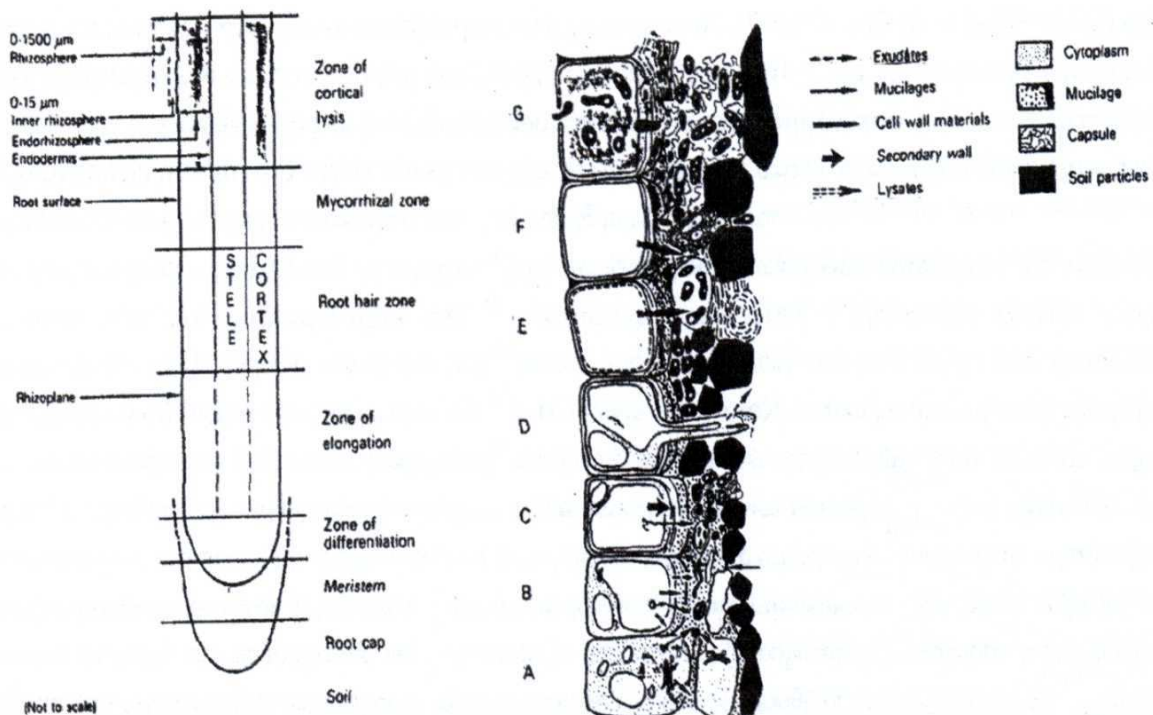
*Δεν έχει πλήρως αποδειχθεί.

Η έννοια και η σημασία της ριζόσφαιρας

Το έδαφος αποτελεί το πιο ετερογενές φυσικό υλικό και περίπλοκο σύστημα, στο οποίο λαμβάνει χώρα μια σειρά συνεχών βιολογικών, βιοχημικών, χημικών και φυσικών μεταβολών. Συνίσταται από ανόργανα τεμαχίδια, προϊόντα αποσάθρωσης πετρωμάτων και ορυκτών, αποσυντιθέμενη οργανική ουσία, νερό, άλατα υπό διάλυση, αέρια, ρίζες φυτών, ζωικούς και φυτικούς οργανισμούς και μικροοργανισμούς (μύκητες, βακτήρια, πρωτόζωα κ.ά.). Μέσα στο έδαφος αναπτύσσεται το ριζικό σύστημα των φυτών και οι ρίζες απορροφούν το νερό και τα ανόργανα θρεπτικά στοιχεία από το εδαφικό υπόστρωμα και μπορεί να χρησιμοποιηθούν και ως όργανα αποθηκεύσεως τροφών. Το ριζικό σύστημα είναι τις περισσότερες φορές πολλαπλάσιο σε όγκο από τον όγκο που καταλαμβάνει το

υπέργειο μέρος των φυτών και είναι λογικό να κατέχει σπουδαίο ρόλο στις μεταβολές που υφίσταται διαρκώς το έδαφος.

Οι ρίζες των φυτών αυξάνονται καθ' όλη τη διάρκεια του βιολογικού κύκλου τους και εμπλουτίζουν ποικιλοτρόπως το έδαφος με θρεπτικά στοιχεία. Κάθε ακρορριζίο μπορεί να παράγει 18.000 νέα κύτταρα σε μια ημέρα και να επιμηκυνθεί μέχρι 5 cm. Η συνεχής δραστηριότητα των ριζών, ειδικότερα στη ριζόσφαιρα (η ζώνη του εδάφους που εκτείνεται 2 mm γύρω από τη ρίζα), παίζει σπουδαίο ρόλο στις μεταβολές που υφίσταται διαρκώς το έδαφος. Τα όρια μεταξύ της ρίζας και του εδάφους αλλάζουν συνεχώς και διαρκώς τροποποιούν τη γειτονική δομή του εδάφους με μηχανικές και μεταβολικές δραστηριότητες (Foster *et al.*, 1983). Το πρώτο βήμα στην επιστήμη που ασχολείται με τη ριζόσφαιρα επιτεύχθηκε από τον Hiltner (1904), ο οποίος παρατήρησε ότι η μικροβιακή δράση στο έδαφος που περιβάλλει τη ρίζα ήταν μεγαλύτερη σε σχέση με αυτήν στο υπόλοιπο έδαφος. Ο Hiltner με τον όρο «ριζόσφαιρα» αρχικά αναφερόταν στη ζώνη του εδάφους με τα συμβιωτικά βακτήρια που περιέβαλλε ρίζες ψυχανθών, σήμερα ο όρος αυτός έχει διευρυνθεί και διαχωρίζεται σε (Lynch, 1990): α) ενδοριζική περιοχή (ενδορριζόσφαιρα), περιοχή δηλαδή που συνίσταται από διαφορετικά επίπεδα κυττάρων της καθ' εαυτού ρίζας, τα οποία επίσης αποικίζονται από μικροοργανισμούς, β) περιοχή που περιβάλλει την ενδορριζόσφαιρα, δηλαδή την εκτορριζόσφαιρα, και γ) ριζοπλάνο, την επιφάνεια δηλαδή των ριζών (Εικόνα 6).



Εικόνα 6. Στάδια του κύκλου ζωής επιφανειακών ριζικών κυττάρων και της γειτονικής ριζόσφαιρας, καθώς και οι μείζονες περιοχές διαφοροποίησης της ρίζας και της ριζόσφαιρας (Foster *et al.*, 1983).

A) Ζώνη της καλύπτρας, όπου υπάρχει σημαντική έκκριση κόμμεος προς τη ριζόσφαιρα. B) Τα επιδερμικά κύτταρα προεκβάλλουν κάτω από την καλύπτρα και αρχίζουν να εκτείνονται. Σε αυτό το στάδιο το κύτταρο περικλείεται από ένα μόνο αρχικό τοίχωμα. Με την παύση της επιμήκυνσης, το κύτταρο σχηματίζει ένα δευτερεύον τοίχωμα, C) το οποίο πρέπει να διαπεράσει το σχηματιζόμενο ριζικό τριχίδιο. D) Η λειτουργία των ριζικών τριχιδίων διαρκεί για ένα περιορισμένο χρονικό διάστημα, μέχρις ότου αυτά και τα υπόλοιπα επιδερμικά κύτταρα αυτολυθούν. Με μηχανική και μικροβιακή λύση αυξάνονται τα ποσά των βλενωδών ουσιών στο έδαφος. Το οργανικό υλικό με τα προϊόντα της κυτταρολύσεως εξασφαλίζουν ένα κατάλληλο υπόστρωμα, για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών στη ριζόσφαιρα. Αυτοί οι μικροοργανισμοί διαπερνούν το αρχικό κυτταρικό τοίχωμα και εισχωρούν στη ριζοδερμίδα. G) Στο στάδιο αυτό ο εξωτερικός φλοιός παύει να λειτουργεί φυσιολογικά, μολονότι διατηρείται για εβδομάδες ή ακόμα και μήνες. Με τη νέκρωση του ριζικού συστήματος, οι ιστοί των ριζών γίνονται μέρος της οργανικής ύλης του εδάφους.

Οι δραστηριότητες των ριζών επιφέρουν πολλές φυσικοχημικές μεταβολές στο έδαφος που γειτνιάζει με αυτές (συμπύεση, εξάτμιση ύδατος, μεταφορά αλάτων, μεταβολή συγκέντρωσης O_2 - CO_2 στον εδαφικό αέρα, ακραίες τιμές pH), αλλά και στην οργανική ουσία της ριζόσφαιρας (Foster *et al.*, 1983; Foster, 1986). Οι ρίζες εκκρίνουν ενεργητικά ή παθητικά πλήθος ενώσεων (υδρογονάνθρακες, σάκχαρα, αμινοξέα, οργανικά οξέα, βιταμίνες, ορμόνες ένζυμα, αυξίνες, HCN), καθώς και τα προϊόντα αυτολύσεως των εφήμερων ριζικών κυττάρων (ριζικά τριχίδια ή επιδερμικά κύτταρα) (Neumann & Römheld, 2001). Ειδικά οι εκκρινόμενοι πολυσακχαρίτες που διαφέρουν κατά μήκος της ρίζας και είναι ανομοιογενείς στο χώρο και στο χρόνο σχηματίζουν τη βλέννα-πήγμα (mucigel), η οποία λιπαίνει τη ρίζα και διευκολύνει τη διέλευσή της εντός του εδάφους (Gilroy & Jones, 2000; Neumann & Römheld, 2001; Welbaum *et al.*, 2004). Οι αποστάσεις που μπορεί να διανύσει στο έδαφος μια ουσία των ριζικών εκκρίσεων επηρεάζεται σαφώς από τις εδαφικές συνθήκες (πορώδες, υγρασία), καθώς και από την προσρόφησή της στα εδαφοτεμαχίδια και το μεταβολισμό της από τους μικροοργανισμούς (Bowen & Rovira, 1976). Βακτήρια και μύκητες του εδάφους διαβαίνουν εντός των κυττάρων του φλοιού υγιών ριζών, δηλαδή στην ενδορριζόσφαιρα (Foster, 1986), ενώ το νερό διήθησης αυξάνει την προς τα κάτω κίνηση και των μυκήτων και των βακτηρίων (Chao *et al.*, 1986).

Στην πλούσια ενεργειακά ριζόσφαιρα παρατηρείται έντονη μικροβιακή δραστηριότητα, ώστε οι ρίζες των φυτών δεν έρχονται σε άμεση επαφή μόνο με τα νεκρά κλάσματα του εδάφους, αλλά και με μεγάλο μικροβιακό πληθυσμό που βρίσκεται σε κατάσταση έντονης μεταβολικής δραστηριότητας. Οι μικροβιακοί πληθυσμοί στη ριζόσφαιρα αγγίζουν τα επίπεδα του 10^9 κύτταρα/g εδάφους, πληθυσμούς δηλαδή 10-100 φορές μεγαλύτερους σε σχέση με την υπόλοιπη εδαφική μάζα. Παρά τους μεγάλους αριθμούς βακτηρίων στη ριζόσφαιρα, μόνο στο 7-19% από την πραγματική επιφάνεια των ριζών ανιχνεύονται βακτηριακά κύτταρα, με την πλειοψηφία να συγκεντρώνεται στο κολλοειδές πήγμα που περιέχεται στα κενά διαστήματα μεταξύ των ριζικών επιδερμικών κυττάρων (Foster, 1986). Επιπλέον, οι μικροοργανισμοί που βρίσκονται στο ριζοπλάνο διαφέρουν από αυτούς της υπόλοιπης ριζόσφαιρας, ενώ η επιφάνεια της καλύπτρας φαίνεται να στερείται μικροβιακών πληθυσμών ίσως επειδή της συνεχούς ανάπτυξης και ανανέωσης των κυττάρων της (Loper *et al.*, 1984). Αύξηση στο βακτηριακό πληθυσμό παρατηρείται και στο 1 mm από την επιφάνεια της ρίζας, λόγω της διάχυσης των υδατοδιαλυτών ενώσεων των ριζικών εκκρίσεων (Foster, 1986). Ο ρόλος αυτός μπορεί να έχει σχέση με τη θρέψη των φυτών και ιδιαίτερα με την παροχή των θρεπτικών στοιχείων άζωτο, ασβέστιο και φωσφόρο (Foster *et al.*, 1983; Rovira, 1991). Η σύνθεση της μικροβιακής χλωρίδας στη ριζόσφαιρα εξαρτάται από το είδος του φυτού και από την ποικιλία του ίδιου είδους του φυτού, λόγω του ότι παρατηρούνται διαφορές στις εκκρινόμενες ουσίες, την εδαφική υγρασία, τη φύση του μικροοργανισμού και τον τύπο του εδάφους (Bowen & Rovira, 1976; Rovira, 1991). Στο έδαφος, τα Gram⁻ βακτήρια είναι μη σποριογόνα με απλές διατροφικές συνήθειες, αντιδρούν στα αμινοξέα και απορροφώνται περισσότερο από τις ρίζες σε σχέση με τα Gram⁺.

Φυσικά σε αυτό το ιδιαίτερο και σύνθετο οικοσύστημα περιλαμβάνονται και οι εδαφογενείς φυτοπαθογόνοι μικροοργανισμοί, αλλά και αυτοί που τούς ανταγωνίζονται ή παρασιτούν. Το φαινόμενο της μυκόστασης παρατηρείται πιο έντονο σε εδάφη με υψηλή μικροβιακή δραστηριότητα, όπου τα μολύσματα διαφόρων παθογόνων (π.χ. σπόρια μυκήτων) βλαστάνουν μόνο όταν βρεθούν κοντά σε ρίζες ή σε βλαστάνοντες σπόρους (Foster *et al.*, 1983, Rovira, 1991). Ειδικότερα, τα εδαφογενή βακτήρια και μύκητες προκειμένου να μολύνουν τα φυτά μέσω του ριζικού τους συστήματος πρέπει να διαπεράσουν τη ζώνη της ριζόσφαιρας, η οποία αποτελεί την πρώτη γραμμή άμυνας των ριζών εναντίον της επίθεσης των παθογόνων (Weller, 1988). Η επαφή του παθογόνου με τη ρίζα και ο αριθμός των πολλαπλασιαστικών του μονάδων ανά g εδάφους σχετίζονται με το μέγεθός τους και τη θρεπτική τους κατάσταση (Bowen & Rovira, 1976; Hawke & Lazarovits, 1994).

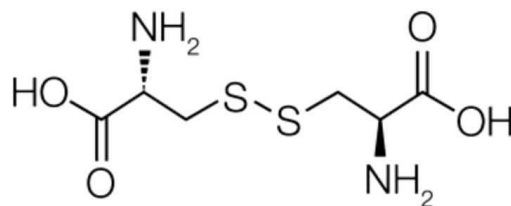
Στόχος πτυχιακής μελέτης

Η αντιμετώπιση του μύκητα *Verticillium dahliae* είναι δυσχερής λόγω έλλειψης αποτελεσματικών μέσων. Παράλληλα, ο μύκητας μπορεί να επιβιώσει για πολλά χρόνια στο έδαφος λόγω των μικροσκληρωτίων και να εκδηλώσει πολύπλευρη αλληλεπίδραση τόσο με το φυτό-ξενιστή, όσο και με τη μικροβιακή χλωρίδα.

Στόχος της παρούσας πτυχιακής μελέτης ήταν μελέτη της επίδρασης ανοσοποιημένων φυτών μελιτζάνας, ποικιλίας Black Beauty που χαρακτηρίζεται ως ευαίσθητη ενάντια στη βερτισιλλίωση, ενάντια στη βλαστικότητα των μικροσκληρωτίων του εδαφογενούς μύκητα *Verticillium dahliae*. Η ανοσοποίηση των φυτών (διέγερση λανθανόντων μηχανισμών άμυνας του φυτού ενάντια στα παθογόνα) επιχειρήθηκε να επιτευχθεί με τον ψεκασμό τους με δεδομένη συγκέντρωση του αμινοξέος L-cystine (Εικόνα 7), ενώ η βλαστικότητα των μικροσκληρωτίων (βλάστηση ή όχι, καθώς επίσης μετρήθηκε ο αριθμός των βλαστανόντων υφών σε κάθε βλαστημένο μικροσκληρώτιο και το μήκος (mm) της κάθε υφής σε κάθε βλαστημένο μικροσκληρώτιο) έλαβε χώρα στο ακρορρίζιο και στη ζώνη επιμήκυνσης της ρίζας, φυτικοί ιστοί που αποτελούν στρατηγικής σημασίας πύλης εισόδου και μόλυνσης των φυτών από το μύκητα *V. dahliae*.

Η επιβεβαίωση της διέγερσης των όποιων λανθανόντων μηχανισμών άμυνας των φυτών μελιτζάνας κατά τον ψεκασμό τους με το αμινοξύ L-cystine ενάντια στο μύκητα *V. dahliae* πραγματοποιήθηκε με τη μόλυνση των εν λόγω φυτών σε φυτοδοχεία με μικροσκληρώτια του παθογόνου και καταγραφή των συμπτωμάτων της βερτισιλλίωσης σε σχέση με το μάρτυρα (αφέκαστα φυτά μελιτζάνας).

Τέλος, ελέγχθηκε *in vitro* και η ενδεχόμενη μη αντιμικροβιακή δράση του αμινοξέος L-cystine ενάντια στο παθογόνο *V. dahliae*, ώστε η όποια επίδραση της L-cystine επί της βλαστικότητας των μικροσκληρωτίων να αποδοθεί όντως σε μηχανισμούς ανοσοποίησης των φυτών και όχι στην αντιμυκητιακή δράση της εν λόγω χημικής ουσίας.



Εικόνα 7. Ο συντακτικός τύπος του αμινοξέος L-cystine (C₆H₁₂N₂O₄S).

ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

Φυτικό υλικό

Οι σπόροι μελιτζάνας (*Solanum melongena* L. Solanaceae), που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία, ήταν της ποικιλίας Black Beauty, η οποία είναι ευπαθής στη βερτισιλλίωση (Pegg, 1974).

Τα φυτά μελιτζάνας είχαν προβλαστήσει στο εργαστήριο υπό ασηπτικές συνθήκες σύμφωνα με τους Stephens & Elmer (1988):

- Επιφανειακή απολύμανση των σπόρων με την εμβάπτισή τους για 2 λεπτά σε διάλυμα 10% χλωρίνης-NaOCl και ακολούθως για 30 δευτερόλεπτα σε αιθανόλη,
- Ξέπλυμα σπόρων με την εμβάπτισή τους 3 φορές σε απιονισμένο-αποστειρωμένο ύδωρ,
- Βλάστηση σπόρων επί ενυδατωμένου και αποστειρωμένου διηθητικού χαρτιού Whatman εντός τρυβλίου Petri στους 26°C και σκότος.

Η μεταφύτευση των σποροφύτων μελιτζάνας ηλικίας 5 ημερών έλαβε χώρα σε (9×9×10) cm πλαστικά φυτοδοχεία με φυτόχωμα Klasmann Potground P (Klasmann-Deilmann GmbH, Geeste, Germany), ως το εδαφικό υπόστρωμα, κατάλληλο για κηπευτικές καλλιέργειες.

Τα φυτά όλων των πειραμάτων τοποθετούνταν στο θερμοκήπιο σε θερμοκρασία 23±3°C και φωτοπεριόδου 14 ωρών.

Λίπανση σποροφυτών

Τα φυτά μελιτζάνας που χρησιμοποιήθηκαν σε όλα τα πειράματα της παρούσας μελέτης λιπάνθηκαν με το σκεύασμα Complezal® 12+4+6. Η σύνθεσή του είναι: 12% Άζωτο (N), 4% Φωσφόρος (P), 6% Κάλιο (K), 0.2% Μαγνήσιο (Mg), 0.16% Θείο (S), 0.02% Βόριο (B), 0.02% Σίδηρος (Fe), 0.05% Μολυβδαίνιο (Mo), 0,005% Ψευδάργυρος (Zn). Η παροχή των απαραίτητων θρεπτικών στοιχείων στα φυτά λάμβανε χώρα με τη λίπανσή τους ανά τακτά χρονικά διαστήματα.

Απομόνωση του μύκητα *Verticillium dahliae*

Η καλλιέργεια του μύκητα *Verticillium dahliae*, που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη, είχε απομονωθεί από στέλεχος μελιτζάνας υπαίθριας καλλιέργειας. Τα φυτά είχαν εκδηλώσει τα τυπικά συμπτώματα της βερτισιλλίωσης και μετά από τις κατάλληλες τομές στο στέλεχος των φυτών, παρατηρήθηκε ο χαρακτηριστικός μεταχρωματισμός. Η καλλιέργεια του μύκητα στο εργαστήριο διατηρήθηκε στο πλούσιο θρεπτικό υλικό PDA σε θερμοκρασία 4°C, μέχρις ότου χρησιμοποιηθεί.

Πίνακας 2. Θρεπτικό υλικό εκχυλίσματος πατάτας με δεξτρόζη και άγαρ (Potato Dextrose Agar, PDA)

Εκχύλισμα πατάτας.....	200 g
Δεξτρόζη (ή γλυκόζη).....	20 g
Άγαρ.....	20 g
Απιονισμένο H ₂ O.....	1 L

Αποστείρωση σε αυτόκαυστο κλίβανο στους 121°C, 1 atm, για 20 λεπτά.

Διαδικασία: Μικροί κύβοι πατάτας διαμέτρου 0.5 cm τοποθετούνται σε υδατόλουτρο επί 45 min και στη συνέχεια συλλέγεται το εκχύλισμά τους σε δεδομένο όγκο απιονισμένου νερού. Ακολουθεί η μείξη του ζωμού με τα υπόλοιπα συστατικά.

Δημιουργία μικροσκληρωτίων

Εμβόλιο (τμήμα καλλιέργειας) του μύκητα *V. dahliae* διαμέτρου 0.5 cm στο PDA (Πίνακας 2) και ηλικίας 2 εβδομάδων εμβολιάσθηκε σε 100 mL υγρού θρεπτικού υλικού νιτρικού SSN (Πίνακας 3) σε

κωνική φιάλη Erlenmeyer χωρητικότητας 300 mL. Η επώαση του μύκητα σε περιστρεφόμενο επωαστικό θάλαμο στους 22°C και 140 rpm διήρκησε 7 ημέρες, όπου τα ώριμα (μαύρου χρώματος) μικροσκληρώτια του μύκητα ήταν μακροσκοπικώς ορατά.

Πίνακας 3. Υγρό θρεπτικό υλικό νιτρικού νατρίου και σουκρόζης (Sucrose Sodium Nitrate, SSN) (Sinha & Wood, 1968)

Σακχαρόζη (Serva).....	15.0 g
Δισόξινο Φωσφορικό Κάλιο (KH ₂ PO ₄) (Ferak Berlin).....	0.5 g
Νιτρικό Νάτριο (NaNO ₃) (Merck).....	2.0 g
Χλωριούχο Κάλιο (KCl) (Merck).....	0.5 g
Διάλυμα Ιχνοστοιχείων*.....	1.0 mL
Απιονισμένο-Αποστειρωμένο H ₂ O.....	1 L

* Διάλυμα Ιχνοστοιχείων: Σε 100 mL απιονισμένου/αποστειρωμένου ύδατος (ddH₂O)

Ένυδρος Θειικός Σίδηρος (FeSO ₄ ×7H ₂ O) (Merck).....	15.0 g
Ένυδρος Θειικός Χαλκός (CuSO ₄ ×5 H ₂ O) (Mallinckrodt).....	0.5 g
Ένυδρος Θειικός Ψευδάργυρος (ZnSO ₄ ×7H ₂ O) (British Drug L.T.D.).....	2.0 g
Ένυδρο Θειικό Μαγγάνιο (MnSO ₄ ×4H ₂ O) (Merck).....	0.5 g
Ένυδρο Μολυβδαινικό Νάτριο (NaMoO ₄ ×2H ₂ O) (Merck).....	1.0 mL

Αποστείρωση σε αυτόκαυστο κλίβανο στους 121°C, 1 atm, για 20 λεπτά.

Παραλαβή των μικροσκληρωτίων

Τα μικροσκληρώτια του μύκητα στις κωνικές φιάλες Erlenmeyer αφέθηκαν να καθιζήσουν στο θάλαμο οριζόντιας νηματικής ροής (Laminar flow) για 15 λεπτά. Ακολούθως, αφαιρέθηκε το υπερκείμενο υγρό (SSN, υφές, κονίδια, κ.τ.λ.) και προστέθηκε απιονισμένο-αποστειρωμένο νερό ίσου όγκου με το αρχικό αιώρημα. Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε συνολικά τρεις φορές.

Το αιώρημα των μικροσκληρωτίων ομογενοποιήθηκε (Omni shaker) υπό ασηπτικές συνθήκες για δύο φορές (30 sec την κάθε φορά) στη μέγιστη ταχύτητα των 10.000 rpm. Το ομογενοποιημένο αιώρημα των μικροσκληρωτίων τοποθετήθηκε σε κωνικές φιάλες Erlenmeyer και αφέθηκαν στο θάλαμο οριζόντιας νηματικής ροής για 15 λεπτά, για την καθίζηση των μικροσκληρωτίων. Ακολούθως, το υπερκείμενο υγρό απομακρύνθηκε και τα μικροσκληρώτια μεταφέρθηκαν σε αποστειρωμένα γυάλινα τρυβλία Petri με ελάχιστο όγκο ύδατος. Τα μικροσκληρώτια αποξηράνθηκαν με τη βοήθεια του θαλάμου οριζόντιας νηματικής ροής και τα τρυβλία μεταφέρθηκαν σε επωαστικό θάλαμο στους 27°C για 48 ώρες, για να νεκρωθούν εναπομείναντα κονίδια και υφές.

Έλεγχος βλαστικότητας των μικροσκληρωτίων

Υπό ασηπτικές συνθήκες με τη βοήθεια απολυμασμένης βελόνας και στερεοσκοπίου λήφθηκαν 20 μικροσκληρώτια από τα τρυβλία Petri ανωτέρω και τοποθετήθηκαν σε τρυβλίο, που περιείχε θρεπτικό υπόστρωμα APDA [Οξυνισμένο PDA (AcidPDA): πρόσθεση 30 μL διαλύματος γαλακτικού οξέος 25% στα 10 mL PDA]. Η διαδικασία αυτή επαναλήφθηκε ακόμα μια φορά. Τα δύο τρυβλία μεταφέρθηκαν σε επωαστικό θάλαμο με θερμοκρασία 22°C στο σκότος, για μια εβδομάδα. Η βλαστικότητα των μικροσκληρωτίων κρίθηκε ικανοποιητική.

Η παραπάνω διαδικασία πραγματοποιήθηκε πριν και μετά τη διατήρηση των μικροσκληρωτίων στους 4°C, συνθήκη που βοηθά στη διατήρηση της βλαστικότητας των μικροσκληρωτίων για μεγάλο χρονικό διάστημα (Hawke & Lazarovits, 1994). Πράγματι, η διατήρηση των μικροσκληρωτίων σε αυτό το επίπεδο θερμοκρασίας δεν έδειξε να επηρεάζει τη βλαστικότητά τους.

Επεξεργασία των μικροσκληρωτίων

Τα μικροσκληρώτια αποσπάσθηκαν από τα γυάλινα τρυβλία με τη χρήση απολυμασμένου νυστεριού (αιθανόλη) και συλλέχθηκαν σε κωνική φιάλη Erlenmeyer. Ακολούθησε ομογενοποίησή τους στο Omni shaker στις 10.000 rpm (δύο φορές, 30 sec κάθε φορά).

Το αιώρημα των μικροσκληρωτίων διηθήθηκε υπό πίεση μέσω πλαστικού πλέγματος με οπές διαμέτρου 71 μm, ώστε να συλλεχθούν τα μικροσκληρώτια διαμέτρου >71 μm. Τα μεγάλα σε διάμετρο μικροσκληρώτια (>70 μm) παρουσιάζουν ζωτικότητα και ικανότητα βλάστησης με τη μολυσματική υφή (Hawke & Lazarovits, 1994).

Η τελική συγκέντρωση του αιωρήματος των μικροσκληρωτίων πραγματοποιήθηκε στο στερεοσκόπιο. Με μηχανική πιπέτα λήφθηκαν μικροσκληρώτια και καταμετρήθηκε ο αριθμός τους σε αιώρημα των 5 μL πάνω σε αντικειμενοφόρο πλάκα. Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε 5 φορές συνολικά και εκτιμήθηκε (μέσος όρος) ο αριθμός των μικροσκληρωτίων ανά mL αιωρήματος.

Ψεκασμός φυτών μελιτζάνας με το L-cystine

Φυτά μελιτζάνας ποικιλίας Black Beauty στο στάδιο των δύο πλήρως εκπτυγμένων πραγματικών φύλλων αναπτυσσόμενα στα πλαστικά φυτοδοχεία με φυτόχωμα Klasmann Potground P ως το εδαφικό υπόστρωμα, τα μισά ψεκάσθηκαν με το αμινοξύ L-cystine συγκέντρωσης 3 mM (Osman & Viglierchio, 1981), ενώ τα υπόλοιπα αποτέλεσαν το μάρτυρα (αψέκαστα).

Ο ψεκασμός των φυτών μελιτζάνας με το L-cystine δεδομένης συγκέντρωσης αποσκοπούσε στην ανοσοποίησή τους (διέγερση λανθανόντων μηχανισμών άμυνας του φυτού ενάντια στα παθογόνα).

Μεταφύτευση των φυτών μελιτζάνας σε διαφανή λυόμενα δοχεία

Φυτά μελιτζάνας στο στάδιο των τριών, πλήρως εκπτυγμένων πραγματικών φύλλων [και επτά ημέρες μετά τον ψεκασμό τους με το L-cystine, χρονικό διάστημα ικανοποιητικό για την ανοσοποίησή τους (Κυς, 1995)] μεταφυτεύθηκαν σε λυόμενα δοχεία από διαφανές υλικό (Plexiglas) διαστάσεων 10×07×15 cm σύμφωνα με τη μέθοδο των Mol & van Riessen (1995).

Το εδαφικό υπόστρωμα ήταν α) δύο μέρη φυτόχωμα (Klasmann Potground P) κατάλληλο για κηπευτικές καλλιέργειες, β) ένα μέρος ποταμίσις άμμος, γ) ένα μέρος χώμα αγρού, για τη διατήρηση της μικροβιακής δραστηριότητας, και δ) ένα μέρος τύρφη (Polyhum, Klasmann)³.

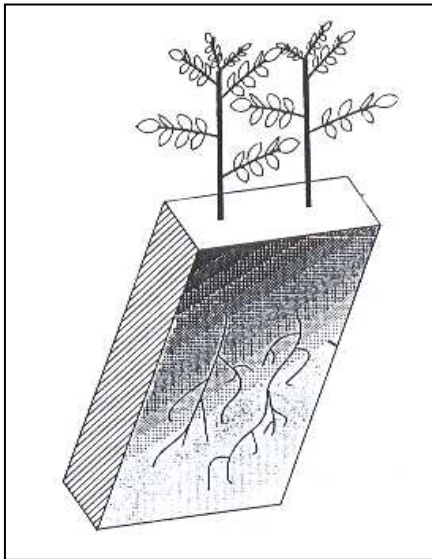
Κατά την τοποθέτηση του εδαφικού υποστρώματος στα λυόμενα δοχεία, προς τη μία πλευρά τους που ήταν εφικτό να αποσπασθεί, προσθέτονταν λεπτό στρώμα τύρφης για τη διατήρηση ικανοποιητικού επιπέδου υγρασίας για μεγάλο χρονικό διάστημα. Ειδικότερα, αυτό το λεπτό στρώμα τύρφης θα ερχόταν σε άμεση επαφή με το μείγμα στηρικτικού υλικού (0,75% άγαρ) και μικροσκληρώτια του *V. dahliae* και με τις αναπτυσσόμενες ρίζες μελιτζάνας, ώστε να καταστεί δυνατή και η μεταγενέστερη συλλογή και καταμέτρηση της βλαστικότητας των μικροσκληρωτίων (βλέπε παρακάτω).

Επίσης, προς αυτή την αποσπώμενη πλευρά των λυόμενων δοχείων τοποθετήθηκε και τμήμα από αδιαφανές πλαστικό (παρεμπόδιση επίδρασης φωτός), για την απόσκοπη ανάπτυξη των ριζών επί αυτής της πλευράς (Εικόνα 8).

Επιπλέον, τα λυόμενα δοχεία τοποθετούνταν και με κλίση 45 μοιρών, ώστε οι ρίζες να αναπτυχθούν προς την αποσπώμενη πλευρά του λυόμενου δοχείου, παράλληλα με την κάλυψή με το αδιαπέραστο υλικό, για να αποφεύγεται η επίδραση του φωτός στην ανάπτυξη των ριζών (Εικόνα 9).

³ Polyhum, Klasmann

Peat type: decomposed frozen-through black sphagnum peat; Structure: medium great; Nutrients: medium level, includes trace element and lime.



Εικόνα 8. Μεταφύτευση του φυτού μελιτζάνας στο λυόμενο δοχείο πλησίον της αποσπόμενης πλευράς του (αριστερά σχηματική απεικόνιση, δεξιά φωτογραφία). Διακρίνεται, επίσης, η κάλυψη της αποσπόμενης πλευράς με αδιαφανές πλαστικό, για την απρόσκοπτη ανάπτυξη των ριζών σε αυτή την πλευρά.



Εικόνα 9. Τοποθέτηση των φυτών μελιτζάνας στα δοχεία με κλίση 45° προς την αποσπώμενη πλευρά.

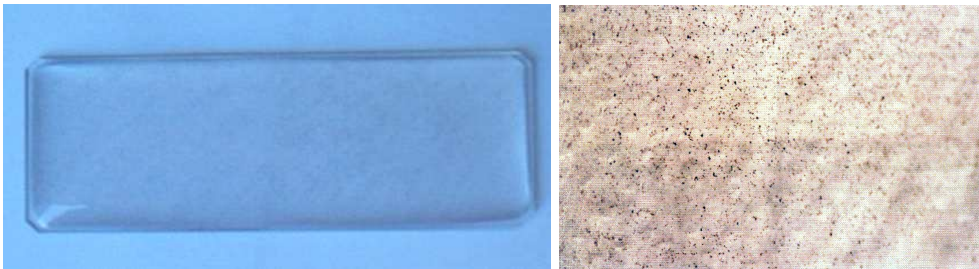
Προσθήκη των μικροσκληρωτίων στα λυόμενα δοχεία

Η προσθήκη των μικροσκληρωτίων πυκνότητας 5 μικροσκληρωτίων / 2 mm³ έγινε τρεις ημέρες μετά τη μεταφύτευσή τους σε όλα τα φυτά (ψεκασμένα με το L-cystine και μάρτυρας, 20 στον αριθμό συνολικά) στην αποσπώμενη πλάκα του λυόμενου διαφανούς δοχείου. Κατά αυτή την προσθήκη των μικροσκληρωτίων στα λυόμενα δοχεία, οι ρίζες των φυτών είχαν αναπτυχθεί στην αποσπώμενη πλευρά του δοχείου (Εικόνα 10).



Εικόνα 10. Ανάπτυξη των ριζών μελιτζάνας προς την αποσπώμενη πλευρά του διαφανούς λυόμενου δοχείου.

Τα μικροσκληρώτια αναμείχθηκαν σε 0.75% άγαρ (στηρικτικό υλικό) και τοποθετήθηκαν πάνω σε αντικειμενοφόρους πλάκες (Εικόνα 110). Η εν λόγω ανάμειξη των μικροσκληρωτίων έλαβε χώρα με το στηρικτικό υλικό τους, όταν αυτό είχε θερμοκρασία 40°C (επίπεδο θερμοκρασίας, που όταν τα μικροσκληρώτια βρεθούν για μερικά δευτερόλεπτα δεν θανατώνονται), η οποία ελεγχόταν με τη χρήση θερμομέτρου (Εικόνα 12). Τρεις αντικειμενοφόροι πλάκες σε κάθε φυτό προσαρτήθηκαν πάνω στην αποσπώμενη πλάκα Plexiglas με τη βοήθεια κολλητικής ταινίας διπλής όψεως (Εικόνα 13).



Εικόνα 11. Μικροσκληρώτια ενσωματωμένα σε 0.75% άγαρ πάνω στην αντικειμενοφόρο πλάκα (αριστερά) και στερεοσκοπική παρατήρηση μικροσκληρωτίων εντός του στηρικτικού υλικού (δεξιά).



Εικόνα 12. Αιώρημα μικροσκληρωτίων του μύκητα *Verticillium dahliae* σε κωνική φιάλη Erlenmeyer (αριστερά) και το στηρικτικό υλικό (0.75% άγαρ), που ελέγχεται η θερμοκρασία του με τη χρήση θερμομέτρου (δεξιά). Όταν η θερμοκρασία του δευτέρου ήταν 40°C, ακολουθούσε η μείξη του με τα μικροσκληρώτια και η τοποθέτησή του σε αντικειμενοφόρους πλάκες.

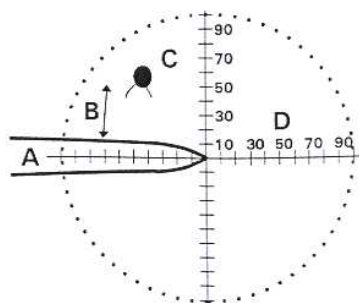


Εικόνα 13. Επαφή των αντικειμενοφόρων πλακών με το μείγμα μικροσκληρωτίων-άγαρ και με τις ρίζες των φυτών στα λυόμενα δοχεία.

Παρατήρηση των μικροσκληρωτίων στο μικροσκόπιο

Πέντε ημέρες μετά την τοποθέτηση των μικροσκληρωτίων ξεκίνησε η καταμέτρηση της βλαστικότητάς τους τόσο στα φυτά μάρτυρες, όσο και στα φυτά που είχαν ψεκαστεί με το L-cystine. Πριν από την προσεκτική απομάκρυνση της αποσπώμενης πλευράς του λυόμενου δοχείου, η οποία έφερε τις αντικειμενοφόρους πλάκες με τα μικροσκληρώτια, είχε σκιαγραφηθεί με ανεξίτηλο μαρκαδόρο στην αποσπώμενη πλάκα η ακριβής θέση των εμφανών ριζών των φυτών.

Από το κάθε φυτό λαμβάνονταν συνολικά 5 ακρορρίζα και από το κάθε ακρορρίζο παρατηρούνταν 10 μικροσκληρώτια στην περιοχή της ριζόσφαιρας, απόσταση έως 2 mm από την επιφάνεια της ρίζας τόσο στην περιοχή του ακρορριζίου, όσο και στη ζώνη επιμήκυνσης της ρίζας (τμήμα 1-2 cm πάνω από την καλύπτρα της ρίζας). Επομένως, σε κάθε φυτό καταμετρούνταν (10×5) 50 μικροσκληρώτια στο ακρορρίζο και άλλα 50 μικροσκληρώτια στη ζώνη επιμήκυνσης της ρίζας (100 συνολικά μικροσκληρώτια από το κάθε φυτό). Σε κάθε επέμβαση χρησιμοποιήθηκαν 10 φυτά και το πείραμα επαναλήφθηκε συνολικά τρεις φορές. Επιπλέον, μικροσκληρώτια που είχαν βλαστήσει καταμετρήθηκαν και ο αριθμός των υφών, καθώς και το μήκος (μm) της κάθε υφής (Εικόνα 14).



Εικόνα 14. Σχηματική απεικόνιση μικροσκοπικής παρατήρησης μικροσκληρωτίου στο ακρορρίζο. Απόσταση (B) του μικροσκληρωτίου του μύκητα *Verticillium dahliae* (C), το οποίο βλάστανε με υφή, υπό την επίδραση των ριζικών εκκρίσεων του ακρορριζίου (A) φυτού μελιτζάνας. Το μήκος κάθε υφής εκφραζόταν σε μm (D).

Η μικροσκοπική παρατήρηση των μικροσκληρωτίων έλαβε χώρα με την τοποθέτηση των αντικειμενοφόρων πλακών που έφεραν τα μικροσκληρώτια, το σθηρικτικό υλικό και τα ακρορρίζα των φυτών στην τράπεζα οπτικού μικροσκοπίου.

Η βερτισιλλίωση σε φυτά μελιτζάνας ψεκασμένα με L-cystine

Η βλάστηση των σπόρων και λίπανση σποροφύτων μελιτζάνας ποικιλίας Black Beauty πραγματοποιήθηκε, όπως ανωτέρω. Τα μικροσκληρώτια του μύκητα *V. dahliae* παρήχθησαν και συλλέχθηκαν από τις καλλιέργειές τους στο εργαστήριο, όπως ανωτέρω. Τα μισά φυτά μελιτζάνας ψεκάστηκαν με 3 mM L-cystine, όπως ανωτέρω με σκοπό την ενδεχόμενη στην ανοσοποίησή τους στο στάδιο των τριών πλήρως εκπτυγμένων πραγματικών φύλλων (ηλικίας τριών περίπου εβδομάδων), ενώ τα άλλα μισά αποτέλεσαν το μάρτυρα (αψέκαστα).

Η μεταφύτευση των εικοσιπτεσσάρων σποροφύτων μελιτζάνας πραγματοποιήθηκε όταν είχαν εκπύξει πλήρως τέσσερα πραγματικά φύλλα σε φυτοδοχεία (20×30 cm) με εδαφικό μείγμα ένα μέρος φυτόχωμα (Klasmann Potground P), ένα μέρος τύρφη (Polyxum Klasmann) και ένα μέρος χώμα αγρού.

Επτά ημέρες μετά τον ψεκασμό τους με το L-cystine (και τρεις μετά τη μεταφύτευσή τους στις γλάστρες) τοποθετήθηκαν σε όλα τα φυτοδοχεία (ψεκασμένα και αψέκαστα φυτά μελιτζάνας) φυτοδοχείο 15 μικροσκληρώτια ανά γραμμάριο εδαφικού μείγματος. Η εν λόγω μόλυνση των φυτών πραγματοποιήθηκε στο θερμοκήπιο σε συνθήκες 20±2°C και φωτοπεριόδου 14 ωρών (Εικόνα 15).

Στη συνέχεια, καταγράφηκε η εξέλιξη της ασθένειας της βερτισιλλίωσης (φύλλα με συμπτώματα της ασθένειας προς το σύνολο των φύλλων του κάθε φυτού μελιτζάνας) ανά δύο ημέρες και μέχρι 50 ημέρες μετά τη μόλυνση.

Η ένταση/δριμύτητα της ασθένειας κάθε δύο ημέρες μετά τη μόλυνση των φυτών εκτιμήθηκε με το ποσοστό των φύλλων με συμπτώματα της ασθένειας προς το σύνολο των φύλλων κάθε φυτού. Η δριμύτητα της ασθένειας εκτιμήθηκε μέχρι και 50 ημέρες μετά τη μόλυνση των φυτών. Ακολουθως, όλες αυτές οι μετρήσεις της ασθένειας αποτυπώθηκαν στο χρόνο, ώστε να παραχθεί η καμπύλη εξέλιξης της ασθένειας και να υπολογιστεί το σχετικό εμβαδό (AUDPC, area under the disease progress curve) του σχηματιζόμενου τραπεζίου (Campbell and Madden, 1990). Η δριμύτητα της ασθένειας εκφράστηκε ως ποσοστό επί του μέγιστου δυνατού AUDPC για όλη την περίοδο διεξαγωγής του πειράματος και αυτή η τιμή ανασφύρεται ως σχετικό AUPDC (Korolev *et al.*, 2001).

Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων του πειράματος παθογένειας (ένταση/δριμύτητα των συμπτωμάτων της ασθένειας, disease severity) έλαβε χώρα σε Η/Υ με τη βοήθεια του στατιστικού προγράμματος SPSS. Η πολυπαραγοντική (multivariate) ανάλυση των μετρήσεων σε κάθε επέμβαση έλαβε χώρα κατά τη δοκιμή/έλεγχο (test) Duncan, όταν διαπιστώνονταν στατιστικώς σημαντική διαφορά ($P<0.5$) μεταξύ των επεμβάσεων σύμφωνα με το κριτήριο *F*.



Εικόνα 15. Φυτά μελιτζάνας ποικιλίας Black Beauty στο θερμοκήπιο. Στο εδαφικό μείγμα των φυτοδοχείων έχουν προστεθεί τα μικροσκληρώτια του εδαφογενούς μύκητα *Verticillium dahliae*.

Έλεγχος της αντιμυκητιακής δράσης του L-cystine στο *Verticillium dahliae*

Σε τρυβλία Petri διαμέτρου 9 cm με θρεπτικό υπόστρωμα PDA τοποθετήθηκε με τη βοήθεια φελλοτρυπητήρα (διάμετρος οπής 3 mm για ισομεγέθη μολύσματα), εμβόλιο του μύκητα *V. dahliae* από καλλιέργειά του διάρκειας επτά ημερών σε PDA στους 22°C, σκότος.

Στα μισά τρυβλία είχε προστεθεί και το αμινοξύ L-cystine συγκέντρωσης 3 mM αποστειρωμένο με τη χρήση φίλτρου 0.22 μm (Millipore), τη στιγμή που η κωνική φιάλη με το υλικό PDA είχε 40°C μετά την αποστείρωσή του (μερικά λεπτά πριν την πήξη του θρεπτικού υλικού, λόγω στερεωποίησης του παράγοντα ζελατινοποίησης, το άγαρ). Τα είκοσι συνολικά τρυβλία (10 τρυβλία με PDA και 10 τρυβλία με DPA+L-cystine) τοποθετήθηκαν σε επωαστικό θάλαμο με 22°C.

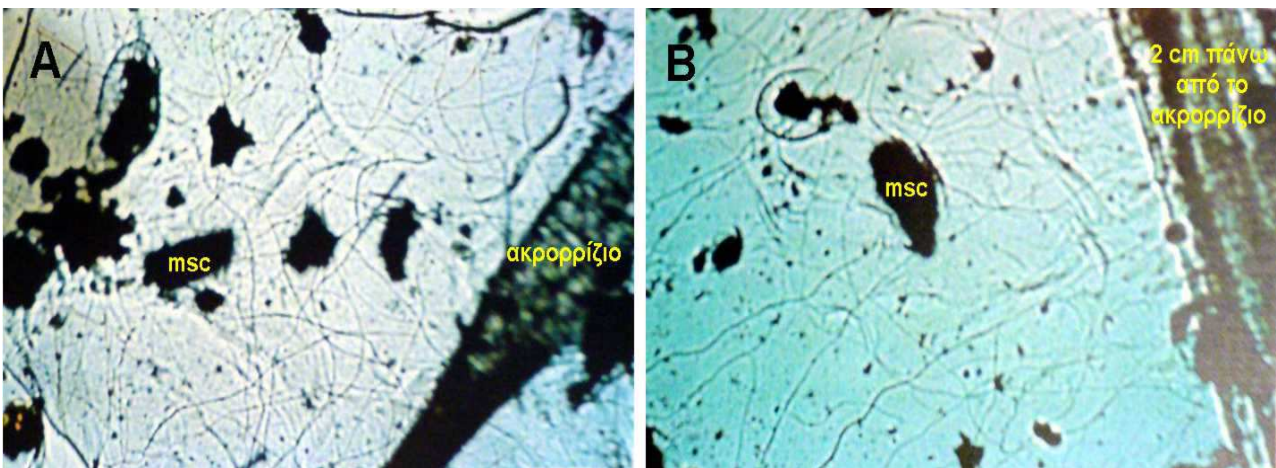
Η διάμετρος (mm) της αποικίας του μύκητα *V. dahliae* στο θρεπτικό υλικό μετρήθηκε από την τρίτη ημέρα επώασης των τρυβλίων μέχρι και την έβδομη ημέρα επώασής τους. Σε κάθε τρυβλίο μετρήθηκαν τέσσερις διαφορετικοί διάμετροι της αποικίας του μύκητα και υπολογίζονταν ο μέσος όρος.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

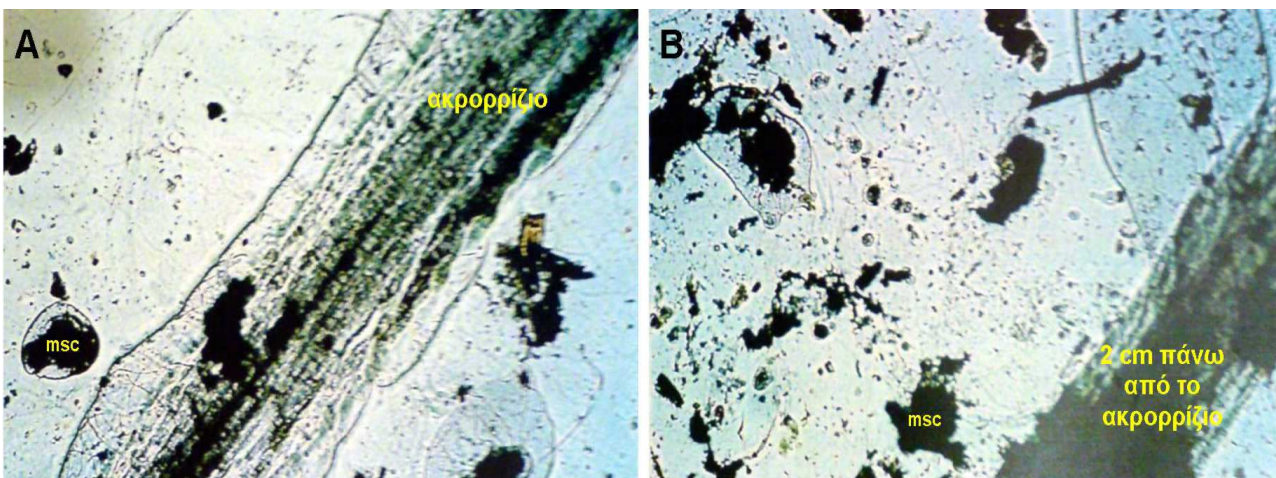
Επίδραση ανοσοποιημένων φυτών μελιτζάνας με το L-cystine στη βλαστικότητα των μικροσκληρωτίων του *Verticillium dahliae*

Τα φυτά μελιτζάνας μεταφυτεύθηκαν σε λυόμενα δοχεία από διαφανές υλικό (Plexiglas), για την εύχρημη συλλογή των δειγμάτων και περαιτέρω εξέτασή τους στο οπτικό μικροσκόπιο. Στα φυτά-μάρτυρες (αφέκαστα) παρατηρήθηκε η πλούσια βλαστικότητα των μικροσκληρωτίων τόσο στο ακρορρίζιο, όσο και στη ζώνη επιμήκυνσης της ρίζας (Εικόνα 16), ενώ τα φυτά που είχαν ψεκαστεί με L-cystine, η βλαστικότητά τους είχε περιοριστεί αριθμητικώς (Εικόνα 17).

Πράγματι, η βλαστικότητα των μικροσκληρωτίων περιορίστηκε κατά μέσο όρο 2% στα φυτά που είχαν ψεκαστεί με L-cystine σε σχέση με το μάρτυρα (Πίνακας 4). Λεπτομερέστερα, η βλαστικότητα των μικροσκληρωτίων στο ακρορρίζιο των φυτών-μάρτύρων ήταν κατά μέσο όρο 81.4% και στη ζώνη επιμήκυνσης των ριζών μελιτζάνας ήταν κατά μέσο όρο 85.8%. Αντιθέτως, η βλαστικότητα των μικροσκληρωτίων στα ακρορρίζια φυτών που είχαν ψεκαστεί με το L-cystine υπολογίσθηκε κατά μέσο όρο στο 80.1% και στη ζώνη επιμήκυνσης των ριζών στο 82.9%.



Εικόνα 16. Πλούσια βλαστικότητα μικροσκληρωτίων (υφές) του εδαφογενούς μύκητα *Verticillium dahliae* σε ρίζες αφέκαστων φυτών-μάρτυρες μελιτζάνας (A) στο ακρορρίζιο (αριστερά) και (B) στη ζώνη επιμήκυνσης της ρίζας (δεξιά).



Εικόνα 17. Αδυναμία ή περιορισμένη βλαστικότητα μικροσκληρωτίων του εδαφογενούς μύκητα *Verticillium dahliae* σε ρίζες φυτών ψεκασμένων με το L-cystine μελιτζάνας (A) στο ακρορρίζιο (αριστερά) και (B) στη ζώνη επιμήκυνσης της ρίζας (δεξιά).

Πίνακας 4. Επίδραση των ανοσοποιημένων φυτών μελιτζάνας ποικιλίας Black Beauty, με τη χρήση του αμινοξέος L-cystine, στη βλαστικότητα των μικροσκληρωτίων του εδαφογενούς μύκητα *Verticillium dahliae*. Σε κάθε επέμβαση σημειώνεται η τυπική απόκλιση.

ΒΛΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΜΙΚΡΟΣΚΛΗΡΩΤΙΩΝ / ΦΥΤΟ				
Επανάληψη	Μάρτυρας*		L-cystine*	
	ακρορρίζιο	2 cm πάνω από το ακρορρίζιο	ακρορρίζιο	2 cm πάνω από το ακρορρίζιο
1η	82.4 ± 7.0	84.4 ± 5.6	79.6 ± 5.4	81.6 ± 6.8
2η	80.6 ± 5.7	85.8 ± 6.8	79.4 ± 4.1	83.4 ± 5.6
3η	81.2 ± 3.8	87.2 ± 5.1	81.4 ± 3.0	83.8 ± 3.8

* Μέσος όρος 50 μικροσκληρωτίων ανά ακρορρίζιο ή 2 cm πάνω από το ακρορρίζιο ανά φυτό από 10 φυτά ανά επανάληψη.

Αναφορικά με τον αριθμό των υφών ανά βλαστημένο μικροσκληρώτιο (Πίνακας 5) και το μήκος των υφών στο κάθε βλαστημένο μικροσκληρώτιο (Πίνακας 6) δεν παρουσιάστηκαν σημαντικές διαφορές.

Πίνακας 5. Επίδραση των ανοσοποιημένων φυτών μελιτζάνας ποικιλίας Black Beauty, με τη χρήση του αμινοξέος L-cystine, στον αριθμό των υφών ανά βλαστημένο μικροσκληρώτιο του εδαφογενούς μύκητα *Verticillium dahliae*. Σε κάθε επέμβαση σημειώνεται η τυπική απόκλιση.

ΑΡΙΘΜΟΣ ΥΦΩΝ / ΒΛΑΣΤΗΜΕΝΟ ΜΙΚΡΟΣΚΛΗΡΩΤΙΟ / ΦΥΤΟ				
Επανάληψη	Μάρτυρας*		L-cystine*	
	ακρορρίζιο	2 cm πάνω από το ακρορρίζιο	ακρορρίζιο	2 cm πάνω από το ακρορρίζιο
1η	2.97 ± 0.17	3.00 ± 0.34	3.14 ± 0.14	3.05 ± 0.21
2η	2.95 ± 0.21	3.13 ± 0.19	3.18 ± 0.20	3.24 ± 0.23
3η	3.09 ± 0.25	0.34 ± 0.22	3.09 ± 0.09	3.03 ± 0.18

* Μέσος όρος 50 μικροσκληρωτίων ανά ακρορρίζιο ή 2 cm πάνω από το ακρορρίζιο ανά φυτό από 10 φυτά ανά επανάληψη.

Πίνακας 6. Επίδραση των ανοσοποιημένων φυτών μελιτζάνας ποικιλίας Black Beauty, με τη χρήση του αμινοξέος L-cystine, στο μήκος της υφής ανά βλαστημένο μικροσκληρώτιο του εδαφογενούς μύκητα *Verticillium dahliae*. Σε κάθε επέμβαση σημειώνεται η τυπική απόκλιση.

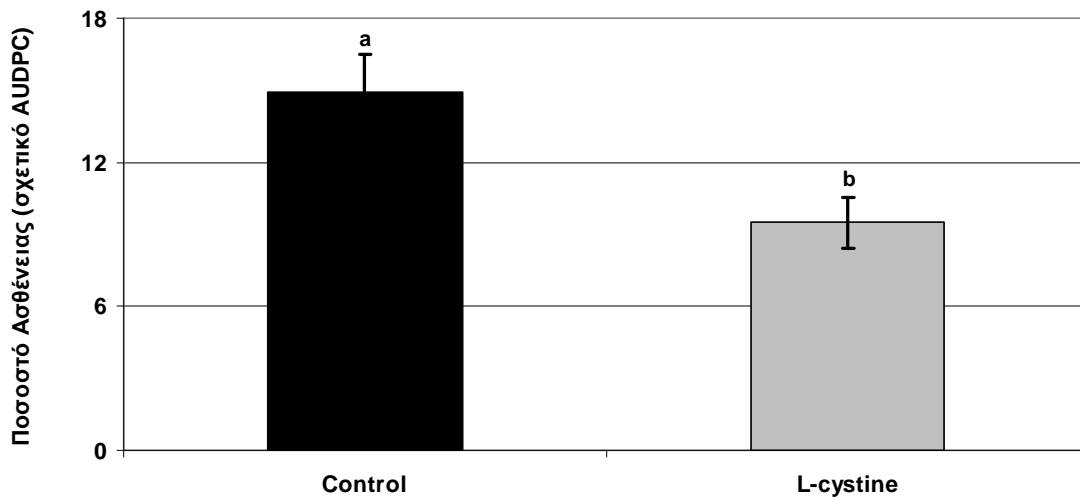
ΜΗΚΟΣ ΥΦΗΣ / ΒΛΑΣΤΗΜΕΝΟ ΜΙΚΡΟΣΚΛΗΡΩΤΙΟ / ΦΥΤΟ				
Επανάληψη	Μάρτυρας*		L-cystine*	
	ακρορρίζιο	2 cm πάνω από το ακρορρίζιο	ακρορρίζιο	2 cm πάνω από το ακρορρίζιο
1η	173 ± 10	165 ± 12	172 ± 09	186 ± 18
2η	178 ± 11	180 ± 11	193 ± 15	191 ± 18
3η	180 ± 11	189 ± 13	191 ± 18	192 ± 08

* Μέσος όρος 50 μικροσκληρωτίων ανά ακρορρίζιο ή 2 cm πάνω από το ακρορρίζιο ανά φυτό από 10 φυτά ανά επανάληψη.

Η βερτισιλλίωση σε φυτά μελιτζάνας ψεκασμένα με L-cystine

Μετά τις τρεις εβδομάδες μετά την προσθήκη των μικροσκληρωτίων στο έδαφος εμφανίσθηκαν τα πρώτα συμπτώματα στα φυτά μελιτζάνας (Εικόνα 18). Η έκφραση της ασθένειας (AUDPC) στα φυτά που ψεκάσθηκαν με το L-cystine είχε περιορισθεί κατά 36.5% περίπου σε σχέση με τα φυτά-μάρτυρες και έως την 50^η ημέρα υπήρξε στατιστικώς σημαντική διαφορά στην εκδήλωση των συμπτωμάτων μεταξύ των φυτών-μάρτυρας και των φυτών που είχαν ψεκαστεί με το L-cystine (Εικόνα 19).

Η ασθένεια εκφρασμένη ως ο μέσος όρος της έντασης των συμπτωμάτων (AUDPC) της ασθένειας παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 1. Η καταγραφή των συμπτωμάτων ολοκληρώθηκε 50 ημέρες μετά τη μόλυνση των φυτών. Στο διάγραμμα, επίσης, έχει σημειωθεί και το τυπικό σφάλμα ανά επέμβαση.



Διάγραμμα 1. Επίδραση των ανοσοποιημένων φυτών μελιτζάνας, ποικιλία Black Beauty (μέσος όρος 36 φυτών), με τη χρήση του αμινοξέος L-cystine στην ένταση/δριμύτητα των συμπτωμάτων της ασθένειας (ποσοστό ασθένειας: σχετικό AUDPC), που οφείλεται στον εδαφογενή μύκητα *Verticillium dahliae*. Σε κάθε επέμβαση δεικνύεται και το τυπικό σφάλμα, ενώ οι επεμβάσεις που δεν ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά σύμφωνα με τη δοκιμή/έλεγχο (test) κατά Duncan ($P < 0.05$).



Εικόνα 18. Συμπτώματα (μάρανση, χλωρώσεις, κιτρινίσματα, νεκρώσεις) της βερτισιλλίωσης, που οφείλεται στον εδαφογενή μύκητα *Verticillium dahliae*, σε φυτά μελιτζάνας ποικιλίας Black Beauty.



Εικόνα 19. Συμπτώματα της βερτισιλιώσεως, που οφείλεται στον εδαφογενή μύκητα *Verticillium dahliae*, σε φυτά μελιτζάνας ποικιλίας Black Beauty που είχαν ψεκαστεί με το αμινοξύ L-cystine (κάτω) και αφέκαστα φυτά-μάρτυρας (πάνω). Η ένταση/δριμύτητα της ασθένειας στα φυτά-μάρτυρας είναι περισσότερη σε σχέση με τα φυτά που είχαν ψεκαστεί με το L-cystine.

Έλεγχος της αντιμυκητιακής δράσης του L-cystine στο *Verticillium dahliae*

Βάσει των αποτελεσμάτων που παρουσιάζονται στον Πίνακα 7 που ακολουθεί επισημαίνεται, ότι το αμινοξύ L-cystine δεν έχει αντιμυκητιακή δράση στο *Verticillium dahliae* μιας και δεν σημειώνονται στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο επεμβάσεων σύμφωνα με το κριτήριο *F* της δοκιμής/έλεγχος (test) κατά Duncan ($P < 0.5$).

Πίνακας 7. Αντιμυκητιακή δράση *in vitro* του αμινοξέος L-cystine συγκέντρωσης 3 mM επί της διαμέτρου αποικίας (mm) του μύκητα *Verticillium dahliae* σε θρεπτικό υλικό PDA

Ημέρες επώασης του <i>V. dahliae</i>	Μάρτυρας*	L-cystine*
3	09.24±0.42 a	09.14±0.71 a
4	12.73±0.49 a	12.40±1.04 a
5	15.96±0.38 a	16.06±0.60 a
6	18.93±0.64 a	19.10±0.72 a
7	21.76±1.00 a	22.16±0.54 a

* Μέσος όρος διαμέτρου αποικίας (mm) τεσσάρων μετρήσεων. Σε κάθε μέτρηση παρουσιάζεται και η τυπική απόκλιση. Η πολυπαραγοντική (multivariate) ανάλυση των μετρήσεων σε κάθε επέμβαση έλαβε χώρα κατά τη δοκιμή/έλεγχο (test) Duncan, όταν διαπιστώνονταν στατιστικώς σημαντική διαφορά ($P < 0.5$) μεταξύ των επεμβάσεων σύμφωνα με το κριτήριο *F*.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η αντιμετώπιση των εδαφογενών παθογόνων σε μια εντατική καλλιέργεια αποτελεί μια από τις βασικές γεωργικές πρακτικές. Από την άλλη μεριά, η κάλυψη των αναγκών διατροφής του ανθρώπου εφαρμόζοντας τις αρχές της αειφορίας απαιτεί την εφαρμογή νέων μεθόδων φυτοπροστασίας, πιο συμβατές με το περιβάλλον. Εξαιτίας του γεγονότος, ότι μέχρι σήμερα δεν υπάρχουν αποτελεσματικά θεραπευτικά μέσα για την καταπολέμηση του μύκητα *V. dahliae*, η βερτισιλλίωση αποτελεί μια πραγματική απειλή για τις γεωργικές εκμεταλλεύσεις (Pegg, 1974; Rouse, 1985; Tjamos *et al.*, 2000). Μια ολοκληρωμένη προσπάθεια για την καταπολέμηση του παθογόνου θα εστιαζόταν στην πλήρη αντιμετώπιση των κατασκευών του καθ' όλη τη διάρκεια του βιολογικού του κύκλου εντός του εδάφους ή ενδοφυτικά. Αμέσως μετά τη νέκρωση του φυτού, το παθογόνο σχηματίζει τα μικροσκληρώτιά του στους ιστούς του φλοιού και του αδρώματος, τα οποία και ελευθερώνονται στο έδαφος μετά την αποσύνθεση των φυτικών ιστών. Δυνητικός τρόπος αντιμετώπισης του παθογόνου είναι η μείωση του αριθμού των μικροσκληρωτίων που βρίσκονται σε ληθαργική κατάσταση στο έδαφος. Σε αυτή την περίπτωση, η εφαρμογή της ηλιοαπολυμάνσεως του εδάφους, μία παθητική και εξαρτώμενη από τις κλιματολογικές συνθήκες τεχνική, έχει προσφέρει ικανοποιητικά αποτελέσματα (Tjamos & Paplomatas, 1988; Tjamos, 2000). Εναλλακτικά, το στάδιο του βιολογικού κύκλου του παθογόνου που μπορεί να καταπολεμηθεί είναι τη στιγμή της προσβολής του ριζικού συστήματος από τις υφές των βλαστανόντων μικροσκληρωτίων του.

Όπως προαναφέρθηκε, ο παράγοντας που ενεργοποιεί τη βλάστηση των αδρανών στο έδαφος μικροσκληρωτίων είναι οι ριζικές εκκρίσεις. Ακολούθως, οι βλαστανούσες μικροσκληρωτιακές υφές εισέρχονται στο φυτό κυρίως από τη ζώνη ανάπτυξης κυττάρων των ριζικών τριχιδίων περιοχή που οι ριζικές εκκρίσεις έχουν τη μεγαλύτερη συγκέντρωση (Huisman, 1982; Mol & van Riessen, 1995; Huisman & Gerik, 1989). Η παρεμπόδιση της βλάστησης των μικροσκληρωτίων του και ακολούθως ο περιορισμός της στα αγγεία του ξύλου θεωρείται ως ένας τρόπος αντιμετώπισης του μύκητα *V. dahliae* (Tjamos & Fravel, 1995a; 1997). Συνεισφορά στην παρεμπόδιση του προαναφερθέντος μηχανισμού στην παρούσα μελέτη αποτελεί η διερεύνηση της ανοσοποίησης των φυτών με τη χρήση δεδομένης συγκέντρωσης του αμινοξέος L-cystine. Αναφέρεται ανοσοποίηση των φυτών, μιας και το L-cystine δεν επέδεξε αντιμυκητιακή δράση στην *in vitro* ανάπτυξη αποικίας του *V. dahliae*. Έτσι, μελετήθηκε η επίδραση του L-cystine στη βλαστικότητα των ώριμων και >70 μm διαμέτρου μικροσκληρωτίων, τα οποία προέρχονταν από το μύκητα *V. dahliae* τροποποιώντας τη μέθοδο των Mol & van Riessen (1995) σε λυόμενα δοχεία από διαφανές υλικό. Η μέθοδος έχει το πλεονέκτημα της επίδρασης των ριζών στα μικροσκληρώτια και μπορεί εύκολα και άμεσα να μετρηθεί στο χώρο και στο χρόνο. Η διαπίστωση της μείωσης μόλις κατά 2% της βλαστικότητας των μικροσκληρωτίων του μύκητα στα ανοσοποιημένα φυτά μελιτζάνας με το L-cystine κρίνεται θετική αν ληφθεί υπόψη, ότι η πυκνότητα των μικροσκληρωτίων ήταν σε υψηλά επίπεδα (5 μικροσκληρώτια / 2 mm³) και σε ομοιόμορφη κατανομή, γεγονός που δεν παρατηρείται στον αγρό σε φυσικές μολύνσεις του μύκητα *V. dahliae*. Επισημαίνεται, επίσης, ότι χρησιμοποιήθηκαν μικροσκληρώτια που είχαν διάμετρο >70 μm, γεγονός που οι Hawke & Lazarovits (1994) παρατήρησαν ότι βλάσταναν γρηγορότερα, επιβίωναν και παρουσίαζαν ταχύτερη και σύγχρονη βλαστικότητα με αποικίες, οι οποίες μεγάλωναν ταχύτερα σε σχέση με τα αντίστοιχα μικρότερου μεγέθους.

Αναφορικά με το μήκος ανάπτυξης των υφών και του αριθμού των υφών ανά βλαστημένο μικροσκληρώτιο, δεν παρουσιάστηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των φυτών-μαρτύρων και των φυτών που είχαν ψεκαστεί με το L-cystine. Πιθανότατα, ενώ ενεργοποιήθηκε κάποιος μηχανισμός άμυνας του φυτού για τη (μικρή έστω) παρεμπόδιση της βλάστησης των μικροσκληρωτίων, δεν

ενεργοποιήθηκε αντίστοιχα ο μηχανισμός ανάσχεσης της αύξησης της υφής. Η πιθανή ερμηνεία δύνатаι να στηρίζεται σε καθαρά ποσοτικές διαφορές στο έδαφος, όπου η επίδραση του ανοσοποιημένου φυτού να οφείλεται και σε παρεμποδιστικές ουσίες της βλάστησης των μικροσκληρωτίων, οι οποίες σε σχετικά μικρές συγκεντρώσεις δεν εξασκούν εμφανή επίδραση. Μικρή όμως αύξηση στη συγκέντρωση να οδηγεί σε παρεμπόδιση της βλαστικότητας των μικροσκληρωτίων. Παρόλα ταύτα, η ικανότητα του μύκητα στο να αποικίζει τα ακρορρίζα δεν επηρεάζεται εάν ο ξενιστής είναι ευπαθής ή ανθεκτικός στην ασθένεια (Huisman & Gerik, 1989). Φυσικά, η προσβολή των αγγείων του ξενιστή από το μύκητα αποτελεί τη σημαντικότερη προϋπόθεση για την αύξηση του μολύσματος στο έδαφος και άρα το κάθε φυτικό είδος χαρακτηρίζεται ως ανθεκτικό, όταν ο μύκητας αποτυγχάνει στην αποίκηση των αγγείων (Lacy & Horner, 1966; Tjamos & Smith, 1975).

Τα μόνα δεδομένα μέχρι σήμερα που έχουν καταγραφεί σχετικά με την παρεμπόδιση σχηματισμού μικροσκληρωτίων *in vitro* αφορούν τη χρήση χημικών ουσιών, όπως της υδροχλωρικής κυστεΐνης και θειογλυκολικού οξέος (Christias, 1981, 1989), αλλά αυτές οι ουσίες εφαρμόζονται δύσκολα και δεν εξαχνώνονται (Tjamos, 1989). Ακόμα, έχουν αναφερθεί μεταβολές στην μικροσκοπική δομή του μύκητα *V. dahliae* κατά τον *in vitro* ανταγωνισμό παρουσία καλλιέργειας *Bacillus* που παράγει αντιβιοτικά και οι οποίες συνίστανται στη διόγκωση των υφών (ειδικότερα στις άκρες) και στην ακανόνιστη διακλάδωση κατά τη ανάπτυξή τους, καθώς και σε κακοσχηματισμένα μικροσκληρώτια (Berg & Ballin, 1994). Η παρούσα μελέτη αποτελεί μια ελπιδοφόρα προσέγγιση διερευνησεως των δυνατοτήτων που παρουσίασε η ανοσοποίηση των φυτών μελιτζάνας με τη χρήση του αμινοξέος L-cystine, η οποία δεν επιδεικνύει *in vitro* αντιμυκητιακή δράση εναντίον του μύκητα και αξιολογήθηκε με τη μέθοδο των λυόμενων δοχείων από διαφανές υλικό η επίδραση των ανοσοποιημένων φυτών επί της βλαστικότητας των μικροσκληρωτίων στα ακρορρίζα. Μάλιστα, η μέθοδος αυτή αποτελεί, επίσης, και μία ελπιδοφόρα προσέγγιση στη γρήγορη αξιολόγηση δυνητικών ανταγωνιστικών βακτηρίων εναντίων εδαφογενών ασθενειών (Αντωνόπουλος, 1998).

Κατά την ανοσοποίηση των φυτών, εκτός από την αρνητική επίδρασή τους στη βλαστικότητα των ώριμων μικροσκληρωτίων του μύκητα, φαίνεται ότι υφίσταται συμβολή (ενεργοποίηση πιθανότατα επιπρόσθετων μηχανισμών άμυνας του φυτού) και στην αποτροπή της μόλυνσης των φυτών ή/και στο ρυθμό της προσβολής, αποίκησης και διασποράς των υφών, σε σχέση με το μάρτυρα, στα στρατηγικής σημασίας για την ασθένεια ακρορρίζα φυτών μελιτζάνας, όπως αποδείχθηκε στην παρούσα μελέτη κατά την καταγραφή των συμπτωμάτων της ασθένειας στην ευαίσθητη ποικιλία Black Beauty. Κατά τη μελέτη της βερτισιλλίωσης λοιπόν στα φυτά μελιτζάνας που είχαν ψεκασθεί με το L-cystine σημειώθηκε μείωση της έντασης/δριμύτητας της εν λόγω ασθένειας (ποσοστό ασθένειας: σχετικό AUDPC) κατά 35% περίπου σε σχέση με το μάρτυρα (αψέκαστα φυτά), διαφορά στατιστικώς σημαντική. Τουλάχιστον αποδεικνύεται, ότι πράγματι τα φυτά μελιτζάνας ανοσοποιούνται (όπως προαναφέρθηκε, διέγερση λανθανόντων μηχανισμών άμυνας του φυτού ενάντια στο εδαφογενές παθογόνο *V. dahliae*).

Γενικότερα, οι βιοχημικές αλλαγές που έχουν παρατηρηθεί σε ρίζες ανοσοποιημένων φυτών είναι α) η ενδυνάμωση των κυτταρικών τοιχωμάτων των επιδερμικών κυττάρων της ρίζας και εναπόθεση διαφόρων ουσιών (λιγνίνη, καλλόζη και διάφορες άλλες φαινολικές ουσίες) ως δομικοί φραγμοί ακόμα και μακριά από το σημείο προσβολής/εισόδου του παθογόνου (Benhamou & Nicole, 1999; Duijff *et al.*, 1997, 1998; Jetiyanon *et al.*, 1997; M'Piga *et al.*, 1997; Tjamos & Smith, 1975), β) τα αυξημένα επίπεδα παραγωγής των ενζύμων χιτινάσης, περοξειδάσης, πολυφενολικής οξειδάσης και φαινολαανίν-αμμώνια-λυάσης (M' Piga *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 2000a), γ) η αυξημένη παραγωγή φυτοαλεξινών (van Peer *et al.*, 1991; Ongena *et al.*, 2000) και δ) το αυξημένο επίπεδο έκφρασης γόνων σχετικών με την καταπόνηση (Timmusk & Wagner, 1999).

Η παρούσα μελέτη αποτελεί μια ελπιδοφόρα προσέγγιση διερευνήσεως της ανοσοποίησης των φυτών με τη χρήση του αμινοξέος L-cystine εναντίον του εδαφογενούς μύκητα *Verticillium dahliae*. Με τη μέθοδο των λυόμενων δοχείων από διαφανές υλικό αξιολογήθηκε η ικανότητα των ανοσοποιημένων φυτών να επιδρούν στη βλαστικότητα των μικροσκληρωτίων του εν λόγω μύκητα στα ακρορρίζια των φυτών, αλλά και στο ρυθμό της προσβολής, αποίκησης και διασποράς των υφών εντός των ιστών ενός ευαίσθητου, στη βερτισιλλίωση, ξενιστή. Αναμφίβολα, κρίνεται σκόπιμος και ο πειραματισμός σε κλίμακα αγρού και, περαιτέρω, η διερεύνηση σε βιοχημικό και μοριακό επίπεδο των λανθανόντων μηχανισμών άμυνας του φυτού, που λαμβάνει χώρα η ενεργοποίησή τους, και επιδρούν επί των μικροσκληρωτίων του μύκητα *V. dahliae*. Εν γένει, η εφαρμογή νέων μεθόδων φυτοπροστασίας φαίνεται πλέον να είναι σήμερα ο ενδεδειγμένος τρόπος αντιμετώπισης διαφόρων ασθενειών στα πλαίσια της ολοκληρωμένης φυτοπροστασίας.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Alexopoulos C. J., Mims C. W. & Blackwell M., 1996.** Introductory Mycology, 4rd edition, John Wiley & Sons.
- Ashworth L. J. jr., Waters J. E., George A. G. & McCutcheon O. D., 1972.** Assessment of microsclerotia of *Verticillium albo-atrum* in field soils. *Phytopathology* 62: 715-719.
- Baker R., 1968.** Mechanisms of biological control of soilborne pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 6: 159-167.
- Baker P. A. H. M., Ran L. X., Pieterse C. M. J. & van Loon L. C., 2003.** Understanding the involvement of rhizobacteria-mediated induction of systemic resistance in biocontrol of plant diseases. *Canadian Journal of Plant Pathology* 25: 5-9.
- Barbara D. J. & Clewes E., 2003.** Plant pathogenic *Verticillium* species: how many of them are there? *Molecular Plant Pathology* 4: 297-305.
- Bell A. A. & Wheller M. H., 1986.** Biosynthesis and functions of fungal melanins. *Annual Review of Phytopathology* 24: 411-451.
- Bell A. A., Puhalla J. E. & Tolmsoff W. J., 1976.** Use of mutants to establish (+) scytalone as an intermediate in melanin biosynthesis by *Verticillium dahliae*. *Canadian Journal of Microbiology* 22: 787-799.
- Benhamou N. & Nicole M., 1999.** Cell biology of plant immunization against microbial infection: The potential of induced resistance in controlling plant diseases. *Plant Physiology and Biochemistry* 37: 703-719.
- Berg G. & Ballin G., 1994.** Bacterial antagonists to *Verticillium dahliae* Kleb. *Journal of Phytopathology* 141: 99-110.
- Bloemberg G. V. & Lugtenberg B. J., 2001.** Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. *Current Opinion in Plant Biology* 4: 343-350.
- Bowen G. D. & Rovira A. D., 1976.** Microbial colonization of plant roots. *Annual Review of Phytopathology* 14: 121-144.
- Campbell R., 1983.** Ultrastructural studies of *Gaeumanomyces graminis* in the water film on wheat roots and the effect of clay on the interactions between this fungus and antagonistic bacteria. *Canadian Journal of Microbiology* 29: 39-45.
- Campell C. L. & Madden L. V., 1990.** Introduction to plant disease epidemiology. John Wiley & Sons Inc., New York.
- Chao W. L., Nelson E B., Harman G. E. & Liorente B., 1986.** Colonization of the rhizosphere by biological control agents applied to seeds. *Phytopathology* 76: 60-65.
- Chen C., Belander R. R., Benhamou N. & Paulitz T. C., 2000a.** Defense enzymes induced in cucumber roots by treatment with Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) and *Pythium aphanidermatum*. *Physiological & Molecular Plant Pathology* 56: 13-23.
- Chet I., Ordentlich A., Shapira R. Oppenheim A., 1990.** Mechanisms of biocontrol of soilborne plant pathogens by rhizobacteria. *Plant & Soil* 129: 85-92.
- Christ W. & Mosinger E., 1989.** Pathogenesis-related proteins of tomato: I= Induction by *Phytophthora infestans* and other biotic and abiotic inducers and correlations with resistance. *Physiological & Molecular Plant Pathology* 35: 53-65.
- Christias C., 1981.** In vitro inhibition of microsclerotia formation by cysteine hydrochloride in *Verticillium dahliae*. *Proceedings of the 3rd International Verticillium Symposium, Bari Italy*, pp.21.
- Christias C., 1989.** Inhibition of microsclerotium formation in *Verticillium dahliae* by thioglycolic acid in infected cotton stems. In: *Vascular wilt diseases of plants*. E. C. Tjamos & C. Beckman (eds). Springer Verlag Berlin-Heidelberg, pp. 521-525.
- Coley-Smith J. R. & Cook R. C., 1971.** Survival and germination of fungal sclerotia. *Annual Review of Phytopathology* 9: 65-92.
- Cook R. J., 1985.** Biological control of plant pathogens: Theory to application. *Phytopathology* 75: 25-29.
- Creelman R. A. & Mullet J. E., 1997.** Oligosaccharides, brassinolides and jasmonates: Nontraditional regulators of plant growth, development and gene expression. *The Plant Cell* 9: 1211-1223.
- Delaney T. P., Friedrich L. & Ryals J. A., 1995.** Arabidopsis signal transduction mutant defective in chemically and biologically induced disease resistance. *Proceedings of the National Academic of Sciences of the USA* 92: 6602-6606.

- Duijff B. J., Pearson G. V. & Lemanceau P., 1997.** Involvement of the outer membrane lipopolysaccharides in the endophytic colonization of tomato roots by biocontrol *Pseudomonas fluorescens* strain WCS417r. *The New Phytologist* 135: 325-334, 1997
- Ebel J., 1986.** Phytoalexin synthesis: The biochemical analysis of the induction process. *Annual Review of Phytopathology* 24: 235-264.
- Ebel J. & Mithofer A., 1998.** Early events in the elicitation of plant defense. *Planta* 206: 335-348.
- Emmaty D. A. & Green R. J. jr., 1969.** Fungistasis and the behavior of the microsclerotia of *Verticillium albo-atrum* in soil. *Phytopathology* 59: 1590-1595.
- Verticillium albo-atrum* in soil. *Phytopathology* 61: 260-264.
- Foster R. C., 1986.** The ultrastructure of the rhizoplane and rhizosphere. *Annual Review of Phytopathology* 24: 211-234.
- Foster R. C., Rovira A. D. & Cook T. W., 1983.** The production of the root-soil interface. *APS*, pp 157.
- Fravel D. R., 1988a.** Role of antibiosis in the biocontrol of plant diseases. *Annual Review of Phytopathology* 26: 75-91.
- Gerik J. S. & Huisman O. C., 1985.** Mode of colonization of roots by *Verticillium* and *Fusarium*. In: Ecology and management of soilborne plant pathogens. C. A. Parker, A. D. Rovira, K. J. Moore & P. T. W. Wong (eds). American Phytopathological Society, St. Paul, pp. 80-83.
- Gerik J. S. & Huisman O. C., 1988.** Study of field-grown cotton roots infected with *Verticillium dahliae* using an immunoenzymatic staining technique. *Phytopathology* 78: 1174-1178.
- Gordee R. S. Porter C. L., 1961.** Structure, germination and physiology of microsclerotia of *Verticillium albo-atrum*. *Mycologia* 53: 171-183.
- Green R. J. jr., 1969.** Survival and inoculum potential of conidia and microsclerotia of *Verticillium albo-atrum* in soil. *Phytopathology* 59: 874-876.
- Handelsman J. & Stabb E. V., 1996.** Biocontrol of soilborne plant pathogens. *The Plant Cell* 8: 1855-1869.
- Hawke M. A. & Lazarovits G., 1994.** Production and manipulation of individual microsclerotia of *Verticillium dahliae* for use in studies of survival. *Phytopathology* 84: 883-890.
- Hiltner L. 1904.** Über neuer erfahrungen und probleme auf dem gebiete der bodenbakteriologie unter besonderer berücksichtigung der gründung und brache. *Arbeiten der Deutschen Landwirtschaftlichen Gesellschaft* 98: 59-78.
- Hornby D., 1990.** Biological control of soil borne plant pathogens. *CAB International*, pp. 479.
- Horst K. R., 1990.** Westcott 's Plant Disease Handbook, 5th edition.
- Huisman O. C., 1982.** Interrelations of root growth dynamics to epidemiology of root-invading fungi. *Annual Review of Phytopathology* 20: 303-327.
- Huisman O. C. & Gerik J. S., 1989.** Dynamics of colonization of plant roots by *Verticillium dahliae* and other fungi. In: Vascular wilt diseases of plants. E. C. Tjamos & C. H. Beckman (eds). NATO ASI Series Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, H28: pp. 1-17.
- Isaac I. & Heal J. B., 1961.** Wilt of lucerne caused by species of *Verticillium*. III: Viability of *Verticillium albo-atrum* carried with seed: effects of deed dressings and fumigants. *Annual Applied of Biology* 49: 675-691.
- Jetiyanon K., Tuzun S. & Kloepper J. W. 1997.** Lignification, peroxidase and superoxide dismutases as early plant defense reactions associated with PGPR-mediated induced systemic resistance. In: Plant Growth-Promoting Rhizobacteria-Present Status and Future Prospects. A. Ogoshi, K. Kobayashi, Y. Homma, F. Kodama, N. Kondo & S. Akino (eds). Nakanishi, Printing, Sapporo, Japan, pp. 265-268.
- Katan J., 1981.** Solar heating (solarization) of soil for control of soilborne pests. *Annual Review of Phytopathology* 19: 211-236.
- Kessmann H., Staub T., Hoffmann C., Maetzke T., Herxog J., Ward E., Uknes S. & Ryals J., 1994.** Induction of systemic acquired disease resistance in plants by chemicals. *Annual Review of Phytopathology* 32: 439-459.
- Kíraly Z., Klement Z., Solymosy F. & Voros J., 1970.** Methods on Plant Pathology. Akademiai Kiado, Budapest.
- Korolev N., Pèrez-Arertèz E., Bejarano-Alcàzar J., Rodríguez-Jurado D., Katan J., Katan T. & Jimènez-Díaz R.M., 2001.** Comparative study of genetic diversity and pathogenicity among populations of *Verticillium dahliae* from cotton in Spain and Israel. *European Journal of Plant Pathology* 107: 443-456.
- Kuć J., 1995.** Phytoalexins, stress, metabolism and disease resistance in plants. *Annual Review of Phytopathology* 33: 275-297.

- Lacy M. L. & Horner C. E., 1966.** Behavior of *Verticillium dahliae* in the rhizosphere and on roots of plants susceptible, resistant and immune to wilt. *Phytopathology* 56: 427-430.
- Latunda-Data A. O. & Lucas J. A., 1985.** Resistance alfalfa plants as symptomless carriers of *Verticillium albo-atrum*. *Plant Disease* 69: 510-511.
- Leong J., 1986.** Siderophores: Their biochemistry and possible role in the biocontrol of plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 24: 187-209.
- Liu L., Kloepper J. W. & Tuzun S., 1995b.** Induction of systemic resistance in cucumber against bacterial angular leaf spot by plant growth-promoting rhizobacteria. *Phytopathology* 85: 843-847.
- Loper J. E., Suslow T. V. & Schroth M. N., 1984.** Lognormal distribution of bacterial populations in the rhizosphere. *Phytopathology* 74: 1454-1460.
- Lynch J. M., 1990.** Some consequences of microbial rhizosphere competence for plant and soil. In: *The rhizosphere*. J. M. Lynch (eds), pp. 3.
- Lyon G. D., Reglinski T. & Newton A. C., 1995.** Novel disease control compounds: the potential to "immunize" plants against infection. *Plant Pathology* 44: 407-427.
- M' Piga P., Belanger R. R., Paulitz T. Z. & Benhanou N., 1997.** Increased resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* in tomato plants treated with the endophytic bacterium *Pseudomonas fluorescence*, strain 63-28. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 50: 301-320.
- Mehdy M. C., 1994.** Active oxygen species in plant defense against pathogens. *Plant Physiology* 105: 467-472.
- Menzies J. D. & Griebel G. E., 1967.** Survival and saprophytic growth of *Verticillium dahliae* in uncropped soil. *Phytopathology* 57: 703-709.
- Mol L. & van Riessen H. W., 1995.** Effect of plant roots on the germination of microsclerotia of *Verticillium dahliae*. *European Journal of Plant Pathology* 101: 673-678.
- Mol L., van Haltern J. M., Scholte K. & Struik P. C., 1996.** Effects of crop species, crop cultivars and isolates of *Verticillium dahliae* on the population of microsclerotia in the soil, and consequences for crop yield. *Plant Pathology* 45: 205-214.
- Molina A., Hunt M. D. & Ryals J. A., 1998.** Impaired fungicide activity in plants blocked in disease resistance
- Neilands J. B. & Nakamura K., 1991.** Detection, determination, isolation, characterization and regulation of microbial iron chelates. In: *CRC Handbook of microbial iron chelates*. G. Winkelmann (eds). London, CRC Press.
- Neumann G & Römheld V., 2001.** The release of root exudates as affected by the plant's physiological status. In: *The rhizosphere*. R. Pinton, Z. Varanini & Nannipieri P. (eds). Marcel Dekker, Inc., New York, Basel, pp. 41-93.
- Ongena M., Daayf F., Jacques P., Thonart P., Benhamou N., Paulitz T. C. & Bélanger R. R., 2000.** Systemic induction of phytoalexins in cucumber in response to treatments with fluorescent pseudomonas. *Plant Pathology* 49: 523-530.
- Osman A. A. & Viglierchio D. R., 1981.** Foliar spray effects of selected amino acids on sunflower infected by *Meloidogyne incognita*. *Journal of Nematology* 13: 417-419.
- Papavizas G. C. & Lumsden R. D., 1980.** Biological control of soilborne fungal propagules. *Annual Review of Phytopathology* 18: 389-413.
- Pegg G. F., 1974.** Verticillium diseases. *Review of Plant Pathology* 53: 156-182.
- Penninckx I. A. M. A., Eggermont K., Terras F. R. G., Thomma B. P. H. J., de Samplax G. W., Buchala A., Métraux J.-P., Manners J. M. & Broekaert W. F., 1996.** Pathogen-induced systemic activation of a plant gene in *Arabidopsis* follows a salicylic acid-independent pathway. *The Plant Cell* 8: 2309-2323.
- Pennypacker B. W., Leath K. T. & Hill R. R. jr., 1985.** Resistant alfalfa plants as symptomless carriers of *Verticillium albo-atrum*. *Plant Disease* 69: 510-511.
- Persello-Cartieaux F., Nussaume L. & Robaglia C., 2003.** Tales from the underground: molecular plant-microbe interactions. *Plant Cell Environment* 26: 189-199.
- Pieterse C. M. J., van Wees S. C. M., van Pelt J. A., Knoester M., Laar R., Gerrits H., Weis Beek P. J. & van Loon L., 1998.** A novel signaling pathway controlling induced resistance in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 10: 1571-1580.
- Raskin I., 1992.** Role of salicylic acid in plants. *Annual Review of Plant Physiology & Plant Molecular Biology* 43: 439-463.
- Rouse D. I., 1985.** Some approaches to prediction of early dying disease severity. *American Potato Journal* 62: 187-193.
- Rovira A. D., 1991.** Rhizosphere research-85 years of progress and frustration. In: *The rhizosphere and plant growth*. D. C. Keister & P. B. Cregan (eds). Kluwer Academic Publishers, pp.3-13.

- Ryan C. A. & Jagendorf A., 1995.** Self defense by plants. Proceedings of the National Academic of Sciences of the USA 92: 4075.
- Schreiber L. R. & Green R. J. jr., 1963.** Effect of root exudates on germination of conidia and microsclerotia of *Verticillium albo-atrum* inhibited by the soil fungistatic principle. Phytopathology 53: 260-264.
- Schnathorst W. C., 1981.** Life-cycle and epidemiology of *Verticillium*. In: Fungal wilt diseases of plants. M. E. Mace, A. A. Bell & C. H. Beckman (eds) Academic Press, NY, pp. 82-111.
- Sequeira L., 1983.** Mechanisms of induced resistance in plants. Annual Review of Microbiology 37: 51-79.
- Sherf A. F. & Macnab A. A., 1986.** Vegetable diseases and their control. 2nd edition. John Wilhey & Sons.
- Siegrist J., Orober M. & Buchenauer H., 2000.** B-amonobutiric acid-mediated enhancement of resistance in tobacco to Tomato Mosaic Virus on the accumulation of salicylic acid. Physiological & Molecular Plant Pathology 56: 95-106.
- Sinha A. K. & Wood R. K. S., 1968.** Studies on the nature of resistance in tomato plants to *Verticillium albo-atrum*. Annals of Applied Biology 62: 319-327.
- Smith-Becker J., Maroi E., Huguet E. J., Midland S. L., Sims J. J. & Keen N. T., 1998.** Accumulation of salicylic acid and 4-hydrobenzoic acid in phloem fluids of cucumber during systemic acquired resistance is preceeded by a transient increase in phenylalanine ammonia-lyase activity in petioles and stems. Plant Physiology 57: 25-34.
- Stephens C. T. & Elmer W. H., 1988.** Comparison of techniques for eliminating contaminants from asparagus seeds. HortScience 23: 1031-1032.
- Sticher L., Mach-Mani B. & Mètraux J. P., 1997.** Systemic acquired resistance. Annual Review of Phytopathology 35: 235-270.
- Stipanovic R. D. & Bell A., 1976.** Pentaketide metabolites of *Verticillium dahliae*. Identification of (-) 3,4-dihydro-3,8-dihydroxy-1(2H)-naphthalenone / (-)-Vermalone / as precursors to melanine biosynthesis. Journal of Organic Chemistry 41: 2468.
- Subbarao K. V., Hubbard J. C. & Koike S. T., 1999.** Evaluation of broccoli residue incorporation into filed soil for *Verticillium* wilt cotton in cauliflower. Plant Disease 83: 124-129.
- Swadling I. R. & Jeffries P., 1996.** Isolation of microbial antagonists for biocontrol of grey mold disease of strawberry. Biocontrol Science Technology 6: 125-136.
- Thomma B. P. H. T., Eggermont K., Penninchx I. A. M. A., Mach-Mani B., Vogelsang R., Camme B. P. A. & Broekaert W. F., 1998.** Separate jasmonate-dependent and salicylate-dependent defense-response pathways in Arabidopsis are essential for resistance to distinct microbial pathogens. Proceedings of the National Academic of Sciences of the USA 95: 15107-15111.
- Timmusk S. & Wagner E. G. H., 1999.** The plant-growth-promoting rhizobacterium *Paenibacillus polymyxa* induces changes in Arabidopsis thaliana gene expression: a possible connection between biotic and abiotic stress responses. Molecular Plant-Microbe Interactions. 12: 951-959.
- Tjamos E. C., 1981.** Virulence of *Verticillium dahliae* and *V. albo-atrum* isolates in tomato seedlings in relation to their host of origin and the applied cropping system. Phytopathology 71: 99-100.
- Tjamos E. C., 1989.** Vascular wilt diseases of plants. E. C Tjamos & C. Beckman (eds). Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Tjamos E. C., 2000.** Strategies in developing methods and applying techniques for the biological control of *Verticillium dahliae*. In: Advances in *Verticillium* research and disease management. E. C. Tjamos, R. C. Rowe, J. B. Heale & D. R. Fravel (eds). American Phytopathological Society, St. Paul, MN, USA, pp. 249-251.
- Tjamos E. C. & Smith I. M., 1975.** The expression of resistance to *Verticillium albo-atrum* in monogenically resistant tomato varieties. Physiological Plant Pathology 6: 215-225.
- Tjamos E. C. & Faridis A., 1980.** Control of soil-borne pathogens by solar heating in plastic houses in Greece. Proceedings of 5th Congress of the Mediterranean Phytopathological Union, Patras, Greece, pp. 82-84.
- Tjamos E. C. & Paplomatas E. J., 1988.** Long-term effect of soil solarization in controlling *Verticillium* wilt of globe artichokes in Greece. Plant Pathology 37: 507-515.
- Tjamos E. C. & Fravel D. R., 1995a.** Agents and strategies for biological control of *Verticillium dahliae* International Workshop on sclerotia-forming fungi. OILB Bulletin 18: 117-124.
- Tjamos E. C. & Fravel D. R., 1995b.** Detrimental effects of sublethal heating and *Talaromyces flavus* on microsclerotia of *Verticillium dahliae*. Phytopathology 85: 388-392.

- Tjamos E.C. & Fravel D. R., 1997.** Distribution and establishment of the biocontrol agent fungus *Talaromyces flavus* in soil and on roots of solanaceous hosts. *Crop Protection* 16: 135-139.
- Tjamos S. E., Arambatzis C., Katinakis P. & Tjamos E. C., 2000.** Induction of resistance against *Verticillium* wilt in cucumbers, eggplants and *Arabidopsis* by a rhizosphere *Bacillus sp.* (Abstract). International Symposium of Induced Resistance to Plant Diseases, Corfu, Greece, pp. 62.
- van Loon L. C., 1983.** The induction of pathogenesis-related proteins by pathogens and specific chemicals. *Netherlands Journal of Plant Pathology* 89: 265-273.
- van Loon L. C. & van Strien E. A., 1999.** The families of pathogenesis-related proteins, their activities and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiological & Molecular Plant Pathology* 55: 85-97.
- van Loon L. C., Bakker P. A. H. M & Pieterse C. M. J., 1998.** Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annual Review of Phytopathology* 30: 453-483.
- van Peer R., Niemann G. J., Schippers B., 1991.** Induced resistance and phytoalexin accumulation in biological control of *Fusarium* wilt of carnation by *Pseudomonas sp.* strain WCS417r. *Phytopathology* 81: 728-734.
- van Wees S. C. M., de Swart E. A. M., van Pelt J. A., van Loon L. C. & Pieterse C. M. J., 2000.** Enhancement of induced disease resistance by simultaneous activation of salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academic of Sciences of the USA* 97: 8711-8716.
- Vance C. P., Kirk T. K. & Sherwood R. T., 1980.** Lignification as a mechanism induced by rhizosphere bacteria. *Annual Review of Phytopathology* 18: 259-288.
- Walling L. L., 2001.** Induced resistance: from the basic to the applied. *Trends in Plant Science* 6: 445-447.
- Welbaum G., Sturz A. V., Dong Z. & Nowak J., 2004.** Fertilizing soil microorganisms to improve productivity of agroecosystems. *Critical Review of Plant Sciences* 23: 175-193.
- Weller D. M., 1988.** Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Annual Review of Phytopathology* 26: 379-407.
- Wilhelm S., 1955.** Longevity of the *Verticillium wilt* fungus in the laboratory and field. *Phytopathology* 45: 180-181.
- Xiao C. L., Hao J. J. & Subbarao K. V., 1997.** Spatial patterns of microsclerotia of *Verticillium dahliae* in soil of *Verticillium* wilt of Cauliflower. *Phytopathology* 87: 325-331.
- Yang C.-H. & Crowley D. E., 2000.** Rhizosphere microbial community structure in relation to root location and plant iron nutritional status. *Applied & Environmental Microbiology* 66: 345-351.

Ελληνόγλωσση Βιβλιογραφία

- Αντωνίου Π. Π., 1995.** Συμβολή της ηλιοαπολύμανσης του εδάφους στην αντιμετώπιση φυτοπαθογόνων μικροοργανισμών και η επίδρασή της στην ανταγωνιστική μικροχλωρίδα του εδάφους. Διδακτορική Διατριβή, Γ.Π.Α..
- Αντωνόπουλος Δ. Φ., 1998.** Βιολογική καταπολέμηση του μύκητα *Verticillium dahliae* με ριζοσφαιρικά βακτήρια του γένους *Bacillus*. Πτυχιακή Μελέτη, Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας, Γ.Π.Α..
- Γεωργόπουλος Σ. Γ. & Ζιώγας Β. Ν., 1992.** Αρχές και Μέθοδοι Καταπολέμησης των Ασθενειών των Φυτών, Αθήνα.
- Παναγόπουλος Χ. Γ., 1993.** Ασθένειες καρποφόρων δένδρων και αμπέλου. Εκδόσεις Σταμούλης, Αθήνα, σελ. 169-178.
- Τζάμος Ε. Κ., 2004.** Φυτοπαθολογία. Εκδόσεις Σταμούλης.

Παράρτημα (μετρήσεις πειραμάτων)

Επίδραση ανοσοποιημένων φυτών μελιτζάνας με την L-cystine στη βλαστικότητα των μικροσκληρωτίων του *V. dahliae*

Στους Πίνακες που ακολουθούν σημειώνεται η βλαστικότητα μικροσκληρωτίων (msc) του εδαφογενούς μύκητα *Verticillium dahliae*, καθώς επίσης και ο μέσος όρος του αριθμού των υφών και μήκους υφής των βλαστημένων msc ανά φυτό στο ακρορρίζιο και στα 2 cm πάνω από το ακρορρίζιο (ζώνη επιμήκυνσης των ριζών) σε φυτά μελιτζάνας, ποικιλίας Black Beauty, τόσο σε φυτά ψεκασμένα με το αμινοξύ L-cystine, όσο και στο μάρτυρα (αψέκαστα φυτά).

Το πείραμα διεξήχθη στο θερμοκήπιο με την ανάπτυξη των φυτών μελιτζάνας σε λυόμενα δοχεία από διαφανές υλικό (Plexiglas), για την εύκολη απόσπαση και, εν συνεχεία, παρατήρηση της βλαστικότητας των msc (50 msc στο ακρορρίζιο και 50 msc στα 2 cm πάνω από το ακρορρίζιο ανά φυτό) επί αντικειμενοφόρων πλακών σε οπτικό μικροσκόπιο από 10 φυτά μάρτυρας και 10 φυτά ψεκασμένα με το L-cystine.

1^η ΕΠΑΝΑΛΗΨΗ

ΜΑΡΤΥΡΑΣ-ΑΚΡΟΡΡΙΖΙΟ			
α/α φυτό	% βλαστικότητας	Νο υφών/msc	Μήκος υφής/msc
1	45/50 = 90	128/45 = 2.84	22300/128 = 174
2	41/50 = 82	129/41 = 3.15	23100/129 = 179
3	43/50 = 86	115/43 = 2.67	22600/115 = 197
4	43/50 = 86	134/43 = 3.12	19300/134=144
5	42/50 = 84	120/42 = 2.86	18500/120 = 154
6	38/50 = 76	123/38 = 3.24	21550/123 = 175
7	34/50 = 68	97/34 = 2.85	14400/97 = 148
8	46/50 = 92	136/46 = 2.96	26300/136 = 193
9	39/50 = 78	118/39 = 3.03	20450/118 = 173
10	41/50 = 82	122/41 = 2.98	18700/122 = 153
M.O.	412/500 = 82.4	1222/412 = 2.97	207200/1222 = 170

ΜΑΡΤΥΡΑΣ-2 cm ΠΑΝΩ ΑΠΟ ΤΟ ΑΚΡΟΡΡΙΖΙΟ			
α/α φυτό	% βλαστικότητας	Νο υφών/msc	μήκος υφής/msc
1	38/50 = 76	100/38 = 2.63	17400/100 = 174
2	40/50 = 80	139/40 = 3.48	26000/139 = 187
3	43/50 = 86	125/43 = 2.91	24050/125 = 192
4	40/50 = 80	128/40 = 3.20	20300/128 = 159
5	47/50 = 94	136/47 = 2.89	23450/136 = 172
6	45/50 = 90	138/45 = 3.07	23850/138 = 173
7	40/50 = 80	093/40 = 2.33	151150/093 = 163
8	42/50 = 84	138/42 = 3.29	24350/138 = 177
9	42/50 = 84	123/42 = 2.93	21000/123 = 171
10	45/90 = 90	148/45 = 3.29	24300/148 = 164
M.O.	422/500 = 84.4	1268/422 = 3.00	219850/1268 = 173

L cystine-ΑΚΡΟΡΡΙΖΙΟ			
α/α φυτό	% βλαστικότητα	Νο υφών/msc	μήκος υφής/msc
1	37/50 = 74	121/37 = 3.27	18150/121 = 150
2	43/50 = 86	128/43 = 2.98	211150/128 = 165
3	38/50 = 76	117/38 = 3.08	19600/117 = 168
4	41/50 = 82	131/41 = 3.20	20800/131 = 159
5	44/50 = 88	148/44 = 3.36	26650/148 = 179
6	39/50 = 78	117/39 = 3.00	21450/117 = 183
7	40/50 = 80	128/40 = 3.20	24200/128 = 189
8	40/50 = 80	127/40 = 3.18	23850/127 = 188
9	35/50 = 70	111/35 = 3.17	19300/111 = 174
10	41/50 = 82	120/41 = 2.93	20050/120 = 167
M.O.	398/500 = 79.6	1248/398 = 3.14	215200/1248 = 172

L cystine-2cm ΠΑΝΩ ΑΠΟ ΤΟ ΑΚΡΟΡΡΙΖΙΟ			
α/α φυτό	% βλαστικότητα	Νο υφών/msc	μήκος υφής/msc
1	38/50 = 76	113/38 = 2.97	19150/113 = 169
2	42/50 = 84	125/42 = 2.98	19000/125 = 152
3	40/50 = 80	118/40 = 2.95	20000/118 = 169
4	44/50 = 88	147/44 = 3.34	25100/147 = 171
5	44/50 = 88	151/44 = 3.43	27950/151 = 185
6	38/50 = 76	106/38 = 2.79	18700/106 = 176
7	37/50 = 74	113/37 = 3.05	20100/113 = 178
8	36/50 = 72	101/36 = 2.81	18250/101 = 181
9	44/50 = 88	133/44 = 3.02	22700/133 = 171
10	45/50 = 90	142/45 = 3.16	24150/142 = 170
M.O.	408/500 = 81.6	1249/408 = 3.06	215100/1249 = 172

2^η ΕΠΑΝΑΛΗΨΗ

ΜΑΡΤΥΡΑΣ-ΑΚΡΟΡΡΙΖΙΟ			
α/α φυτό	% βλαστικότητα	Νο υφών/msc	Μήκος υφής/msc
1	45/50 = 90	141/45 = 3.13	22650/141 = 161
2	39/50 = 78	105/39 = 2.69	18850/105 = 180
3	41/50 = 82	133/41 = 3.24	21750/133 = 164
4	41/50 = 82	132/41 = 3.22	20450/132 = 155
5	40/50 = 80	121/40 = 3.03	20000/121 = 165
6	35/50 = 70	98/35 = 2.80	13850/98 = 141
7	37/50 = 74	111/37 = 3.00	20100/111 = 181
8	42/50 = 84	114/42 = 2.71	19400/114 = 170
9	40 / 50 = 80	110/40 = 2.75	18850/110 = 171
10	43/50 = 86	124/43 = 2.88	19700/124 = 159
M.O.	403/500 = 80.6	1189/403 = 2.95	195600/1189 = 165

ΜΑΡΤΥΡΑΣ-2 cm ΠΑΝΩ ΑΠΟ ΤΟ ΑΚΡΟΡΡΙΖΙΟ			
α/α φυτό	% βλαστικότητα	Νο υφών/msc	Μήκος υφής/msc
1	48/50 = 96	170/48 = 3.4	34150/170 = 201
2	42/50 = 84	131/42 = 3.12	22650/131 = 173
3	45/50 = 90	140/45 = 3.11	26350/140 = 188
4	44/50 = 88	142/44 = 3.23	24300/142 = 171
5	43/50 = 86	139/43 = 3.23	26350/139 = 189
6	35/50 = 70	101/35 = 2.89	17100/101 = 169
7	42/50 = 84	120/42 = 2.86	21450/120 = 179
8	44/50 = 88	132/44 = 3.00	22250/132 = 169
9	41/50 = 82	129/41 = 3.15	22100/129 = 171
10	45/90 = 90	143/45 = 3.18	24300/143 = 173
M.O.	429/500 = 85.8	1347/429 = 3.14	241500/1347 = 179

L CYSTINE-ΑΚΡΟΡΡΙΖΙΟ			
α/α φυτό	% βλαστικότητα	Νο υφών/msc	Μήκος υφής/msc
1	39/50 = 78	122/39 = 3.13	20050/122 = 164
2	38/50 = 76	137/38 = 3.61	25050/137 = 183
3	42/50 = 84	135/42 = 3.21	22750/135 = 169
4	36/50 = 72	113/36 = 3.14	18100/113 = 160
5	40/50 = 80	122/40 = 3.05	21900/122 = 180
6	41/50 = 82	127/41 = 3.10	23200/127 = 183
7	42/50 = 84	134/42 = 3.19	28150/134 = 210
8	38/50 = 76	130/38 = 3.42	27000/130 = 208
9	39/50 = 78	117/39 = 3.00	24100/117 = 206
10	42/50 = 84	124/42 = 2.95	23950/124 = 193
M.O.	397/500 = 79.4	1261/397 = 3.18	234250/1261 = 186

L CYSTINE-2 cm ΠΑΝΩ ΑΠΟ ΤΟ ΑΚΡΟΡΡΙΖΙΟ			
α/α φυτό	% βλαστικότητα	Νο υφών/msc	Μήκος υφής/msc
1	41/50 = 82	127/41 = 3,10	22250//127 = 175
2	43/50 = 86	134/43 = 3,33	26550//134 = 198
3	44/50 = 88	141/44 = 3,20	26800//142 = 189
4	38/50 = 76	112/38 = 2,95	23050//112 = 206
5	46/50 = 92	175/46 = 3,80	33350//175 = 191
6	42/50 = 84	140/42 = 3,33	30000//140 = 214
7	40/50 = 80	128/40 = 3,20	26700//128 = 209
8	40/50 = 80	121/40 = 3,03	21750//121 = 180
9	38/50 = 76	119/38 = 3,13	20100//119 = 169
10	45/50 = 90	147/45 = 3,27	28750//147 = 196
M.O.	417/500 = 83.4	1344/417 = 3.22	259300/1344 = 186

3^η ΕΠΑΝΑΛΗΨΗ

ΜΑΡΤΥΡΑΣ-ΑΚΡΟΡΡΙΖΙΟ			
α/α φυτό	% βλαστικότητα	Νο υφών/msc	Μήκος υφής/msc
1	43/50 = 86	132/43 = 3.07	24150/132 = 183
2	40/50 = 80	124/40 = 3.10	22850/124 = 184
3	41/50 = 82	120/41 = 2.93	22100/120 = 184
4	38/50 = 76	108/38 = 2.84	19000/108 = 180
5	42/50 = 84	117/42 = 2.79	20050/117 = 171
6	39/50 = 78	124/39 = 3.18	21000/124 = 169
7	40/50 = 80	132/40 = 3.30	23150/132 = 175
8	40/50 = 80	145/40 = 3.63	24900/145 = 172
9	44/50 = 88	139/44 = 3.16	23850/139 = 172
10	39/50 = 78	111/39 = 2.85	22800/111 = 205
Μ.Ο.	406/500 = 81,2	1252/406 = 3.08	223850/1252 = 179

ΜΑΡΤΥΡΑΣ-2 cm ΠΑΝΩ ΑΠΟ ΤΟ ΑΚΡΟΡΡΙΖΙΟ			
α/α φυτό	% βλαστικότητα	Νο υφών/msc	Μήκος υφής/msc
1	42/50 = 84	141/42 = 3.36	23800/141 = 169
2	45/50 = 90	163/45 = 3.62	29100/163 = 179
3	41/50 = 82	148/41 = 3.61	27350/148 = 185
4	40/50 = 80	131/40 = 3.28	25700/131 = 196
5	44/50 = 88	137/44 = 3.11	24950/137 = 182
6	46/50 = 92	159/46 = 3.46	28150/159 = 177
7	41/50 = 82	124/41 = 3.02	26250/124 = 212
8	48/50 = 96	174/48 = 3.63	32700/174 = 188
9	44/50 = 88	157/44 = 3.57	30050/157 = 191
10	45/50 = 90	161/45 = 3.58	33100/161 = 206
Μ.Ο.	436/500 = 87,2	1495/436 = 3.43	281150/1495 = 188

L CYSTINE-ΑΚΡΟΡΡΙΖΙΟ			
α/α φυτό	% βλαστικότητα	Νο υφών/msc	Μήκος υφής/msc
1	40/50 = 80	126/40 = 3.15	27000/126 = 214
2	41/50 = 82	125/41 = 3.05	26150/125 = 209
3	43/50 = 86	129/43 = 3.00	20750/129 = 176
4	41/50 = 82	120/41 = 2.93	22100/120 = 184
5	39/50 = 78	117/39 = 3.00	19250/117 = 165
6	42/50 = 84	131/42 = 3.12	21900/131 = 167
7	38/50 = 76	119/38 = 3.13	23800/119 = 200
8	40/50 = 80	129/40 = 3.23	27000/129 = 209
9	42/50 = 84	134/42 = 3.19	26050/134 = 194
10	41/50 = 82	128/41 = 3.12	25100/128 = 196
Μ.Ο.	407/500 = 81,4	1258/107 = 3.09	241100/1258 = 192

L CYSTINE-2 cm ΠΑΝΩ ΑΠΟ ΤΟ ΑΚΡΟΡΡΙΖΙΟ			
α/α φυτό	% βλαστικότητα	Νο υφών/msc	Μήκος υφής/msc
1	43/50 = 86	131/43 = 3.05	25500/131 = 195
2	44/50 = 88	128/44 = 2.91	24150/128 = 189
3	42/50 = 84	119/42 = 2.83	23450/119 = 197
4	40/50 = 80	110/40 = 2.75	20100/110 = 183
5	45/50 = 90	142/45 = 3.16	26400/142 = 186
6	43/50 = 86	139/43 = 3.23	25150/139 = 181
7	41/50 = 82	121/41 = 2.95	23450/121 = 194
8	40/50 = 80	127/40 = 3.18	24300/127 = 191
9	39/50 = 78	126/39 = 3.31	26250/126 = 208
10	42/50 = 84	125/42 = 2.98	24050/125 = 192
Μ.Ο.	419/500 = 83.8	1268/419 = 3.03	242800/1168 = 191

Η βερτισιλλίωση σε φυτά μελιτζάνας ψεκασμένα με L-cystine

Στους Πίνακες που ακολουθούν παρουσιάζεται η καταγραφή της έντασης/δριμύτητας της ασθένειας (αριθμός φύλλων με συμπτώματα προς το συνολικό αριθμό φύλλων του κάθε φυτού) της ασθένειας, που οφείλεται στον εδαφογενή μύκητα *Verticillium dahliae* σε φυτά μελιτζάνας, ποικιλίας Black Beauty.

Η καταγραφή της ασθένειας ξεκινά 22 ημέρες μετά τη μόλυνση των φυτών μελιτζάνας με μικροσκληρώτια του μύκητα (πρώτη φορά εμφάνιση των συμπτωμάτων της ασθένειας) και ολοκληρώνεται 50 ημέρες μετά τη μόλυνση. Για κάθε επέμβαση (φυτά ψεκασμένα με το αμινοξύ L-cystine και φυτά-μάρτυρας, αφέκαστα) χρησιμοποιήθηκαν 12 φυτά μελιτζάνας (24 συνολικά) και το πείραμα επαναλήφθηκε τρεις φορές συνολικά.

1^η ΕΠΑΝΑΛΗΨΗ

Μάρτυρας	Ημέρες μετά τη μόλυνση														
α/α φυτού	22	24	26	28	30	32	34	36	38	40	42	44	46	48	50
1	-	-	-	-	2/11	3/11	7/11	7/12	8/12	8/13	10/14	11/15	11/16	11/17	13/18
2	-	-	-	-	-	-	-	1/10	2/12	3/12	4/12	5/13	6/14	6/15	9/17
3	-	-	-	-	-	-	4/11	4/12	5/12	5/12	5/13	5/14	8/14	10/15	12/15
4	-	-	-	1/11	1/11	1/12	2/12	3/12	3/12	4/14	4/16	6/17	11/18	12/19	13/19
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5/15	6/16	10/16	11/17	13/18	15/18
6	3/8	5/9	6/9	6/9	7/9	7/10	8/11	8/11	9/13	9/14	10/14	10/15	11/16	12/17	14/19
7	-	-	-	-	-	-	1/14	4/14	5/14	5/14	6/16	7/16	7/16	7/18	8/20
8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4/13	6/13	11/14	13/15	13/15	15/16
9	1/10	3/11	3/11	3/12	3/12	3/12	4/12	4/12	4/13	5/13	6/14	6/15	8/17	8/17	9/18
10	-	-	-	-	-	3/12	6/14	7/14	8/14	8/15	9/15	10/15	11/17	11/17	13/18
11	-	-	-	-	-	1/12	4/12	7/13	10/13	11/13	12/14	14/16	14/17	15/18	16/18
12	-	-	-	-	-	-	-	-	2/13	2/13	5/14	6/14	7/15	9/15	9/15

L-cystine	Ημέρες μετά τη μόλυνση														
α/α φυτού	22	24	26	28	30	32	34	36	38	40	42	44	46	48	50
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1/10	2/12	2/14	4/16	6/16
2	-	-	2/10	2/10	3/11	3/11	3/11	4/11	4/13	5/13	5/13	5/14	6/15	7/17	8/18
3	-	-	-	-	-	-	-	2/13	4/14	4/14	4/14	4/14	5/17	5/17	9/18
4	-	-	-	-	-	-	3/10	4/10	4/11	4/12	4/14	4/15	5/15	5/17	6/17
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3/15	5/16	5/17	7/20
6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2/15	7/19
7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2/13	3/13	3/14	5/16	10/16
8	-	-	-	-	-	-	-	-	2/12	2/13	3/13	3/14	3/14	5/15	7/18
9	-	-	-	-	-	4/12	6/12	7/12	7/13	8/13	11/13	11/13	11/13	12/14	12/16
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1/14	4/15	4/15	4/17	6/18	7/18
11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3/13	3/13	3/13	6/15	6/17
12	-	-	-	-	-	-	-	-	1/12	4/12	10/13	11/13	12/13	13/15	14/17

2^η ΕΠΑΝΑΛΗΨΗ

Μάρτυρας α/α φυτού	Ημέρες μετά τη μόλυνση														
	22	24	26	28	30	32	34	36	38	40	42	44	46	48	50
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2/11	4/11	7/12	10/13	11/15	14/17
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3/15	4/15	6/16	8/18	10/18
3	-	-	-	-	-	-	2/11	2/11	2/12	4/12	4/13	4/13	5/13	6/14	7/16
4	-	-	-	-	-	-	-	-	2/14	2/14	2/16	4/16	6/17	7/18	9/19
5	-	-	-	-	-	-	-	-	2/11	3/12	3/14	5/15	5/15	7/16	7/16
6	-	-	-	-	-	-	-	-	3/11	5/13	7/13	8/13	10/14	12/15	13/16
7	-	-	-	-	-	-	3/12	4/12	5/12	7/12	8/14	9/14	10/16	11/16	12/17
8	-	-	-	-	-	-	-	-	2/12	3/13	3/15	4/14	4/14	6/15	6/16
9	-	-	-	-	-	-	-	-	3/12	5/13	6/15	9/16	12/17	15/18	17/20
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2/11	2/12	4/14	5/16	6/17	8/19
11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3/13	4/14	12/17	14/17	16/17
12	-	-	-	-	2/9	2/10	3/10	3/11	4/13	5/13	6/14	9/16	12/16	13/17	15/18

L-cystine α/α φυτού	Ημέρες μετά τη μόλυνση														
	22	24	26	28	30	32	34	36	38	40	42	44	46	48	50
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2/14	4/17	5/18	6/19	8/22	8/22
2	-	-	-	-	-	-	1/11	2/13	2/13	2/13	3/14	4/15	5/17	5/18	7/19
3	-	1/9	3/9	4/9	4/9	4/9	5/10	5/10	5/12	6/12	6/13	6/14	6/15	8/18	8/18
4	-	-	-	-	-	-	-	-	2/12	3/12	3/14	4/14	6/16	8/17	8/17
5	-	-	-	-	-	-	-	-	2/11	3/13	3/15	4/17	6/17	6/17	6/17
6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2/14	2/15	4/17	5/19	8/20
7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3/13	4/15	6/17	6/19	8/19
8	-	-	-	-	-	-	-	-	2/13	4/13	4/14	7/15	8/17	11/21	15/21
9	-	-	-	-	-	-	2/13	2/13	3/14	4/15	5/16	5/16	7/17	8/20	10/22
10	-	-	-	-	-	-	-	2/13	2/13	2/14	2/14	3/14	4/14	4/15	7/17
11	-	-	-	-	-	-	-	-	3/13	5/14	5/14	5/16	7/18	7/19	9/22
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4/15	6/17	7/18	7/18	9/21

3^η ΕΠΑΝΑΛΗΨΗ

Μάρτυρας α/α φυτού	Ημέρες μετά τη μόλυνση														
	22	24	26	28	30	32	34	36	38	40	42	44	46	48	50
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1/13	3/14	5/16	5/17	8/18	11/19
2	-	-	-	-	-	-	-	-	2/12	2/12	2/13	5/14	6/16	8/18	10/19
3	-	-	-	-	-	3/11	6/11	6/11	7/13	8/16	8/16	9/17	9/18	10/18	11/18
4	-	-	-	3/10	5/11	8/11	9/11	10/11	10/11	10/11	12/14	13/15	13/15	15/17	16/19
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1/10	2/12	4/14	5/14	7/17	9/18
6	-	-	-	-	-	-	1/14	1/14	1/15	2/16	8/16	10/16	12/17	14/18	16/19
7	-	-	3/10	5/10	5/10	8/11	10/11	10/12	10/13	12/14	12/14	13/16	14/17	15/19	17/19
8	-	-	-	-	-	-	-	2/12	3/13	3/13	4/14	4/14	6/16	8/18	8/18
9	-	-	-	-	-	-	4/13	4/15	4/16	4/18	5/18	6/18	8/18	9/19	11/21
10	-	-	-	-	-	3/11	6/12	7/12	8/12	8/13	8/14	8/14	9/16	9/17	10/18
11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3/14	6/16	9/17
12	-	-	-	-	-	-	1/12	2/12	2/13	2/15	4/16	6/16	10/19	12/21	14/21

L-cystine α/α φυτού	Ημέρες μετά τη μόλυνση														
	22	24	26	28	30	32	34	36	38	40	42	44	46	48	50
1	-	-	-	-	-	-	-	1/14	1/16	2/16	4/18	4/18	9/20	13/21	15/21
2	-	-	-	-	-	-	-	2/11	4/14	5/14	6/14	6/15	9/16	10/19	12/22
3	-	2/10	4/11	5/11	5/11	5/11	6/12	6/14	8/15	10/17	10/17	10/18	11/19	13/22	14/24
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2/15	3/17	4/17	7/18	7/19
5	-	-	-	-	-	2/12	3/14	4/14	4/15	4/15	4/15	4/15	6/18	6/19	6/23
6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2/15	3/17	3/18	6/18	7/22	8/23
7	-	-	-	2/12	5/12	6/13	6/13	7/13	7/14	7/14	8/15	8/18	9/19	9/21	9/23
8	-	-	-	-	-	-	2/13	4/13	7/13	8/15	12/15	13/16	15/18	16/20	17/21
9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3/15	5/15	7/18	9/19	11/20	12/20
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2/15	2/16	4/17	4/20	4/20	5/23
11	-	-	-	-	-	-	-	2/12	2/13	2/15	2/15	4/16	4/18	4/19	6/21
12	-	-	-	-	-	-	-	2/13	2/13	2/14	2/14	3/16	4/18	6/20	8/23

Έλεγχος αντιμυκητιακής δράσεως του L-cystine στο *Verticillium dahliae*

Στους Πίνακες που ακολουθούν δεικνύονται τα αποτελέσματα (διάμετρος σε mm της αποικίας του μύκητα *V. dahliae* στο θρεπτικό υλικό PDA σε τρυβλίο Petri) από την 3^η μέχρι και την 7^η ημέρα επώασης στους 22°C, σκότος. Στα δέκα τρυβλία είναι προστεθεί στο PDA το αμινοξύ L-cystine συγκέντρωσης 3 mM, ενώ άλλα δέκα τρυβλία με σκέτο PDA αποτέλεσαν το μάρτυρα. Σε κάθε τρυβλίο μετρήθηκαν τέσσερις διαφορετικοί διάμετροι της αποικίας του μύκητα και υπολογίζονταν ο μέσος όρος και η τυπική απόκλιση.

3η ημέρα επώασης										
A/A τρυβλίου	ΜΑΡΤΥΡΑΣ				M.O.	L-CYSTINE				M.O.
1	9	9	9	9	9	8	8	8.5	8	8.125
2	9	8.5	9	9	8.875	10	9.5	10	10	9.875
3	9.5	9	9	9	9.125	10	10	10	9	9.75
4	10	10	9.5	9	9.625	9	9	9	8	8.75
5	9	9.5	10	9	9.375	8	9.5	9	9	8.875
6	8	9	8	8.5	8.375	9.5	11	9.5	10	10
7	9.5	9.5	9	9	9.25	8	8	8	8	8
8	10	9.5	9	9.5	9.5	9	10	10	10	9.75
9	9	11	9.5	10	9.875	9	10	9	8.5	9.125
10	9	10	10	8.5	9.375	9	8.5	10	9	9.125
Μέσος Όρος					9.238					9.138
Τυπική Απόκλιση					0.423					0.713

4η ημέρα επώασης										
A/A τρυβλίου	ΜΑΡΤΥΡΑΣ				M.O.	L-CYSTINE				M.O.
1	13	13.5	12.5	13	13	10	10	11	10.5	10.375
2	12	12	12	12	12	12	13	13	13	12.75
3	12	12	12.5	13	12.375	14	14	14	13	13.75
4	13	13	13	13	13	12	12	12	12	12
5	13	12	13	12	12.5	12	13	13	12	12.5
6	12	12	12	13	12.25	13	15	13	13.5	13.625
7	13	13	12.5	13	12.875	12	12	11	12	11.75
8	13	13	12.5	13	12.875	12	13	13	13.5	12.875
9	13	15	13	14	13.75	13	13	13	13	13
10	12	13	13	12.5	12.625	11	11	12	11.5	11.375
Μέσος Όρος					12.725					12.400
Τυπική Απόκλιση					0.492					1.042

5η ημέρα επώασης										
A/A τρυβλίου	ΜΑΡΤΥΡΑΣ				M.O.	L-CYSTINE				M.O.
1	16	16	16	16	16	16	15	15	15.5	15.375
2	16	16	16	16	16	16	16	16	16.5	16.125
3	16.5	16	16	16	16.125	17	17	17	16.5	16.875
4	15.5	16	15	15.5	15.5	16	16	16	15.5	15.875
5	16	16	16	15.5	15.875	15	16.5	16	15.5	15.75
6	15	16	15	16	15.5	16	19	15.5	17	16.875
7	16	15.5	16	16	15.875	15	15	15	15	15
8	16	16	16	16	16	16	16	16.5	17	16.375
9	16.5	17.5	16.5	17	16.875	16	16	16	16.5	16.125
10	15.5	16	16	16	15.875	16	16	17	16	16.25
Μέσος Όρος					15.963					16.063
Τυπική Απόκλιση					0.382					0.596

6η ημέρα επώασης										
A/A τρυβλίου	ΜΑΡΤΥΡΑΣ				M.O.	L-CYSTINE				M.O.
1	19	18.5	19	18.5	18.75	18	18	18	18.5	18.175
2	19	18.5	19	19	18.875	19	20	19	20	19.5
3	19	19	19	19	19	20	20	20	19	19.75
4	18	18	17	17.5	17.625	19	18	18	18	18.25
5	19	19	19	19	19	18.5	20	19	19	19.125
6	18	18.5	18	19	18.375	20	22	20	20	20.5
7	19	19	19	19	19	18.5	19	18.5	19	18.75
8	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19
9	20	20	19.5	20	19.875	19	20	19	19.5	19.375
10	20	20	20	19	19.75	18.5	18	19	19	18.625
Μέσος Όρος					18.925					19.100
Τυπική Απόκλιση					0.635					0.719

7η ημέρα επώασης										
A/A τρυβλίου	ΜΑΡΤΥΡΑΣ				M.O.	L-CYSTINE				M.O.
1	22.5	21	21	21.5	21.5	22	22	22	22.5	22.125
2	22	22	22	22	22	22	22	22	22.5	22.125
3	22	22	22	22	22	23	22	22	21	22
4	20	19.5	19	19	19.375	22	22	22	21	21.75
5	22	22	22	22	22	21	23	22	22	22
6	21.5	21	20	22	21.125	22	25	23	23	23.25
7	22	22	22	23	22.25	21	22	21	21	21.25
8	22	21.5	21.5	22	21.75	23	23	22	22.5	22.625
9	23.5	24	22	23	23.125	21.5	23	22	22.5	22.5
10	23	23	22	22	22.5	22	21	23	22	22
Μέσος Όρος					21.763					22.163
Τυπική Απόκλιση					0.999					0.537