



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος Βιοχημείας και
Βιοτεχνολογίας
ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ – ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

Παπαζλατάνη Χριστίνα

**ΧΑΡΤΟΓΡΑΦΗΣΗ ΤΩΝ ΚΥΡΙΟΤΕΡΩΝ
ΕΔΑΦΟΓΕΝΩΝ ΦΥΤΟΠΑΘΟΓΟΝΩΝ
ΜΥΚΗΤΩΝ ΣΕ ΕΔΑΦΗ ΘΕΡΜΟΚΗΠΙΑΚΩΝ
ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ ΑΠΟ ΚΡΗΤΗ,
ΠΕΛΟΠΟΝΝΗΣΟ ΚΑΙ ΔΥΤΙΚΗ ΕΛΛΑΔΑ**

Λάρισα 2017

**Χαρτογράφηση των κυριότερων εδαφογενών
φυτοπαθογόνων μυκήτων σε εδάφη θερμοκηπιακών
καλλιεργειών από Κρήτη, Πελοπόννησο και Δυτική
Ελλάδα**

**Mapping of the main soilborne plant pathogenic fungi
in soils from protected crops from Crete, Peloponnese
and Western Greece**

Επιβλέπων καθηγητής: Καρούζας Δημήτριος, Αναπληρωτής Καθηγητής

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

Καρούζας Δημήτριος, Αναπληρωτής Καθηγητής Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας & Βιοτεχνολογίας, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Παπαδοπούλου Καλλιόπη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Φυτών, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Μόσιαλος Δημήτριος, Επίκουρος Καθηγητής Βιοτεχνολογίας Μικροβίων, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Ευχαριστίες

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Καρπούζα Δημήτριο, για την επιστημονική καθοδήγηση, τη βοήθεια και την υπομονή του καθ' όλη τη διάρκεια των πειραματικών διαδικασιών και της συγγραφής της παρούσας διπλωματικής εργασίας.

Ευχαριστώ την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κ. Παπαδοπούλου Καλλιόπη και τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Μόσιαλο Δημήτριο για τη συμμετοχή τους στη τριμελή επιτροπή.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καρά Παναγιώτη για την τεράστια υπομονή, την καθοδήγηση και βοήθεια καθόλη τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας.

Ευχαριστώ επίσης όλα τα μέλη του εργαστήριου για την καλή συνεργασία και την υπομονή τους.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω και να αφιερώσω την συγκεκριμένη μεταπτυχιακή διατριβή στην οικογένεια μου και σε όλους τους ανθρώπους που ήταν δίπλα μου και με στήριζαν σε όλη αυτή τη δύσκολη περίοδο.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ.....	4
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	6
ABSTRACT.....	7
1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	8
1.1 Φυτοπαθογόνοι μύκητες εδάφους.....	8
1.1.1 Χαρακτηριστικά παθογένειας.....	9
1.2 Φυτοπαθογόνα που προσβάλλουν καλλιέργειες κηπευτικών υπό κάλυψη στις υπό εξέταση περιοχές.....	9
1.3 Φυτοπαθογόνοι μύκητες του εδάφους που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία 11	
1.3.1 <i>Verticillium dahliae</i> (+ <i>V.longisporum</i>).....	11
1.3.2 <i>Fusarium oxysporum</i>	13
1.3.3 <i>Rhizoctonia solani</i>	15
1.3.4 <i>Pythium ultimum</i>	17
1.3.5 <i>Sclerotiniasclerotiorum</i>	19
1.3.6 <i>Pyrenochaeta lycopersici</i> τύπος I και τύπος II.....	20
1.4 Τεχνικές ανίχνευσης και καταμέτρησης των εδαφογενών φυτοπαθογόνων μυκήτων στο έδαφος.....	23
1.4.1 Παραδοσιακές τεχνικές.....	23
1.4.2 Μοριακές τεχνικές.....	24
1.5 Στόχος.....	26
2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	27
2.1 Συλλογή δειγμάτων.....	27
2.2 Υπολογισμός περιεχόμενης υγρασίας εδαφών.....	28
2.2.1 Υλικά και όργανα.....	28
2.2.2 Πειραματικό Μέρος.....	28
2.3 Εκχύλιση του ολικού DNA από τα δείγματα εδάφους.....	28
2.3.1 Θεωρητικό Μέρος.....	28
2.3.2 Πειραματικό Μέρος.....	29
2.4 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αραρόζη.....	30
2.4.1 Θεωρητικό Μέρος.....	30
2.4.2 Υλικά και αντιδραστήρια.....	30
2.4.3 Πειραματικό Μέρος.....	30

2.5	Εκτίμηση του πληθυσμού εδαφογενών φυτοπαθογόνων μυκήτων στο έδαφος με PCR πραγματικού χρόνου	31
2.5.1	Θεωρητικό Μέρος	31
2.5.2	Πειραματικό Μέρος	32
2.6	Κατασκευή πρότυπης καμπύλης αναφοράς.....	38
3	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	40
3.1	Εκχύλιση ολικού DNA από τα δείγματα εδαφών.....	40
3.2	Εκτίμηση του πληθυσμού των κυριότερων φυτοπαθογόνων εδαφογενών μυκήτων 40	
3.2.1	<i>Verticillium dahliae</i>	40
3.2.2	<i>Fusarium oxysporum</i>	42
3.2.3	<i>Rhizoctonia solani</i>	47
3.2.4	<i>Pythium ultimum</i>	52
3.2.5	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	58
3.2.6	<i>Pyrenochaeta lycopersici</i> τύπος I.....	62
3.2.7	<i>Pyrenochaeta lycopersici</i> τύπος II.....	66
3.3	Εκτίμηση του πληθυσμού των φυτοπαθογόνων μυκήτων ανά περιοχή	72
3.3.1	Πρέβεζα	72
3.3.2	Λασιίθι	72
3.3.3	Κυπαρισσία.....	73
3.3.4	Ιεράπετρα	74
3.3.5	Τυμπάκι	74
3.4	Συσχέτιση της ποικιλότητας των εδαφογενών φυτοπαθογόνων μυκήτων και της καλλιέργειας του αγρού.....	75
4	ΣΥΖΗΤΗΣΗ	80
4.1	Μελλοντικές μελέτες.....	82
5	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	83
	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1.....	93
	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 2.....	96

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι καλλιέργειες υπό κάλυψη στην Ελλάδα αποτελούν ένα σημαντικό κομμάτι του πρωτογενούς τομέα, το οποίο πλήττεται από διάφορους φυτοπαθογόνους μύκητες. Οι φυτοπαθογόνοι μύκητες του εδάφους μπορούν να μειώσουν σημαντικά την απόδοση των καλλιεργειών και να καταλήξουν σε τεράστιες οικονομικές απώλειες. Συνήθως προσβάλλουν το ριζικό σύστημα και τη βάση του μίσχου αλλά, σε μερικές περιπτώσεις, μπορούν να προσβάλλουν και τα ανώτερα τμήματα του φυτού μέσω διασποράς των σπορίων τους με τον αέρα ή μέσω μεταφοράς διαμέσου των αγγείων του φυτού-ξενιστή.

Στόχος της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η εκτίμηση της αφθονίας των σημαντικότερων φυτοπαθογόνων μυκήτων σε 75 δείγματα εδάφους από θερμοκηπιακές καλλιέργειες διαφόρων οικονομικά σημαντικών οπωροκηπευτικών από 3 περιοχές της Ελλάδας. Τα δείγματα εδάφους προέρχονταν κυρίως από καλλιέργειες τομάτας, αλλά και από καλλιέργειες αγγουριού, πιπεριάς, μελιτζάνας, πεπονιού και μια καλλιέργεια φράουλας. Οι συγκεκριμένες καλλιέργειες εδρεύονται στον νομό της Πρέβεζας στην Δυτική Ελλάδα, στην περιοχή της Κυπαρισσίας στην Πελοπόννησο και στο νησί της Κρήτης, στις περιοχές του Τυμπακίου, της Ιεράπετρας και γενικότερα του Λασιθίου. Αναλυτικότερα, έγινε εφαρμογή της αντίδρασης PCRπραγματικού χρόνου στα δείγματα DNA που εκχυλίστηκαν από τα παραπάνω εδαφικά δείγματα. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές, εξειδικευμένοι για τον *Verticillium dahliae*, τον *Fusarium oxysporum*, τον *Rhizoctonia solani*, τον *Pythium ultimum*, τον *Sclerotinia sclerotiorum* και τους *Pyrenochaeta lycopersici* τύπους I και II.

Όλοι οι μύκητες, λίγο ή πολύ, εντοπίστηκαν στους αγρούς. Εξαίρεση αποτέλεσε ο *V. dahliae* ο οποίος δεν ανιχνεύτηκε σε κανένα από τα αναλυθέντα δείγματα. Παρομοίως, ο *S. Sclerotiorum* εντοπίστηκε μόνο σε 3 εδαφικά δείγματα. Οι *F. oxysporum*, *R. solani* και *Pultimum* είχαν την μεγαλύτερη αφθονία και ανιχνεύτηκαν στα περισσότερα εδαφικά δείγματα. Και οι 2 τύποι του *Pyrenochaeta lycopersici* εντοπίστηκαν σε διάφορα εδάφη με τον τύπο II να κυριαρχεί έναντι του τύπου I στην πλειοψηφία των εδαφών που μελετήθηκαν.

Επίσης παρατηρήθηκε ότι στα δείγματα από το νησί της Κρήτης ανιχνεύθηκε μικρότερη ποικιλία και αφθονία των υπο μελέτη φυτοπαθογόνων μυκήτων σε σύγκριση με τις υπόλοιπες περιοχές της Ελλάδος και σε πολλά εδαφικά δείγματα, δεν ανιχνεύθηκε κανένας από τους υπο μελέτη φυτοπαθογόνους μύκητες. Αυτό είναι αναμενόμενο δεδομένης της μεγάλης εμπειρίας των καλλιεργητών στην καλλιέργεια οπωροκηπευτικών υπο κάλυψη και στην αντιμετώπιση των φυτοπαθογόνων οργανισμών που τις προσβάλλουν. Από την άλλη, τα εδαφικά δείγματα από την περιοχή της Πρέβεζας εμφάνισαν υψηλή αφθονία και ποικιλία παθογόνων. Παρόμοια, αν και σε μικρότερο βαθμό, ήταν και η εικόνα των εδαφικών δειγμάτων από την Κυπαρισσία όπου σε κάθε δείγμα φαίνονταν να υπάρχει μόλυνση από, κατά μέσο όρο, δύο φυτοπαθογόνους μύκητες. Τέλος, παρατηρήθηκε ότι οι καλλιέργειες τομάτας ήταν περισσότερο επιβαρυνμένες με παθογόνους μύκητες σε σύγκριση με άλλες καλλιέργειες προφανώς λόγω της επιδεκτικότητας του συγκεκριμένου φυτού σε φυτοπαθολογικές ασθένειες.

ABSTRACT

The undercover horticulture in Greece plays a major role on the primary sector, but is threatened by various phytopathogenic fungi. The soilborne fungi are able to significantly reduce the yield and result in huge economic losses. They, usually infect the root system of the plants as well as the stem base. Less often, they attack the upper part of the plants through dispersion of their spores with the air or by colonizing the vascular system.

The aim of the present work was to map the main soilborne phytopathogenic fungi in 75 soil samples from protected cultures of various economically important vegetables from 3 different regions of Greece. The soil samples originated from tomato, cucumber, pepper, eggplant, melon and a strawberry cultivation. These undercover cultivations are based in the Preveza county in Western Greece, in the Kyparissia region in Peloponnese and in the island of Crete, at the provinces of Tympaki, Ierapetra and the Lasithi county in general. In more detail, the technique of real time PCR was put into practice in DNA samples which were extracted from the aforementioned soil samples. For this purpose, the primers used were specific for the plant pathogens *Verticillium dahliae*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani*, *Pythium ultimum*, *Sclerotinia sclerotiorum* and *Pyrenochaeta lycopersici* type I and II.

All the phytopathogenic fungi under study were detected at the soil samples. The only exception was *V. dahliae* whose population was below the detection limit of the method in all of the analysed samples. Similarly, *S. sclerotiorum* was detected in just 3 soil samples. *F. oxysporum*, *R. solani* and *P. ultimum* had the greatest abundance and they were detected at the majority of samples. Concerning *Pyrenochaeta lycopersici*, both types were detected in plenty soil samples with type II prevailing against type I in the majority of the soil samples.

Moreover, it became clear, that the samples from the island of Crete had the smallest abundance and variety of the pathogenic fungi under study, comparing to the rest of the studied regions, and in many soil samples the pathogenic fungi were below the detection limit of the method. That was expected because of the high experience of the growers at cultivating vegetables undercover and dealing with the phytopathogenic organisms. On the other hand, soil samples from the Preveza county exhibited high abundance and variety of pathogens. Similar, though in a smaller degree, were the observations from the soil samples originated from the Kyparissia area where each sample was infected by a mean of 2 phytopathogenic fungi. Lastly, at most of the times, all of the pathogenic fungi under study were observed in the tomato cultivations, comparing with the rest of the cultures. This is happening because the tomato plants are the most susceptible to phytopathogenic diseases.

1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Φυτοπαθογόνοι μύκητες εδάφους

Η κατανόηση του εδάφους είναι ένα επιτακτικό ζήτημα για τη δημιουργία υγιών οικοσυστημάτων και αποδοτικότερων καλλιεργειών (Dance 2008). Οι ζωντανοί οργανισμοί, ζωικοί και φυτικοί, απαρτίζουν μια σημαντική συνιστώσα του εδάφους ("Scope and Importance of Soil Microbiology") με τους μικροοργανισμούς να συνιστούν μόνο ένα μικρό ποσοστό (<1%) της ολικής μάζας του εδάφους. Παρόλα αυτά παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και τον θάνατο των φυτών στην επιφάνεια της γης ("Scope and Importance of Soil Microbiology") καθώς συμμετέχουν σε διεργασίες όπως η ανακύκλωση της οργανικής ύλης και η αποσάθρωση πετρωμάτων και άλλων υλικών του εδάφους (Emmerling et al. 2002). Η ριζόσφαιρα είναι μια δραστήρια περιοχή του εδάφους η οποία αποτελεί εκείνο το τμήμα όπου λαμβάνουν χώρα σημαντικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ φυτού-μικροοργανισμών και των μικροοργανισμών μεταξύ τους (Raaijmakers et al. 2008). Παρόλο που τα περισσότερα φυτοπαθογόνα εδάφους έχουν τη δυνατότητα να αναπτύσσονται και να επιβιώνουν στον κύριο όγκο του εδάφους, η ριζόσφαιρα αποτελεί περιοχή έλξης καθώς είναι πλούσια σε θρεπτικά και αυξητικούς παράγοντες και αποτελεί το σημείο όπου το παθογόνο εγκαθιδρύει την παρασιτική του σχέση με το φυτό (Raaijmakers et al., 2008).

Υπάρχουν 4 κύριες ομάδες φυτοπαθογόνων εδάφους: οι μύκητες, οι νηματώδεις, τα βακτήρια και οι ιοί, με τους μύκητες να αποτελούν τα πιο σημαντικά εδαφογενή φυτοπαθογόνα (Raaijmakers et al. 2008) διότι είναι τα πιο ευρέως κατανομημένα και τα πιο καταστροφικά παράσιτα των φυτών (Ingold and Hudson 1993). Υπάρχουν χιλιάδες είδη φυτοπαθογόνων μυκήτων τα οποία συλλογικά είναι υπεύθυνα για το 70% όλων των γνωστών ασθενειών των φυτών (Carris et al., 2012). Οι εν λόγω οργανισμοί χαρακτηρίζονται ως φυτοπαθογόνοι γιατί αποτελούν παράσιτα των φυτών και προκαλούν ασθένεια η οποία χαρακτηρίζεται από συγκεκριμένα συμπτώματα (Carris et al., 2012). Ο παρασιτισμός είναι ένας τρόπος ζωής όπου οι μύκητες καλύπτουν τις θρεπτικές τους ανάγκες παρασιτώντας και προσβάλλοντας το ζωντανό φυτό (Ingold and Hudson 1993). Αυτή η σχέση είναι επιβλαβής για το φυτό και συνήθως καταλήγει στον θάνατό του. Οι παθογόνοι μύκητες χωρίζονται σε 2 ομάδες: τους βιοτροφικούς και νεκροτροφικούς (Carris et al., 2012). Οι βιοτροφικοί αποκομίζουν τα θρεπτικά από ζωντανούς ιστούς του ξενιστή και συνήθως έχουν ένα στενό πεδίο ξενιστών, δηλαδή είναι εξειδικευμένοι σε έναν περιορισμένο αριθμό φυτών-ξενιστών. Από την άλλη οι νεκροτροφικοί φυτοπαθογόνοι μύκητες λαμβάνουν τα θρεπτικά στοιχεία από νεκρό φυτικό ιστό, τον οποίο συνήθως σκοτώνουν οι ίδιοι μέσω της παραγωγής τοξινών ή ενζύμων. Οι νεκροτροφικοί μύκητες μπορεί να είναι είτε γενικευμένοι, με τη δυνατότητα να αναπτύσσονται σε ένα μεγάλο εύρος ξενιστών, είτε εξειδικευμένοι σε ένα περιορισμένο αριθμό ξενιστών. (Carris et al., 2012)

Οι μύκητες είναι μια σύνθετη ομάδα ευκαρυωτικών οργανισμών. Ο μοναδικός τρόπος ανάπτυξης του μυκήλιου τους σε συνδυασμό με την αξιοποίηση παραφυλετικών μεθόδων αναπαραγωγής αποτελούν σημαντικά εργαλεία που τους επιτρέπουν την γρήγορη απόκριση στις επιλεκτικές πιέσεις (Reeleder 2003). Η ανάπτυξη της γεωργίας στην σύγχρονη εποχή είναι πιθανό να έχει μεταβάλει τις επιλεκτικές πιέσεις στα καλλιεργούμενα εδάφη, σε τέτοιο βαθμό που να επάγει την επιτυχή επιλογή πιο επιθετικών, και πιθανόν νέων, παθογόνων (Brasier 1995).

1.1.1 Χαρακτηριστικά παθογένειας

Τα φυτοπαθογόνα εδάφους μπορούν να μειώσουν σημαντικά την απόδοση των καλλιεργειών. Συνήθως επηρεάζουν το ριζικό σύστημα των φυτών ή την βάση του μίσχου ενώ, σε μερικές περιπτώσεις μπορούν να προσβάλλουν και τα ανώτερα τμήματα του φυτού μέσω διασποράς των σπορίων τους με τον αέρα ή μέσω μεταφοράς διαμέσου των αγγείων του φυτού-ξενιστή. Έτσι μπορούν να προκαλέσουν μείωση της λήψης νερού και θρεπτικών από το ριζικό σύστημα (νέκρωση των ριζών) και μείωση της μεταφοράς των θρεπτικών και του νερού στα ανώτερα τμήματα του φυτού (προσβολή των αγγείων). Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα επιδράσεις στην ποιότητα των καρπών. Οι περισσότερες ασθένειες που προκαλούνται από παθογόνα εδάφους είναι δύσκολο να προβλεφθούν, να ανιχνευθούν ή/και να διαγνωστούν γιατί συνήθως επιβιώνουν στο έδαφος για πολλά χρόνια και κάθε καλλιέργεια μπορεί να είναι ευάλωτη σε πολλά και διάφορα είδη. Οι ταυτόχρονες επιμολύνσεις από πολλαπλά παθογόνα εδάφους καταλήγει σε ένα συνδυασμό ασθενειών οι οποίες μπορούν να καταστρέψουν τη παραγωγή.

1.2 Φυτοπαθογόνα που προσβάλλουν καλλιέργειες κηπευτικών υπό κάλυψη στις υπό εξέταση περιοχές

Οι χώρες της λεκάνης της Μεσογείου χαρακτηρίζονται από ήπιους χειμώνες με συνέπεια να θεωρούνται προνομιακές από άποψη κλίματος για εκτός εποχής παραγωγή νωπών κηπευτικών με σχετικά χαμηλό κόστος παραγωγής (Σάββας 2009). Η Ελλάδα δεν αποτελεί εξαίρεση σε αυτόν τον κανόνα καθώς η εκτός εποχής παραγωγή κηπευτικών σε θερμοκήπια αποτελεί μία από τις σημαντικότερες γεωργικές της δραστηριότητες. Αναλυτικότερα, τα κηπευτικά υπό κάλυψη αντιστοιχούν στο 7.24% της συνολικής καλλιεργούμενης κηπευτικής γης στην Ελλάδα (ΕΛΣΤΑΤ - “ΕΤΗΣΙΑ ΓΕΩΡΓΙΚΗ ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΕΡΕΥΝΑ, ΕΤΟΥΣ 2014”). Παρά τη μικρή τους έκταση, η απόδοση των υπό κάλυψη καλλιεργειών υπερβαίνει αυτή των υπαίθριων καλλιεργειών. Για παράδειγμα η απόδοση ανά στρέμμα της καλλιέργειας της ντομάτας στην ύπαιθρο ήταν 3,02 τόνοι για το 2014 ενώ στο θερμοκήπιο ήταν 8,28 τόνοι. (ΕΛΣΤΑΤ - “3α. Λαχανικά. Εκτάσεις Και Παραγωγή Κατά Περιφέρεια Και Περιφερειακή Ενότητα, 2014”). Στον παρακάτω πίνακα αναφέρονται ενδεικτικά οι αποδόσεις των πιο συχών υπό κάλυψη καλλιεργειών συγκριτικά με τις καλλιέργειες υπαίθρου.

Πίνακας 1 Ενδεικτικά κηπευτικά και οι αποδόσεις ανά στρέμμα της καλλιέργειάς τους σε θερμοκηπιακές μονάδες και στην ύπαιθρο. Πηγή: Λαχανικά. Εκτάσεις Και Παραγωγή Κατά Περιφέρεια Και Περιφερειακή Ενότητα, 2014, ΕΛΣΤΑΤ.

Τόνοι/Στρέμμα	Θερμοκηπιακές καλλιέργειες	Καλλιέργειες Υπαίθρου
Ντομάτα	3.02	8.28
Αγγούρι	10.05	3.15
Μελιτζάνα	5.86	2.23
Πιπεριά	6.48	1.91

Επομένως οι υπό κάλυψη καλλιέργειες κηπευτικών στην Ελλάδα είναι εξέχουσας σημασίας και η διασφάλιση της παραγωγής τους απαραίτητη.

Τα κηπευτικά της Κρήτης καλλιεργούνται κυρίως στο νότιο τμήμα του νησιού (Ιεράπετρα, Τυμπάκι) διότι η υψηλή ηλιοφάνεια καθ'όλη τη διάρκεια του έτους αναδεικνύει τα χαρακτηριστικά των παραγόμενων λαχανικών (Γαλαζούλα 2015). Η περιοχή της Ιεράπετρας ήταν από τις πρώτες περιοχές της Ελλάδας όπου εγκαταστάθηκαν οι καλλιέργειες θερμοκηπίου ("DEVELOPMENTS IN THE GREEK HORTICULTURAL SECTOR" 2012). Τα κηπευτικά που καλλιεργούνται κατά κόρον σε αυτά είναι η ντομάτα, το αγγούρι και η πιπεριά (Sigmis 2009) και σε μικρότερο βαθμό μελιτζάνα, κολοκύθι και πιπεριά ("ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΔΗΜΟΥ ΙΕΡΑΠΕΤΡΑΣ 2014-2019 Α' ΣΤΑΔΙΟ: ΣΤΡΑΤΗΓΙΚΟΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ" 2015). Όσον αφορά τους φυτοπαθογόνους μύκητες που απειλούν τις καλλιέργειες κύριος εχθρός είναι μύκητες του είδους *Fusarium oxysporum* που προσβάλλει κυρίως καλλιέργειες τομάτας (Έκθεση Εργασιών Μπενακείου Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου 2015 2016) αλλά και αγγουριού (Τσιβελίκας 2010). Άλλος σημαντικός φυτοπαθογόνος μύκητας είναι ο *Verticillium dahliae* (Ligoixakis 2000).

Η Πελοπόννησος είναι μια σημαντική αγροτική περιοχή της Ελλάδας όπου λαμβάνουν χώρα εντατικές καλλιέργειες υπό κάλυψη ("Sustainable Use of Chemical Fumigants for the Control of Soil-Borne Pathogens (SustUseFumigants) LIFE08 ENV/IT/000432 - DELIVERABLE 3" 2010), ("DEVELOPMENTS IN THE GREEK HORTICULTURAL SECTOR" 2012) και αποτελεί την Τρίτη περιοχή της Ελλάδος όπου μεγάλο μέρος της υπό κάλυψη καλλιέργειας λαμβάνει χώρα σε μη θερμαινόμενα θερμοκήπια (Sigmis 2009). Πιο συγκεκριμένα, στη περιοχή της Κυπαρισσίας, καλλιεργούνται υπό κάλυψη κυρίως τομάτες και αγγούρια και σε μικρότερο βαθμό κολοκυθάκι, μελιτζάνα, πιπεριά και φασολιά ("Gaiapedia - Φυτά Που Ευδοκούν Στην Περιοχή - Νομός Μεσσηνίας" 2017). Οι συχνότερες ασθένειες που καλούνται να αντιμετωπίσουν οι καλλιεργητές αυτής της περιοχής προκαλούνται από τους παθογόνους οργανισμούς *Fusarium oxysporum*, *Verticillium dahliae* και μύκητες του γένους *Sclerotinia* ("Sustainable Use of Chemical Fumigants for the Control of Soil-Borne Pathogens (SustUse Fumigants) LIFE08 ENV/IT/000432 - DELIVERABLE 3" 2010)

Η περιοχή της Πρέβεζας, μετά την Κρήτη και την Πελοπόννησο, συγκροτεί μια ακόμη περιοχή της Ελλάδας όπου κυριαρχούν οι καλλιέργειες υπό κάλυψη και, ειδικότερα, οι στεγασμένοι χώροι με χαμηλές πλαστικές σήραγγες (Sigmis 2009). Σε ποσοστό 90% καλλιεργείται τομάτα ενώ, σε μικρότερο βαθμό, καλλιεργούνται και αγγούρι, φασολάκι, κολοκυθάκι, μαρούλια και πιπεριές ("ΑΝΘΡΩΠΙΝΟ ΔΥΝΑΜΙΚΟ ΣΤΟΝ ΠΡΩΤΟΓΕΝΗ ΤΟΜΕΑ, ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ ΚΑΙ ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ ΚΑΤΑΡΤΙΣΗ" 2000). Οι φυτοπαθογόνοι μύκητες που οι καλλιεργητές καλούνται να αντιμετωπίσουν ανήκουν κυρίως στα είδη *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea* και *Rhizoctonia solani* (Έκθεση Εργασιών Μπενακείου Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου 2015 2016).

Όπως καταλαβαίνουμε από τα παραπάνω η θερμοκηπιακή καλλιέργεια στην Ελλάδα είναι ένα δυναμικό κομμάτι του πρωτογενούς τομέα η οποία πλήττεται από διάφορους φυτοπαθογόνους μύκητες. Παρά την προσπάθεια των καλλιεργητών για την αντιμετώπισή τους νέα παθογόνα κάνουν συνεχώς την εμφάνισή τους στα Ελληνικά εδάφη (Kalomoira Elena et al, 2008).

1.3 Φυτοπαθογόνοι μύκητες του εδάφους που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία

Στην παρούσα διπλωματική εργασία επιλέχθηκαν να μελετηθούν συγκεκριμένοι φυτοπαθογόνοι μύκητες σύμφωνα με την επικινδυνότητα και την συχνότητα εμφάνισης στις καλλιέργειες υπό κάλυψη στον Ελληνικό χώρο.

1.3.1 *Verticillium dahliae* (+*V. longisporum*)



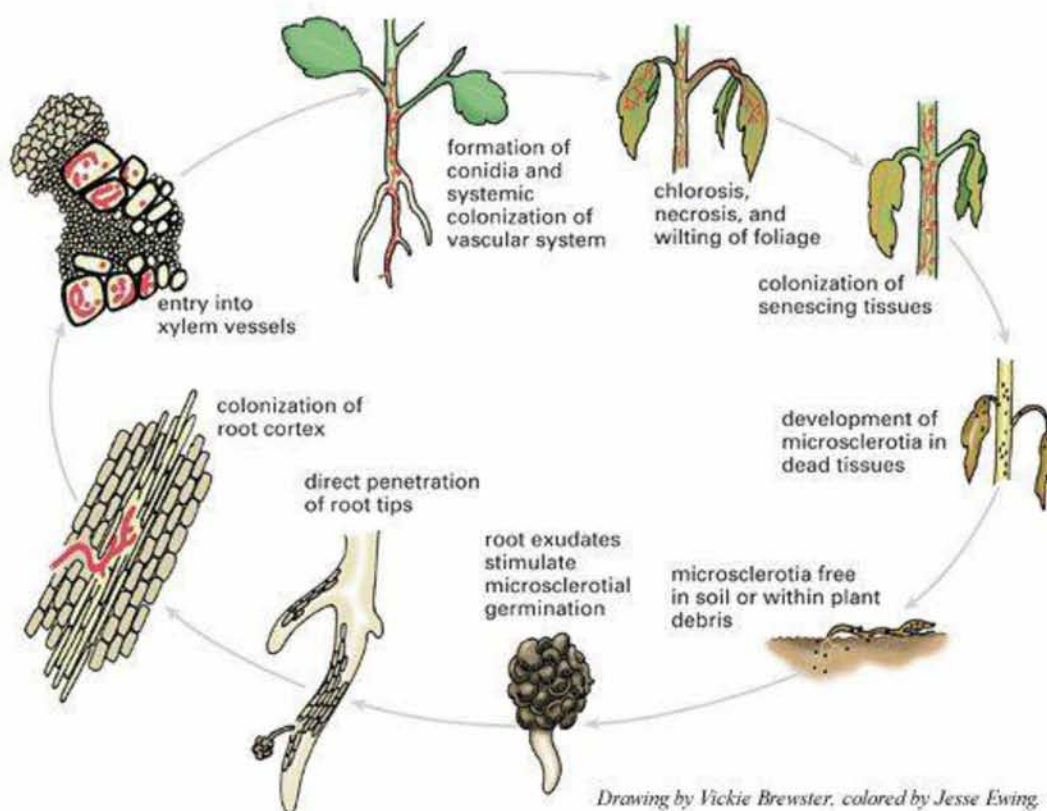
Εικόνα 1 Βερτισιλλίωση σε φυτό μελιτζάνας. Πηγή: Ελληνική Φυτοπαθολογική Εταιρεία

Το γένος *Verticillium* περιλαμβάνει πολλά φυτοπαθογόνα είδη που προκαλούν αδρομυκώσεις στα φυτά (Klosterman et al. 2009). Οι ασθένειες των αδρομυκώσεων είναι καταστροφικές ασθένειες των φυτών οι οποίες είναι αποτέλεσμα της παρουσίας και δραστηριότητας του παθογόνου στα αγγεία του φυτού (Παντελίδης

2009). Το πιο γνωστό είδος είναι το *V. dahliae* το οποίο έχει την ικανότητα να προσβάλλει και να επιμολύνει τους σπόρους άνω των 200 οικονομικών σημαντικών φυτών σε ολόκληρο τον κόσμο (Pegg and Brady 2002), όπως το βαμβάκι, η ελιά, η πατάτα, η φράουλα και η τομάτα (Inderbitzin et al. 2014) καθώς μέλη της φυσικής χλωρίδας και των ζιζανίων (Lazarovits et al. 2010).

Ο κύκλος ζωής του μύκητα μπορεί να χωριστεί σε 3 φάσεις: τη ληθαργική, τη παρασιτική και τη σαπροφυτική (Fradin and Thomma 2006). Η ληθαργική φάση λαμβάνει χώρα απουσία ξενιστή, όπου ο *V. dahliae* εντοπίζεται κατανεμημένος στο έδαφος ή ενσωματωμένος σε φυτικά υπολείμματα με την μορφή των μικροσκληρωτίων (Klosterman et al. 2009). Τα μικροσκληρώτια είναι ανθεκτικές μορφές του *V. dahliae* οι οποίες μπορούν να παραμείνουν βιώσιμες ακόμη και 14 χρόνια χωρίς την παρουσία ξενιστή (Hu et al. 2013, Shang et al. 2013, Lazarovits et al. 2010). Δομούνται από μάζες μελανών υφών και αποτελούν τους πρωταρχικούς μολυσματικούς παράγοντες για την ανάπτυξη της νόσου. Τα μικροσκληρώτια βλασταίνουν όταν βρεθούν στο πλούσιο σε θρεπτικά περιβάλλον της ριζόσφαιρας (EFSA Panel on Plant Health (PLH) 2014). Εκεί, αναπτύσσονται υφές από το μικροσκληρώτιο προς τη ρίζα, την οποία τελικά προσβάλλουν διαμέσου των ριζικών τριχιδίων (Klosterman et al. 2009). Στη συνέχεια εισχωρούν στη μεριστωματική ζώνη και στη ζώνη επιμήκυνσης της ρίζας, από όπου εισβάλλουν στον φλοιό (Klosterman et al. 2009) (Zhang et al. 2013). Πλέον έχει αρχίσει η παρασιτική φάση η οποία κορυφώνεται με είσοδο του μύκητα στα αγγεία του ξυλώματος και σχηματισμό των κονιδίων (EFSA Panel on Plant Health (PLH) 2014; Berlinger and Powelson 2000). Τα κονίδια, μόλις σχηματιστούν μεταφέρονται στο υπόλοιπο φυτό μέσω των αγγείων του ξηλώματος (Klosterman et al. 2009). Πολύ συχνά εγκλωβίζονται μεταξύ των μεμβρανών και εκεί βλασταίνουν,

διαπερνούν τις μεμβράνες προς το διπλανό αγγείο και παράγουν περισσότερα κονίδια επαναλαμβάνοντας την διαδικασία (Zhang et al. 2013, Jimenez-Diaz et al. 2012). Η συσσώρευση των μυκητιακών δομών και των συσσωματωμάτων λόγω της άμυνας του φυτού, οδηγούν σε απόφραξη του ξηλώματος και κατά συνέπεια παρεμπόδιση της μεταφοράς νερού στο ανώτερο τμήμα του φυτού (Fradin et al. 2006, Jimenez-Diaz et al. 2012, Berlangier et al. 2000). Έτσι τα στερημένα από νερό φύλλα εμφανίζουν σημάδια χλώρωσης, ενώ σε συνέχεια της σαπροφυτικής φάσης τα αγγεία του ξυλώματος παραμορφώνονται εντελώς, καταστρέφονται και το φυτό πεθαίνει (EFSA, 2014). Τέλος, τα μικροσκληρώτια ξαναδημιουργούνται στον νεκρό ιστό και απελευθερώνονται στο έδαφος μετά την αποσύνθεση του φυτού.



Εικόνα 2 Κύκλος ζωής του *V. dahliae*(Berlangier and Powelson 2000)

Η αντιμετώπιση των βερτισιλιώσεων που προκαλούνται από τον *V. dahliae* βασίζονται κυρίως στην μείωση του αρχικού εμβολίου (Klosterman et al. 2009). Ο καπνισμός του εδάφους με βρωμιούχο μεθύλιο σε συνδυασμό με χλωροπικρίνη (chloropicrin) αποτελούσε ένα απαραίτητο εργαλείο για την επίτευξη αυτού του στόχου (Duniway 2002). Όμως έρευνες απέδειξαν ότι το βρωμιούχο μεθύλιο αποτελεί κύριο παράγοντα της μείωσης του όζοντος της στρατόσφαιρας οπότε από το 1992 υποβλήθηκε σε σταδιακή κατάργηση σύμφωνα με τις απαιτήσεις του πρωτόκολλου του Μόντρεαλ για ουσίες οι οποίες μειώνουν το στρώμα του όζοντος (Ozone Secretariat, 2017). Στο πλαίσιο της ανεύρεσης εναλλακτικών γεωργικών φαρμάκων που θα μπορούσαν να καλύψουν το κενό του βρωμιούχου μεθυλίου δοκιμάστηκαν διάφορα καπνιστικά γεωργικά φάρμακα (π.χ. Methamsodium), ο βιολογικός υποκαπνισμός (Biofumigation), που περιλαμβάνει την ενσωμάτωση στο έδαφος βιομάζας φυτών της οικογένειας Brassicaceae τα οποία περιέχουν υψηλές συγκεντρώσεις γλυκοσινολικών οξέων (Omirou et al. 2011) και η αμειψισπορά με

κηπευτικά της οικογένειας *Brassica oleracea* (μπρόκολο, λαχανάκια Βρυξελλών) (Lazarovits et al. 2010, Shetty et al. 2000).

Η ικανότητα των δομών επιβίωσης να παραμένουν για χρόνια στο έδαφος, η δυσκολία της απομάκρυνσης μετά την επιμόλυνση, η ικανότητά τους να επιμολύνουν μια μεγάλη ποικιλία ξενιστών και η σπανιότητα ανάπτυξης ανθεκτικότητας από το σποριόφυτο καθιστούν τον *V. dahliae* ένα σημαντικό πρόβλημα στην γεωργική (Klosterman et al. 2009). Στην Ελλάδα, αν και έχει αναφερθεί για πρώτη φορά από το 1935 ως ασθένεια, εντούτοις μόνο την τελευταία εικοσαετία έχει αρχίσει να απασχολεί έντονα τον παραγωγικό κόσμο με την επέκταση που έχει στις διάφορες καλλιέργειες (ΦΟΥΣΙΑ 2016).

1.3.2 *Fusarium oxysporum*



Εικόνα 3 Αδροφουζαρίωση στην τομάτα. Πηγή: Ελληνική Φυτοπαθολογική Εταιρία

Οι μύκητες που ανήκουν στο γένος *Fusarium* αποτελούν ένα από τα 4 γένη που προκαλούν αδρομυκώσεις στα φυτά (Agrios 2005d). Πιο συγκεκριμένα, το είδος *F. oxysporum* αποτελεί τον αιτιολογικό παράγοντα της αδρομύκωσης (Nelson 1981) και έχει τη δυνατότητα να προσβάλλει μια μεγάλη ποικιλία φυτών όπως διάφορα λαχανικά (ντομάτα, αγγούρι, κολοκυθάκι), ανθοκομικά φυτά (γαρίφαλο, τουλίπα), πολυετή και ποώδη και φυτά υψηλής οικονομικής σημασίας όπως το βαμβάκι (Nelson 1981; Παντελίδης 2009).

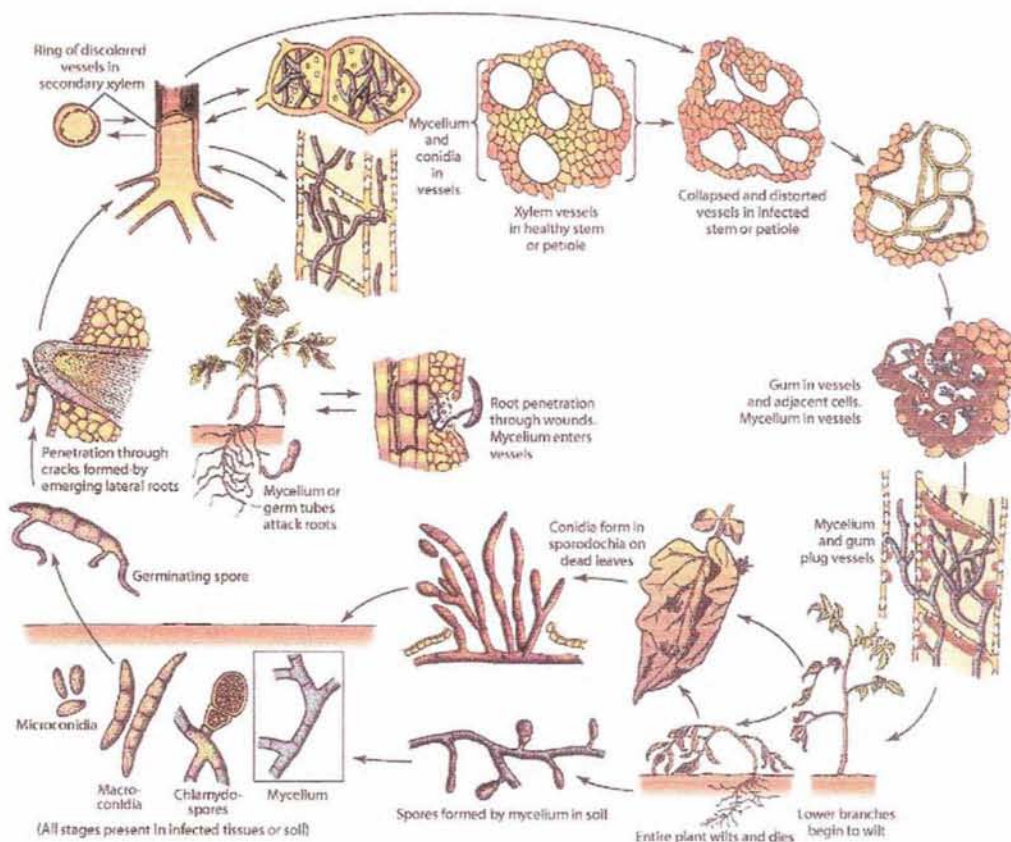
Το είδος *F. oxysporum* αποτελείται από ένα σύμπλεγμα ειδικών φυλών (*formae specialis*) οι οποίες διαφέρουν γενετικά και φαινοτυπικά (Kang et al. 2014). Ενδιαφέρον

αποτελεί το γεγονός ότι οι διαφορετικές ειδικές φυλές του μύκητα προσβάλλουν και διαφορετικούς ξενιστές (Agrios 2005d) κάτι που προσδίδει εξειδίκευση μεταξύ παθογόνου-ξενιστή (Kang et al. 2014). Μερικά παραδείγματα μεταξύ των φυλών του *F. oxysporum* και των ξενιστών τους αναφέρονται στον Πίνακα 2.

Πίνακας 2 Παραδείγματα εξειδίκευσης μεταξύ ξενιστών και φυλών του *F. oxysporum*

Ξενιστής	Λατινική ονομασία	Ειδική φυλή	Αναφορά
Τριφύλλι alfalfa	<i>Medicago sativa</i> L.	<i>f. sp. medicaginis</i>	(Antonopoulos et al. 2003)
Φοίνικας	<i>Phoenix canariensis</i>	<i>f. sp. canariensis</i>	(Kalomoira 2004)
Καπνός	<i>Nicotiana tabacum</i>	<i>f. sp. nicotianae</i>	(S. E. Tjamos et al. 2006)
Βασιλικός	<i>Ocimum basilicum</i>	<i>f.sp. basilici</i>	(Biris et al. 2004)
Πεπόνι	<i>Cucumis melo</i>	<i>f. sp. melonis</i>	(Oumouloud et al. 2016)
Αγγούρι	<i>Cucumis sativus</i>	<i>f. sp. radices-cucumerinum</i>	(Vakalounakis 1996)
Τομάτα	<i>Solanum lycopersicum</i>	<i>f. sp. radices-lycopersici</i>	(Malathrakis 1985)

Ο *F. oxysporum* είναι ένας εδαφογενής μύκητας και εντοπίζεται στο έδαφος με τη μορφή των спорίων του (Agrios 2005d). Γενικά μπορεί να παράγει 3 ειδών спорίων: τα μακροκονίδια, τα μικροκονίδια και τα χλαμυδοσπόρια (Nelson 1981). Τα μακροκονίδια αποτελούνται από 3-5 κύτταρα και εντοπίζονται κυρίως στην επιφάνεια νεκρών φυτών τα οποία έχει προηγουμένως σκοτώσει ο μύκητας (Agrios 2005d, Kang et al. 2014). Τα μικροκονίδια αποτελούνται από 1-2 κύτταρα και συνιστούν τα σπόρια που παράγονται συχνότερα και σε μεγαλύτερο βαθμό παντού, ακόμη και στο εσωτερικό των αγγείων του φυτού. Τα χλαμυδοσπόρια αποτελούνται από 1-2 κύτταρα, παράγονται από υφές και κονίδια με συμπύκνωση, και περιβάλλονται από παχύ τοίχωμα (Agrios 2005d). Είναι οι ανθεκτικές μορφές του μύκητα και μπορούν να επιβιώσουν για μεγάλο χρονικό διάστημα σε φυτικά υπολείμματα στο έδαφος απουσία ξενιστή. Παρουσία φυτικών ριζών ή φρέσκων φυτικών υπολειμμάτων τα χλαμυδοσπόρια βλασταίνουν και παράγουν υφές αλλά και κονίδια και περισσότερα χλαμυδοσπόρια (Jendoubi et al. 2017). Το μυκήλιο στη συνέχεια προσβάλλει τη ρίζα είτε από τις άκρες, είτε διαμέσου πληγών, είτε από το σημείο σχηματισμού πλευρικών ριζών (Agrios 2005d). Στη συνέχεια, μετακινείται στον φλοιό της ρίζας αποπλαστικά και καταλήγει στα αγγεία του ξυλώματος, όπου και εισέρχεται (Bishop and Cooper 1983). Το μυκήλιο από εκεί και στη συνέχεια, παραμένει αποκλειστικά στα αγγεία, και ταξιδεύει μέσω αυτών στο υπόλοιπο φυτό παράγοντας μικροκονίδια (Agrios 2005d). Τα μικροκονίδια μεταφέρονται μέσω των αγγείων (Nelson 1981) και, σε περίπτωση που η μεταφορά του παρεμποδιστεί, βλασταίνουν και εισβάλλουν στο διπλανό αγγείο όπου παράγουν περισσότερα μικροκονίδια (Agrios 2005d). Ο μαρασμός επέρχεται αφότου αποφραχθούν τα αγγεία με το μυκήλιο, μικροκονίδια και προϊόντα της άμυνας του φυτού και παρεμποδιστεί η μεταφορά του νερού (Agrios 2005d).



Εικόνα 4. Ενδεικτικός κύκλος ζωής του *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* που προσβάλλει την τομάτα (Agrios 2005d)

Μέχρι σήμερα δεν υπάρχει κάποια μέθοδος ίασης των μολυσμένων φυτών και ο μόνος τρόπος αντιμετώπισης του μύκητα είναι μέσω προφυλακτικών πρακτικών κατά τη διάρκεια της παραγωγικής περιόδου (Lecomte et al. 2016). Συνοπτικά αυτά περιλαμβάνουν (i) την απολύμανση του εδάφους και των υποστρωμάτων (Katan 2000, Raudales et al. 2014) (ii) την ορθή άρδευση (Katan 2000, Raudales et al. 2014), (iii) την διατήρηση του θερμοκηπίου και εξοπλισμού σε καλή κατάσταση, (iv) την αμειψισπορά, (Katan 2000; Riaz et al. 2009) και την χρήση χημικών και βιολογικών μεθόδων ελέγχου (Lecomte et al. 2016).

Στην Ελλάδα, ο *F. oxysporum* συνιστά έναν σημαντικό εχθρό των καλλιεργειών και έχει εντοπιστεί και μελετηθεί σε καλλιέργειες διάφορων κηπευτικών και δέντρων (Malathrakis 1985, Elena and Pappas 2002, Biris et al. 2004, Tjamos et al. 2006, Pappas and Elena 1997).

1.3.3 *Rhizoctonia solani*



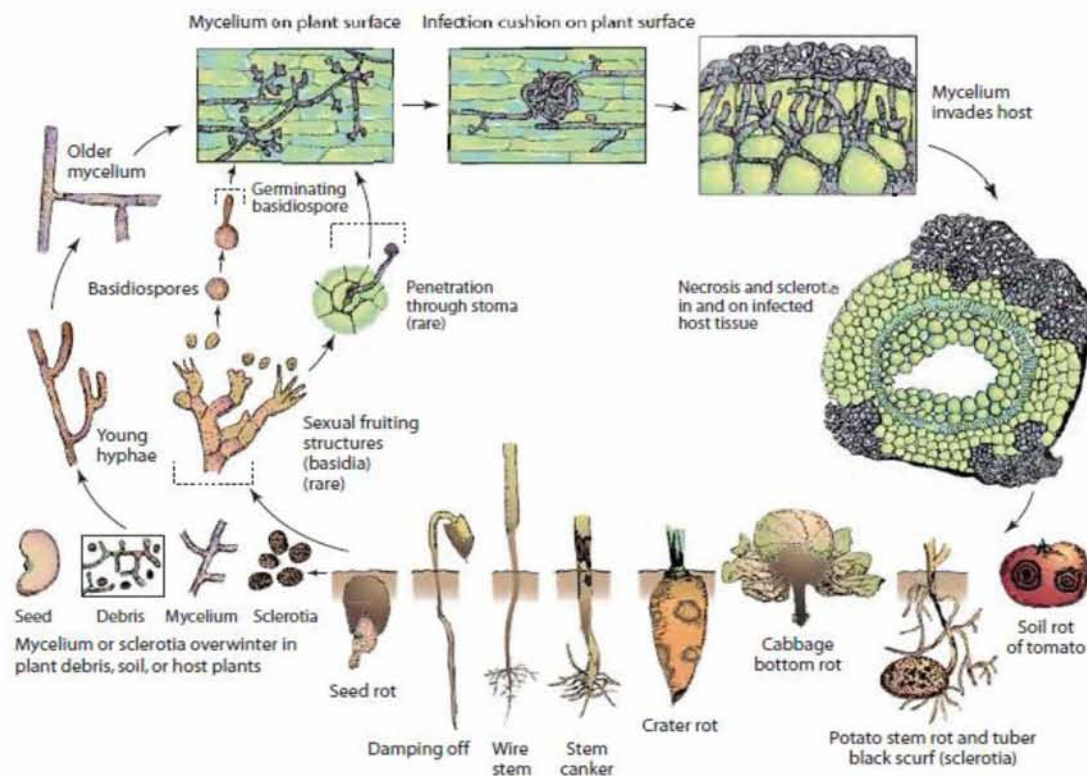
Εικόνα 5. Σήψη του βλαστού και της ρίζας σε φυτό τομάτας.
Πηγή: Plant Pathology, George N. Agrios, 2005 (Courtesy of R. J. McGovern)

Οι ριζοκτονιάσεις απαντώνται σε ολόκληρο τον κόσμο και προκαλούν απώλειες σε σχεδόν όλα τα λαχανικά και λουλούδια και σε πολυετή φυτά και δέντρα (Agrios 2005c). Το συνηθέστερο σύμπτωμα που προκαλεί είναι η εμφάνιση μικρών βυθισμένων κοκκινοκαφέ κηλίδων στις ρίζες και στην βάση του φυτού (Λάμπρου 2009) οι οποίες καταλήγουν σε σάπισμα του φυτού είτε στον σπόρο, είτε στον βλαστό, είτε στον φλοιό, είτε στον καρπό (τομάτα, αγγούρι, μελιτζάνα, φασόλια) (Agrios 2005c). Επίσης δημιουργεί πληγές στον βλαστό των σποριόφυτων (βαμβάκι, καπνός), αλλοιώσεις των ριζών, και αλλοιώσεις των φύλλων (Agrios 2005c). Κάποιοι από τους ξενιστές του *R. solani* είναι η ελαιοκράμβη, τα δημητριακά (σιτάρι, κριθάρι), το βαμβάκι, το ρύζι, η πατάτα, το γρασίδι και φυσικά λαχανικά όπως η τομάτα, η πιπεριά, η μελιτζάνα, το αγγούρι, το καρότο και πολλά ακόμη (Sneh et al. 1996).

Το *R. solani* αποτελεί ένα σύμπλεγμα ειδών γιατί αποτελείται από πολλά συγγενικά αλλά γενετικά διαφορετικά υποείδη (Carling et al. 2002). Η κατηγοριοποίηση τους γίνεται σε ομάδες αναστόμωσης (Yang and Li 2012). Γενικά εάν η συγχώνευση των υφών δύο μυκήτων λαμβάνει χώρα σε συχνότητα πάνω από 50% τότε αυτοί ανήκουν στην ίδια ομάδα αναστόμωσης. Από την άλλη, η αγχιστεία υφών μεταξύ μελών από διαφορετικές ομάδες αναστόμωσης συμβαίνει σε συχνότητα μικρότερη του 30% έως και καθόλου (Yang and Li 2012). Επιπλέον θεωρείται "στείρος" μύκητας διότι σπάνια εμφανίζεται στο στάδιο της

τέλειας μορφής του βασιδιομύκητα. Παρόλα αυτά η τέλεια μορφή του, ο *Thanatephorus cucumeris*, έχει εντοπιστεί υπό συγκεκριμένες συνθήκες (υψηλή υγρασία) (Agrios 2005c)

Ο *R. solani* διαχειμάζει με τη μορφή μυκηλίου ή σκληρωτίων, στο έδαφος, σε πολυετή φυτά ή σε αναπαραγωγικά όργανα φυτών όπως είναι οι βολβοί της πατάτας (Agrios 2005c, Γκοτσοπούλου 2014). Τα σκληρώτια, αδιαφοροποίητα συσσωρεύματα μελανών κυττάρων με παχύ κυτταρικό τοίχωμα, αποτελούν την κύρια μορφή επιβίωσης του μύκητα και μπορούν να επιβιώσουν στο έδαφος για χρόνια (Sneh et al. 1996). Γι' αυτό και αν εγκατασταθεί σε ένα έδαφος παραμένει εκεί επ' αόριστων (Agrios 2005c). Ο *R. solani* έχει την ικανότητα να επιμόλυνει είτε με απευθείας διάτρηση μιας αέρας επιφάνειας του φυτού (π.χ. ρίζες), είτε με διείσδυση μέσω φυσικών ανοιγμάτων (π.χ. στόματα) ή μέσω τραυματισμών (Dodman et al., 1970). Παρουσία ενός φυτού, τα σκληρώτια βλασταίνουν και αναπτύσσονται προς αυτό, καλύπτοντας την επιφάνειά του (Sneh et al. 1996). Στη συνέχεια, δημιουργούνται οι δομές επιμόλυνσης (infection cushions) μέσω των οποίων ο μύκητας προσκολλάται στην επιφάνεια του φυτού και την διαπερνά (Sneh et al. 1996). Η ενδοκυτταρική εισχώρηση ακολουθείται από γρήγορο πολλαπλασιασμό των υφών που καταλήγει σε κατάρρευση των κυτταρικών δομών του ξενιστή και σήψη του προσβληθέντος οργάνου (Bateman 1970). Τα νέα σκληρώτια δημιουργούνται συνήθως μετά τον θάνατο των κυττάρων, μέσα στον ξενιστή (Bateman 1970).



Εικόνα 60 κύκλος ζωής του *Rhizoctonia solani* (Τέλεια μορφή: *Thanatephorus cucumeris*) (Agrios 2005c)

Η αντιμετώπιση των ριζοκτονιάσεων που προκαλούνται από τον *Rhizoctonia solani* είναι δύσκολη γι' αυτό και συνήθως λαμβάνονται προληπτικά μέτρα όπως (Agrios 2005c, Γκοτσοπούλου 2014):

- Περιορισμός της υγρασίας του εδάφους (μείωση υπερβολικών αρδεύσεων, ορθός αποστραγγισμός του εδάφους)
- Απολύμανση των σπόρων (μυκητοκτόνα) και του αγρού (καπνισμός)
- Αμειψισπορά

- Εφαρμογή αβαθούς σποράς
- Αποφυγή πρόκλησης πληγών στα φυτά

Στην Ελλάδα, οι ριζοκτονιάσεις εμφανίζονται συχνά κυρίως στις καλλιέργειες οικονομικώς σημαντικών λαχανικών όπως η τομάτα (“Ασθένεια Ντομάτας Ριζοκτόνια - GAIApedia”), η πατάτα (“ΟΔΗΓΙΕΣ ΟΛΟΚΛΗΡΩΜΕΝΗΣ ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΣΙΑΣ ΣΤΗΝ ΠΑΤΑΤΑ,”), η πιπεριά (ΖΕΜΠΕΚΗ 2013), το αγγούρι (“ΟΔΗΓΙΕΣ ΟΛΟΚΛΗΡΩΜΕΝΗΣ ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΣΙΑΣ ΣΤΟ ΑΓΓΟΥΡΙ ΘΕΡΜΟΚΗΠΙΟΥ,”) και άλλα.

1.3.4 *Pythium ultimum*



Εικόνα 7 Σήψη της ρίζας και μαρασμός φυτών τομάτας σε καλλιέργεια θερμοκηπίου προσβεβλημένη από *Pythium*. Πηγή: Plant Pathology, George N. Agrios, 2005 (Plant Pathology Department, University of Florida)

Οι μύκητες του γένους *Pythium* ανήκουν στη τάξη των ωομυκήτων. Είναι πολυμορφικοί, ευπροσάρμοστοι και περιλαμβάνουν μερικά από τα πιο καταστροφικά φυτοπαθογόνα (Parveen and Sharma 2014).

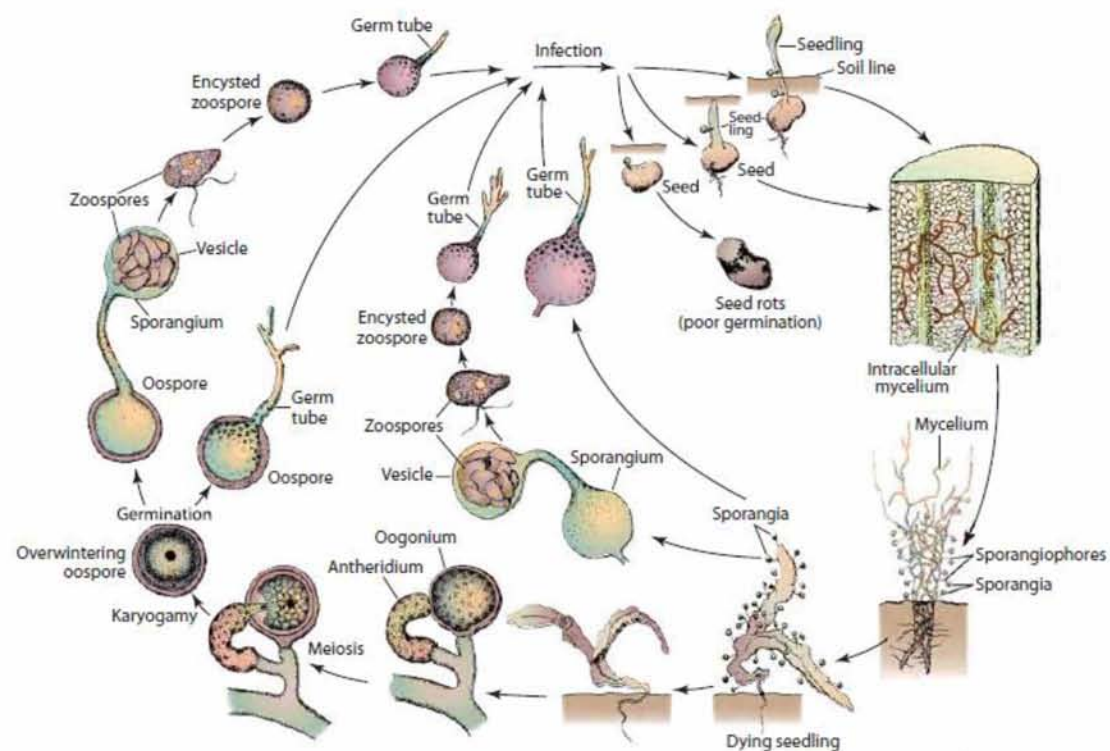
Τα μέλη του γένους *Pythium* απαντώνται σε επιφανειακά νερά και εδάφη σε ολόκληρο τον κόσμο. Επιβιώνουν ως σαπρόφυτα σε νεκρό φυτικό και ζωικό υλικό ή ως παράσιτα των ινωδών ριζών των φυτών (Agrios 2005a). Συνιστούν σημαντικό αιτιολογικό παράγοντα

της σήψης του σπόρου, του φύτρου και των ριζών σε όλα τα είδη φυτών (Agrios 2005a). Το *P. ultimum* είναι το πιο συχνά απαντώμενο είδος καθώς είναι ευρέως κατανεμημένο και έχει μεγάλο εύρος ξενιστών (Beckerman 2011), όπως τον αρακά, το ρεβίθι, το τριφύλλι alfalfa, τη σόγια, το βαμβάκι, το σιτάρι, το κριθάρι, τη τομάτα, το καρότο, το αγγούρι και πολλούς άλλους (Martin and Loper 1999).

Ο μύκητας παράγει λευκό και ταχέως αναπτυσσόμενο μυκήλιο που δημιουργεί σποράγγεια τα οποία με τη σειρά τους παράγουν έναν ή περισσότερους βλαστικούς σωλήνες. Εναλλακτικά το μυκήλιο μπορεί να δώσει ένα δευτερογενές κυστίδιο, γεμάτο με άφθονα ζωοσπόρια τα οποία αφότου απελευθερωθούν, βλασταίνουν παράγοντας βλαστικούς σωλήνες (Rusagara Nzungize et al. 2013). Επίσης, από το μυκήλιο μπορούν να παραχθούν ωγόνια και τα ανθηρίδια που θα τα γονιμοποιήσουν. Το γονιμοποιημένο ωγόνο παράγει το ωοσπόριο (Rusagara Nzungize et al. 2013), μια μορφή του μύκητα με παχύ κυτταρικό τοίχωμα (Agrios 2005a), ανθεκτική σε δυσμενείς συνθήκες θερμοκρασίας και υγρασίας με τη οποία ο μύκητας διαχειμάζει (Martin et al. 1999).

Τα σποράγγεια έχουν την ικανότητα να βλασταίνουν και να αναπτύσσονται ταχέως προς την κατεύθυνση του φυτού παρουσία φυτικών εκκρίματων (Martin et al. 1999). Η μόλυνση ξεκινά από τη στιγμή που οι βλαστικοί σωλήνες θα έρθουν σε επαφή με ιστούς του σπόρου ή του σποριόφυτου τους οποίους διαπερνούν άμεσα (Agrios 2005a). Ο μύκητας καταστρέφει τον πρωτοπλάστη του φυτού με χρήση ποικιλίας ενζύμων (π.χ. πρωτεολυτικά, κυτταρολυτικά και πεκτινολυτικά ένζυμα) προκαλώντας τον θάνατο του. Στα σποριόφυτα που είναι ήδη ανεπτυγμένα και έχουν ήδη δημιουργήσει πυκνά, λιγνινοποιημένα κυτταρικά τοιχώματα η πρόοδος του σποριόφυτου σταματά στο σημείο της προσβολής και έχει μόνο

σαν αποτέλεσμα τον σχηματισμό μικρών αλλοιώσεων (Agrios 2005a). Με την πρόοδο της μόλυνσης, σποράγγια αρχίζουν να εμφανίζονται εντός ή/και εκτός των ιστών του ξενιστή (Agrios 2005a). Οι επιμολυσμένες περιοχές του φυτού διαποτίζονται με νερό και αποχρωματίζονται και σύντομα καταρρέουν.



Εικόνα 8 Ο κύκλος ζωής και η σήψη σπόρων και σποριόφυτων που προκαλούνται από τον μύκητα *Pythiumultimum*

Η άμεση εκβλάστηση των σποριαγγείων μετά από έκθεση σε εκκρίσεις των ριζών ή των σπόρων και η γρήγορη επακόλουθη επιμόλυνση τους κάνουν την αντιμετώπιση του *Pythium ultimum* πολύ δύσκολη (Parveen et al. 2014)

Η ασθένειες που προκαλούνται από το *Pythium ultimum* σε θερμοκήπια αντιμετωπίζονται κυρίως μέσω της χρήσης αποστειρωμένου εδάφους ή σπόρων (Agrios 2005a). Επίσης συγκεκριμένες καλλιεργητικές τεχνικές βοηθούν στην μείωση της πιθανότητας επιμόλυνσης όπως η καλή αποστράγγιση του εδάφους και ο αερισμός του χώρου, ευνοϊκές θερμοκρασίες για την γρήγορη ανάπτυξη του φυτού, η αποφυγή κατάχρησης λιπασμάτων με άζωτο και η αμειψισπορά (Agrios 2005a). Τέλος, η αδυναμία ανταγωνισμού προς άλλα είδη δίνει την δυνατότητα διαχείρισης της ασθένειας και μέσω βιολογικού ελέγχου (Martin and Loper 1999) δηλαδή με την χρήση ανταγωνιστικών ειδών μυκήτων και βακτηρίων (π.χ. *Trichoderma spp.* και *Pseudomonas spp.* αντίστοιχα) (Rusagara Nzungize et al. 2013).

Στην Ελλάδα μύκητες του γένους *Pythium* προσβάλλουν αρκετές καλλιέργειες πολλές εκ των οποίων αφορούν κηπευτικά υπό κάλυψη όπως το αγγούρι, οι αγκινάρες, οι κολοκύθες, οι πιπεριές, οι τομάτες και άλλα ("Πύθιο - Ασθένειες Φυτών - Plant Protection").

1.3.5 *Sclerotinia sclerotiorum*

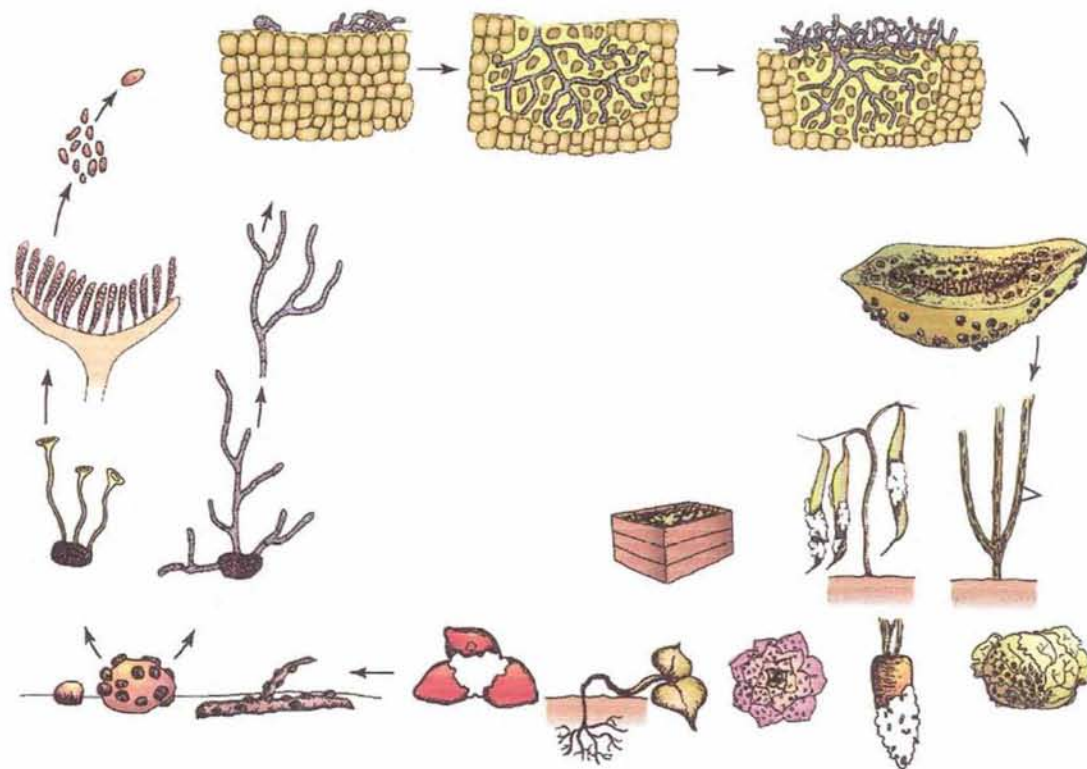


Εικόνα 9. Σκληρωτινίαση σε μπρόκολο. Πηγή: Ελληνική Φυτοπαθολογική Εταιρεία

Η *Sclerotinia* λογίζεται ως ένα σημαντικό παθογόνο φυτών εξαιτίας της παγκόσμιας κατανομής της, της ευρείας κλίμακας ξενιστών και τις δυσκολίες ελέγχου των ασθενειών που προκαλεί (Rollins et al. 2014, Saharan et al. 2008). Ο *Sclerotinia sclerotiorum* είναι ένας ευρέως διαδεδομένος μύκητας ο οποίος προκαλεί ανεμπόδιση ανάπτυξη αλλοιώσεων και σήψη του ιστού των ξενιστών του (Rollins et al. 2014). Οι σκληρωτινιάσεις επηρεάζουν το φυτό σε όλα τα στάδια της ανάπτυξης συμπεριλαμβανομένων των αρχικών σταδίων, των πιο ώριμων και των καρπών που έχουν θεριστεί (Agrios 2005c). Προκαλεί σάπισμα των σποριόφυτων και των φυτών που έχουν ήδη αναπτύξει ξυλώδη ιστό, πληγές στον βλαστό, σήψη του υπέργειου τμήματος του φυτού, των ριζών, της βάσης του στελέχους, του βολβού και των καρπών (Agrios 2005c). Ο *S. sclerotiorum*

προσβάλλει μεγάλο αριθμό φυτών όπως σόγια, φασολάκι, τομάτα, η πιπεριά, μαρούλι και άλλα λαχανικά (Rollins et al., 2014).

Ο μύκητας διαχειμάζει είτε με τη μορφή των σκληρωτίων πάνω ή στο εσωτερικό των μολυσμένων ιστών του ξενιστή και στο έδαφος είτε με τη μορφή του μυκηλίου σε νεκρά ή ζωντανά φυτά (Agrios 2005c, Saharan et al., 2008). Την άνοιξη τα σκληρώτια βλασταίνουν για να παράξουν τα αποθήκια, δομές ασκοκάρπιων οι οποίες φιλοξενούν πολύ μεγάλο αριθμό ασκοσπορίων (Rollins et al., 2014). Τα ασκοσπόρια μεταφέρονται με τον αέρα (Saharan et al., 2008) και όταν προσγειωθούν σε δεκτικό ξενιστή βλασταίνουν και προκαλούν μόλυνση (Agrios 2005c). Όλα τα μέρη του φυτού, είτε υπέργεια είτε στο επίπεδο του εδάφους και σε οποιαδήποτε ηλικία μπορούν να μολυνθούν από τον μύκητα (Saharan et al., 2008). Η μόλυνση ξεκινά με την είσοδο του μυκηλίου στους ιστούς του ξενιστή η οποία μπορεί να γίνει είτε μέσω των στομάτων είτε με διάρρηξη της επιδερμίδας (Saharan et al., 2008). Το πιο προφανές πρώιμο σύμπτωμα είναι η εμφάνιση ενός λευκού και αφράτου μυκηλίου το οποίο σύντομα μετατρέπεται σε μεγάλες, σκληρές, μαύρες και συμπαγείς δομές, τα σκληρώτια (Vagelas 2014). Σε συνέχεια της μόλυνσης, ο μύκητας κινείται αποπλαστικά και προχωρά στους υπόλοιπους ιστούς του ξενιστή προκαλώντας κατάρρευση των φυτικών δομών και εν τέλει θάνατο του ξενιστή (Saharan et al., 2008). Τα σκληρώτια επιβιώνουν στην επιφάνεια και το εσωτερικό του ξενιστή και, τελικά, επιστρέφουν στο έδαφος (Saharan et al., 2008, Rollins et al., 2014).



Εικόνα 10 Η ανάπτυξη και τα συμπτώματα των ασθενειών των λαχανικών και ανθών που προκαλούνται από τον μύκητα *Sclerotinia sclerotiorum*

Ο έλεγχος των ασθενειών που προκαλούνται από είδη του γένους *Sclerotinia* γίνεται κυρίως με χρήση χημικών και συγκεκριμένων καλλιεργητικών πρακτικών (Agrios 2005c). Μερικά χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν η απολύμανση του εδάφους με ατμό, ο ψεκασμός με μυκητοκτόνα, ο βιολογικός έλεγχος με χρήση παρασίτων του *Sclerotinia* sp., η ορθή άρδευση του εδάφους, η απομάκρυνση των ζιζανίων και γενικά η σωστή φροντίδα του αγρού (Saharan and Mehta 2008). Η μόλυνση με τον συγκεκριμένο μύκητα αποτελεί συχνό φαινόμενο σε αρκετές εγχώριες καλλιέργειες (“Σκληρωτινίαση Στα Ψυχανθή | Agronews.gr”)(“Η Καλλιέργεια Του Καρότου”)(Tziros et al. 2008, Vagelas 2014).

1.3.6 *Pyrenochaeta lycopersici* τύπος I και τύπος II

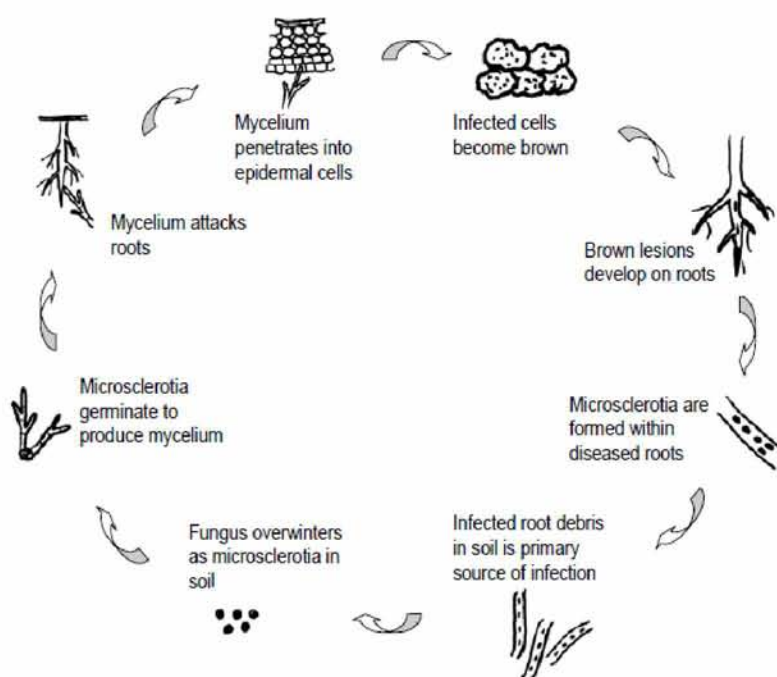


Copyright: C. Blancard (IAR)

Τα μέλη του είδους *Pyrenochaeta lycopersici* αποτελούν τον κύριο αιτιολογικό παράγοντα της φελλώδους σηψιρριζίας στις τομάτες (Grove et al. 1987). Η φελλώδης σηψιρριζία εκδηλώνεται στις ρίζες και στα ριζικά τριχίδια των μολυσμένων φυτών με τη μορφή καφέ, νεκρωτικών αλλοιώσεων οι οποίες σύντομα μετατρέπονται σε φελλώδεις, με πρησμένο και σπασμένο φλοιό (Infantino and Pucci 2005, Kim et al., 2003). Οι συγκεκριμένες αλλοιώσεις έχουν ως αποτέλεσμα την διαταραχή της κυκλοφορίας νερού και θρεπτικών από και προς τις ρίζες, την παρεμπόδιση της ανάπτυξης

και την σημαντική μείωση της παραγωγής οικονομικά σημαντικών λαχανικών (Goodenough et al. 1973, Clergeot et al. 2012). Οι φελλώδεις ρίζες πολλές φορές προσβάλλονται και από άλλους μύκητες (Infantino and Pucci 2005).

Ο *Pyrenochaeta lycopersici* είναι ένας αργά αναπτυσσόμενος μύκητας (Grove and Campbell 1987) και συχνά συνδέεται με άλλους σαπροφυτικούς μύκητες του εδάφους δυσχεραίνοντας την διαδικασία απομόνωσης του (Infantino and Pucci 2005). Ο συγκεκριμένος μύκητας προσβάλλει τα φυτά της τομάτας με τη μορφή του μυκηλίου όταν αυτό έρθει σε επαφή με τις ρίζες ("Crop Profile for Greenhouse Tomato in Canada" 2006). Ο μύκητας εισέρχεται στον παρεγχυματικό ιστό (Vitale et al. 2010) και προκαλεί καφέ αλλοιώσεις στις μολυσμένες ρίζες οι οποίες διαδίδονται σε ολόκληρο το ριζικό σύστημα (Ekengren 2008). Οι μικρότερες ρίζες αποσυντίθενται εντελώς ενώ οι μεγαλύτερες γίνονται πιο παχιές και σκούρες και φελλοποιούνται (Ekengren 2008). Σε ύστερα στάδια της μόλυνσης, ο φλοιός αποσπάται και εκτίθενται οι δέσμες των αγγείων (Last and Ebben 1966). Παρόλο που ο μύκητας μπορεί να παράγει μεμονωμένα σκουρόχρωμα πυκνίδια (Schneider et al. 1966), συνήθως επιβιώνει στον ριζικό ιστό και στο έδαφος με την μορφή των μικροσκληρωτίων (Grove et al. 1987, White and Scott 1973).



Εικόνα 110 κύκλος ζωής του φυτοπαθογόνου μύκητα *Pyrenochaeta lycopersici* (Mahbuba Kaniz 2007)

Ο *Pyrenochaeta lycopersici* χωρίζεται σε 2 τύπους με βάση καλλιεργητικά και μοριακά χαρακτηριστικά, τον τύπο I και τον τύπο II (Infantino and Pucci 2005). Οι δύο τύποι διαφέρουν ως προς φυσιολογικά και μοριακά χαρακτηριστικά, όπως ο ρυθμός ανάπτυξης του μυκηλίου, η αλληλουχία της περιοχής μεταξύ των ριβοσωματικών γονιδίων στο DNA (rDNA-ITS) και τα αποτελέσματα των αναλύσεων του τυχαία ενισχυμένου πολυμορφικού DNA (RAPD: Random Amplified Polymorphic DNA) και του πολυμορφισμού μήκους ενισχυμένων τμημάτων (AFLP: Amplified Fragment Length Polymorphism) (Pucci et al., 2011)

Ο *P. lycopersici* αντιμετωπίζεται τόσο με χημικές όσο και με καλλιεργητικές πρακτικές. Η χρήση του βρωμιούχου μεθυλίου ήταν ο αποτελεσματικότερος τρόπος αντιμετώπισης του μύκητα. Παρόλα αυτά η σταδιακή κατάργηση του εν λόγω φυτοπροστατευτικού, σύμφωνα

με τις απαιτήσεις του πρωτόκολλου του Μόντρεαλ για ουσίες οι οποίες μειώνουν το στρώμα του όζοντος (UNEP 1995), κατέστησε τον μύκητα ένα μείζων πρόβλημα για τους καλλιεργητές. Εναλλακτικά το φυτοπροστατευτικό προϊόν Cartan χρησιμοποιείται για την αντιμετώπιση των μυκήτων του είδους *P. lycopersici* ("Crop Profile for Greenhouse Tomato in Canada" 2006). Οι ορθές καλλιεργητικές πρακτικές επίσης επιστρατεύονται προληπτικά για αποφυγή εγκαθίδρυσης του παθογόνου στον αγρό και περιλαμβάνουν τον επαρκή αερισμό και τη διατήρηση της θερμοκρασίας σε βαθμούς μεγαλύτερους των 15°C, τον ορθό καθαρισμό του θερμοκηπίου μεταξύ των σοδειών και την διαρκή παρακολούθηση των φυτών, ιδιαίτερα κατά την άνοιξη ("Crop Profile for Greenhouse Tomato in Canada" 2006). Το εύρος των ξενιστών που προσβάλλει περιλαμβάνει μεταξύ άλλων κύρια λαχανικά που καλλιεργούνται και στην Ελλάδα όπως τομάτα, κολοκύθα, πιπεριά, μελιτζάνα, αγγούρι και πεπόνι (Grove et al. 1987).

1.4 Τεχνικές ανίχνευσης και καταμέτρησης των εδαφογενών φυτοπαθογόνων μυκήτων στο έδαφος

Οι φυτοπαθογόνοι μύκητες αποτελούν τους αιτιολογικούς παράγοντες των πιο καταστροφικών ασθενειών των φυτών προκαλώντας έτσι σημαντική μείωση της σοδειάς παγκοσμίως. (Carote et al. 2012). Επομένως, η ανίχνευση και ο προσδιορισμός συγκεκριμένων μυκήτων στο έδαφος και η εκτίμηση της αφθονίας τους αποτελούν μία από τις σημαντικότερες στρατηγικές ελέγχου των ασθενειών των φυτών (Carote et al. 2012). Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιείται μια μεγάλη ποικιλία τεχνικών, η καθεμία με τα πλεονεκτήματα και μειονεκτήματά της.

1.4.1 Παραδοσιακές τεχνικές

Οι παραδοσιακές τεχνικές περιλαμβάνουν την καλλιέργεια και μικροσκοπική παρατήρηση (Cahill 1999). Ενδεικτικά, παράγονται κυτταρικά εναιωρήματα από τα περιβαλλοντικά δείγματα, στα οποία στη συνέχεια πραγματοποιούνται διαδοχικές αραιώσεις οι οποίες επιστρώνονται σε στερεά θρεπτικά υποστρώματα (Prosser 2002). Μετά την επώαση, οι απομονωμένες αποικίες χρησιμοποιούνται για την παραγωγή καθαρών καλλιεργειών οι οποίες στη συνέχεια ταυτοποιούνται μέσω φαινοτυπικών χαρακτηριστικών (Prosser 2002). Γενικά η καλλιέργεια σε επιλεκτικά θρεπτικά μέσα και η επακόλουθη άμεση καταμέτρηση των αναπτυσσόμενων αποικιών χρησιμοποιήθηκε εκτενώς από τους ερευνητές για την εκτίμηση της ποικιλότητας.

Οι μύκητες συνήθως απομονώνονται με την χρήση μη-εξειδικευμένων στερεών θρεπτικών υποστρωμάτων τα οποία παρέχουν θρεπτικά παρόμοια ή συχνά απαντούμενα στο περιβάλλον όπου μεγαλώνει ο μύκητας (O'Donovan et al. 2012). Συνήθως, τα θρεπτικά μέσα που χρησιμοποιούνται για την ανάπτυξη και απομόνωση μυκήτων περιέχουν υψηλό λόγο άνθρακα προς άζωτο και χαμηλό pH(5-6) (Basu et al. 2015). Η προσθήκη αντιβιοτικών στο αποστειρωμένο θρεπτικό είναι απαραίτητη για την αποφυγή ανάπτυξης βακτηρίων (O'Donovan et al. 2012). Παρόλα αυτά, πολλοί μύκητες είναι δύσκολο να αναπτυχθούν στο τρυβλίο. Αυτό συμβαίνει είτε γιατί αναπτύσσονται πολύ αργά είτε γιατί η ανάπτυξη τους παρεμποδίζεται από προϊόντα του μεταβολισμού των ταχύτερα αναπτυσσόμενων μυκήτων (O'Donovan et al. 2012).

Μερικά από τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα θρεπτικά μέσα για την ανάπτυξη μυκήτων είναι τα παρακάτω:

- Potato Dextrose Agar (PDA), το οποίο είναι το πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο, μη-εξειδικευμένο θρεπτικό υπόστρωμα για την ανάπτυξη μυκήτων.
- Sabouraud Dextrose Agar (SDA), ένα φτωχό σε θρεπτικά άγαρ, με όξινο pH

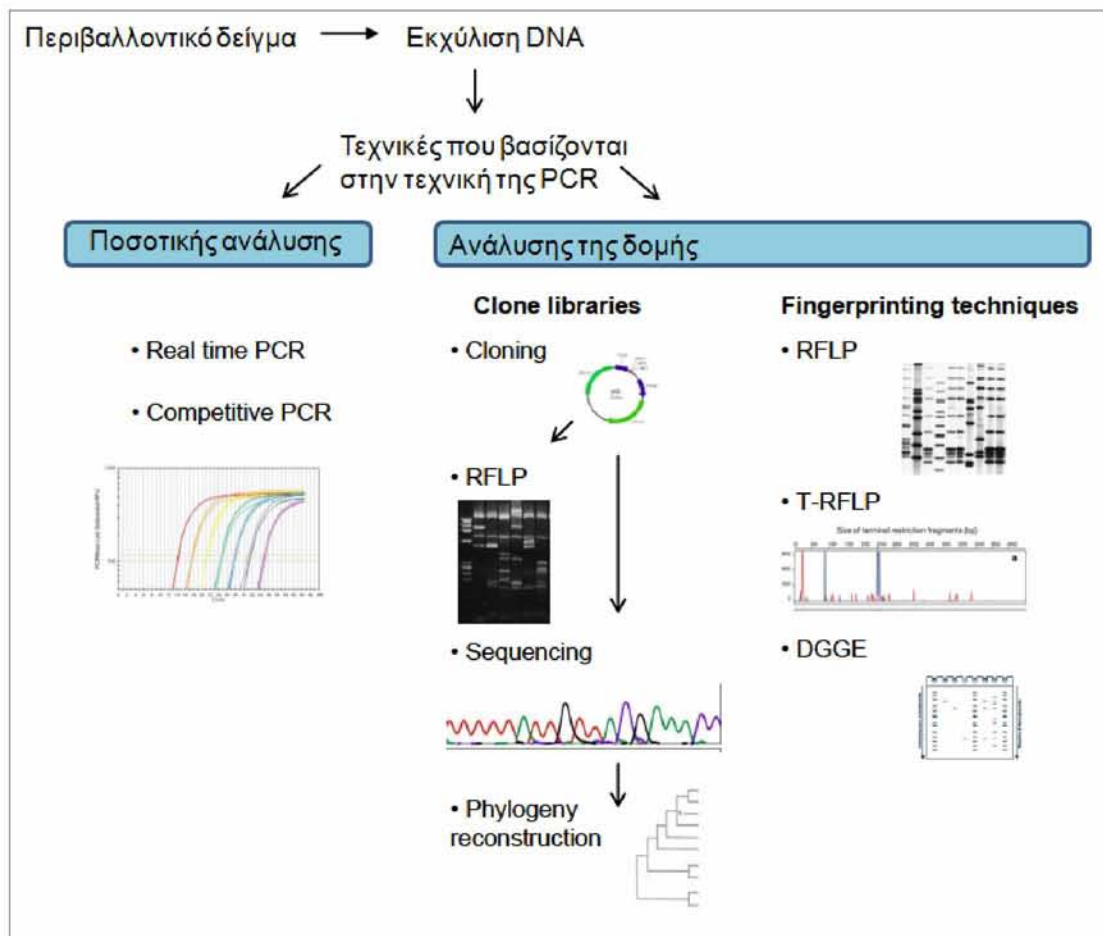
Αυτές οι μέθοδοι δεν απαιτούν κάποια ιδιαίτερη τεχνική γνώση (Cahill 1999), είναι οικονομικές και παρέχουν πληροφορίες για την ενεργή κοινότητα του εδάφους (Kirk et al. 2004), τη σχετική αφθονία και ποικιλότητά της (Prosser 2002). Παρόλα αυτά, οι παραδοσιακές τεχνικές έχουν σημαντικά μειονεκτήματα καθώς είναι κοπιαστικές, απαιτούν πολύ χρόνο και εκτενή γνώση της κλασικής ταξινόμησης (Carote et al. 2012). Επιπλέον, υπάρχει δυσκολία στην επιλογή του θρεπτικού υποστρώματος (Tabacchioni et al. 2000), αδυναμία ποσοτικού προσδιορισμού του παθογόνου (Goud and Termorshuizen 2003) και δυσχέρεια στον εκτοπισμό των παθογόνων από τα εδαφικά σωματίδια (Kirk et al. 2004). Όλοι αυτοί οι περιορισμοί έχουν οδηγήσει στην ανάπτυξη νέων, μοριακών προσεγγίσεων με μεγαλύτερη ακρίβεια και αξιοπιστία (Carote et al. 2012).

1.4.2 Μοριακές τεχνικές

Οι μοριακές τεχνικές έχουν φέρει την επανάσταση στην ανίχνευση και ταυτοποίηση των φυτοπαθολόγων μυκητών του εδάφους (Cahill 1999). Μια ευρεία ποικιλία μοριακών τεχνικών έχουν αναπτυχθεί τα τελευταία 10 χρόνια, μερικές από τις οποίες αναφέρονται παρακάτω.

1.4.2.1 Τεχνικές που βασίζονται στην Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης είναι η πιο σημαντική και ευαίσθητη τεχνική για την ανίχνευση των φυτοπαθολόγων οργανισμών που υπάρχει σήμερα (Carote et al. 2012). Η τεχνική είναι άμεση: (1) Μετατροπή του δικλωναίου DNA ενός οργανισμού σε μονόκλωνο με εφαρμογή υψηλής θερμοκρασίας, (2) Υβριδισμός των δυο ολιγονουκλεοτιδικών εκκινητών με τις μονές έλικες και (3) ο πολυμερισμός τους από μια θερμοανθεκτική DNA πολυμεράση (Cahill 1999). Τα ενισχυμένα τμήματα DNA μπορούν εύκολα να οπτικοποιηθούν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης η οποία περιέχει χρωστική που προσδέεται στο DNA (π.χ. Βρωμοούχο αιθίδιο) (Carote et al. 2012). Σήμερα έχουν αναπτυχθεί πολλές τεχνικές βασισμένες στην αντίδραση PCR. Σε γενικές γραμμές, οι συγκεκριμένες τεχνικές βασίζονται στην εκχύλιση του ολικού DNA από τα δείγματα εδάφους, στον καθαρισμό του και στην πραγματοποίηση της αντίδρασης PCR με γενικούς ή ειδικούς εκκινητές. Τα συνακόλουθα προϊόντα διαχωρίζονται με διάφορες τεχνικές κάθε μια εκ των οποίων μας δίνει διαφορετικές πληροφορίες (Kirk et al. 2004) (ΕΙΚΟΝΑ 6)



Εικόνα 12. Συχνά χρησιμοποιούμενες μοριακές τεχνικές για τη μελέτη της δομής και της πυκνότητας των μικροβιακών κοινοτήτων.

Η παρουσία περιοχών στην αλληλουχία του DNA με διαφορετικό βαθμό συντήρησης επιτρέπουν την ταυτοποίηση αλληλουχιών που είναι κοινές σε όλους τους μύκητες ή σε ταξινομικές ομάδες (γένος, είδος) (Prosser 2002). Αυτές οι αλληλουχίες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον σχεδιασμό εκκινητών που στοχεύουν στον πολυμερισμό της συγκεκριμένης γενετικής περιοχής. Αυτοί οι εκκινητές αποτελούν θεμελιώδη λίθο για την μοριακή ανάλυση των ειδών σε φυσικά περιβάλλοντα. Παραδοσιακά, για την μοριακή ταυτοποίηση των φυτοπαθογόνων μυκήτων χρησιμοποιείται η γονιδιακή περιοχή ITS, μια συντηρημένη περιοχή του γονιδιώματος των μυκήτων μέσω της οποίας μπορούν να διαχωριστούν ακόμη και μέχρι το επίπεδο του είδους (White et al. 1990).

Η μελέτη της αφθονίας των μυκήτων αρχικά γίνονταν με συνδυασμό παραδοσιακών και μοριακών μεθόδων όπου το δείγμα εδάφους μετατρέπονταν σε εναιώρημα, επιστρώνονταν σε τρυβλία με θρεπτικό υλικό και στις αποικίες που αναπτύσσονταν ακολουθούσε απομόνωση DNA, PCR της ITS γενωμικής περιοχής και μέτρηση της ποσότητας του DNA με φωτομέτρηση (Connell et al. 2006).

Η PCR πραγματικού χρόνου (real time PCR) χρησιμοποιείται στη μικροβιακή οικολογία για την ποσοτικοποίηση των μικροοργανισμών σε ένα περιβαλλοντικό δείγμα μέσω της μέτρησης του αριθμού αντιγράφων ενός γονιδίου. Στην PCR πραγματικού χρόνου η συγκέντρωση των προϊόντων ενίσχυσης ελέγχεται σε όλους τους κύκλους ενίσχυσης με την χρήση φθορίζουσων χρωστικών. Αυτές οι χρωστικές προσδένονται με τα προϊόντα ενίσχυσης χωρίς να τα καταστρέφουν έτσι ώστε η ενίσχυση τους να μπορεί να συνεχιστεί. Η ένταση του φθορισμού που εκπέμπεται κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας αντανακλά τη συγκέντρωση των προϊόντων ενίσχυσης σε πραγματικό χρόνο. Υπάρχουν αρκετές μέθοδοι για τη σήμανση και την ανίχνευση των προϊόντων της PCR πραγματικού χρόνου, οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενες είναι η μη ειδική παρεμβαλλόμενη χρωστική SYBR green (Wittwer et al. 1997) και οι ειδικοί σημασμένοι ανιχνευτές TaqMan (Holland et al. 1991). Ο προσδιορισμός της ποσότητας των παραγόμενων προϊόντων μπορεί να γίνει με απόλυτο ή σχετικό υπολογισμό. Στην απόλυτη ποσοτικοποίηση ο αριθμός των αντιγράφων του αρχικού δείγματος προσδιορίζεται με τη χρήση καμπύλης αναφοράς ενώ στη σχετική ποσοτικοποίηση οι αλλαγές του αριθμού αντιγράφων του γονιδίου-στόχου εκφράζονται σχετικά με τον αριθμό αντιγράφων ενός γονιδίου αναφοράς.

Επιπλέον σε κάθε αντίδραση PCR πραγματικού χρόνου προστίθεται και μια χρωστική αναφοράς (π.χ. ROX Low) για να εξισορροπεί τις μικρές αποκλίσεις που προκαλούνται ανάμεσα σε διαφορετικές αντιδράσεις. Ο φθορισμός λόγω της χρωστικής ROX πρέπει να παραμένει σταθερός σε κάθε πείραμα, εξασφαλίζοντας μία σταθερή γραμμή βάσης.

Οι πρώτες εφαρμογές της PCR πραγματικού χρόνου στη μικροβιακή οικολογία αναφέρονται σε τρία άρθρα που δημοσιεύτηκαν τον Νοέμβριο του 2000, όπου χρησιμοποιήθηκαν οι ανιχνευτές TaqMan στοχεύοντας το 16S rRNA γονίδιο (Becker et al. 2000; Suzuki, Taylor, and DeLong 2000; Takai and Horikoshi 2000). Εδώ πρέπει να τονιστεί ότι ο αριθμός των γονιδίων 16S rRNA δεν μπορεί να μετατραπεί σε αριθμό κυττάρων καθώς ο ακριβής αριθμός αντιγράφων του 16S rRNA γονιδίου σε κάθε είδος ποικίλει (Klappenbach et al., 2000). Επιπλέον η PCR πραγματικού χρόνου έχει χρησιμοποιηθεί για την ποσοτικοποίηση λειτουργικών γονιδίων σε περιβαλλοντικά δείγματα όπως είναι αυτά που συμμετέχουν στην οξειδωση της αμμωνίας (Okano et al. 2004; Treusch et al. 2005; Leininger et al. 2006) και στην απονιτροποίηση (Smith et al. 2007).

Γενικά οι μοριακές τεχνικές προσφέρουν ταχύτητα, εξειδίκευση, ευαισθησία και ακρίβεια. Επιτρέπουν την ανίχνευση και ταυτοποίηση μικροοργανισμών που δεν μπορούν αν

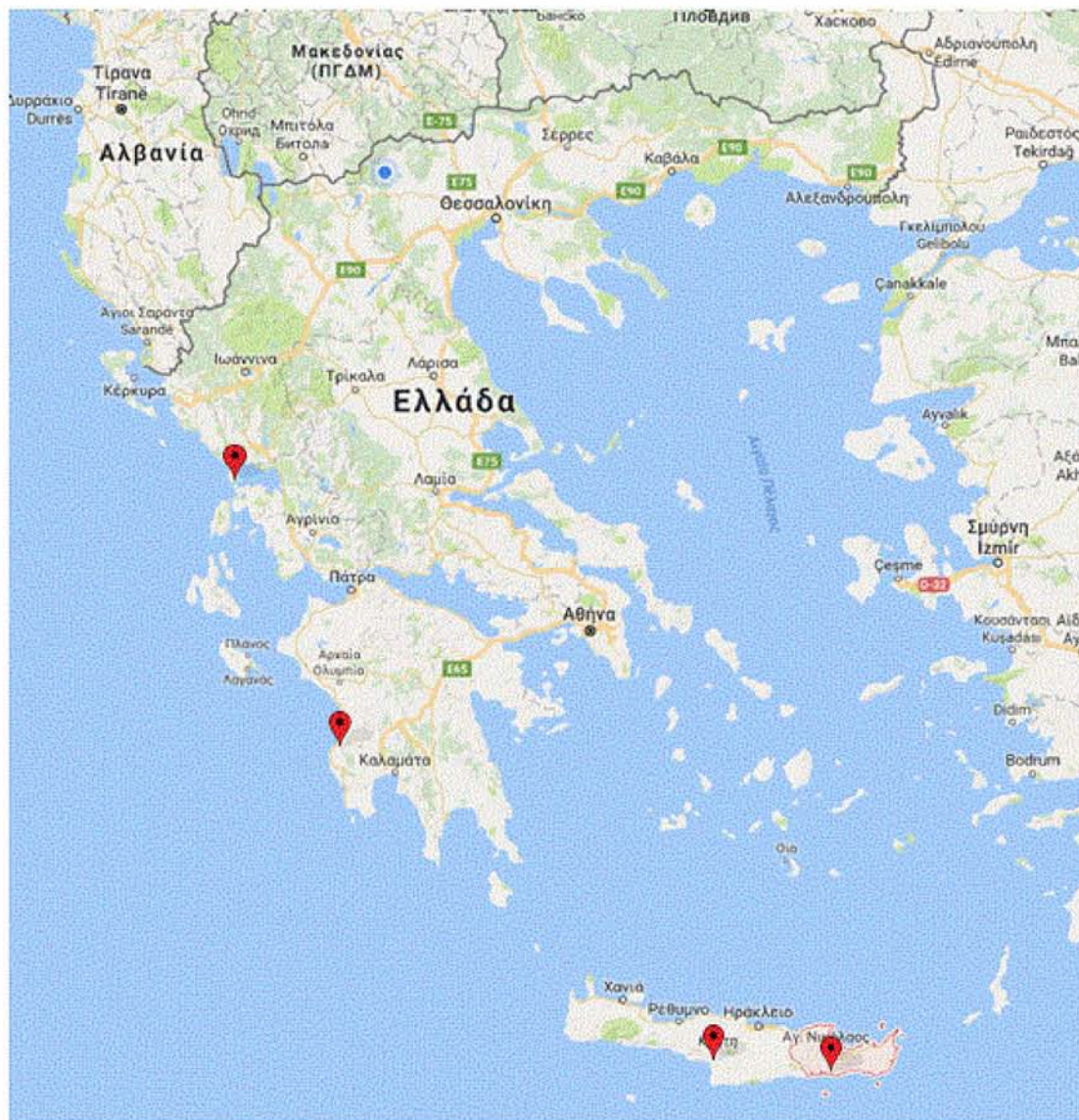
καλλιεργηθούν και την διάκριση μεταξύ στενά συγγενικών οργανισμών σε διάφορα ταξονομικά επίπεδα (Carote et al. 2012). Παρόλα αυτά έχουν και αυτές τα μειονεκτήματά τους. Η αποτελεσματικότητα της λύσης των κυττάρων ή των δομών του μύκητα (σκληρώτια) ποικίλει στα άτομα του ίδιου ή διαφορετικών ειδών (Prosser 2002). Επίσης, οι έντονες μέθοδοι εκχύλισης μπορεί να οδηγήσουν σε πέψη του DNA και κατά συνέπεια σε προβλήματα στην επακόλουθη PCR αντίδραση. Ακόμη, κατά την εκχύλιση του DNA μπορεί να απομονωθούν και ανασταλτικές ουσίες, όπως χουμικά οξέα, τα οποία επηρεάζουν αρνητικά την επικείμενη PCR ανάλυση (Kirk et al. 2004). Τέλος ο διαφορικός πολυμερισμός της γενετικής περιοχής – στόχο μπορεί να προκαταλάβει τα αποτελέσματα της PCR αντίδρασης. Αυτό μπορεί να οφείλεται σε διαφορετική αχχιστεία και εξειδίκευση των εκκινητών στους κλώνους του DNA, σε διαφορετικά αντίγραφα της γονιδιακής περιοχής – στόχο, στην αποτελεσματικότητα υβριδισμού και στην περιεκτικότητα του DNA υποστρώματος σε γουανίνη και κυτοσίνη (GC content) (Wintzingerode et al., 1997).

1.5 Στόχος

Στόχος της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η εκτίμηση της αφθονίας των κυριότερων φυτοπαθογόνων μυκήτων, όπως αυτοί αναφέρθηκαν παραπάνω, σε δείγματα εδάφους που συλλέχτηκαν από θερμοκήπια από τις κυριότερες περιοχές καλλιέργειας οπωροκηπευτικών στην Ελλάδα όπως: Πρέβεζα στην Δυτική Ελλάδα, Κυπαρισσία στη Πελοπόννησο και Λασιθί, Ιεράπετρα και Τυμπάκι στη Κρήτη. Για την πραγματοποίηση αυτής της μελέτης έγινε εφαρμογή της μεθόδου PCR πραγματικού χρόνου σε δείγματα DNA τα οποία εκχυλίστηκαν από εδάφη των παραπάνω περιοχών.

2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Στη παρούσα μελέτη εκτιμήθηκαν με την χρήση PCR πραγματικού χρόνου τα επίπεδα των πληθυσμών των κυριότερων εδαφογενών φυτοπαθογόνων μυκήτων σε δείγματα εδάφους που συλλέχθηκαν από αγρούς - θερμοκήπια οπωροκηπευτικών της περιοχής της Κυπαρισσίας στη Δυτική Πελοπόννησο, της Πρέβεζας στην Δυτική Ελλάδα και των περιοχών του Λασιθίου, της Ιεράπετρας και του Τυμπακίου στην Κρήτη (Εικόνα 13).



Εικόνα 13 Χάρτης της Ελλάδος στον οποίο φαίνονται οι περιοχές απ' όπου συλλέχθηκαν τα δείγματα εδάφους

2.1 Συλλογή δειγμάτων

Τα δείγματα συλλέχθηκαν τον Ιούλιο του 2016 από 75 θερμοκήπια σύμφωνα με το καθορισμένο πρωτόκολλο δειγματοληψίας. Πιο συγκεκριμένα, από κάθε αγρό συλλέχθηκαν 8-10 υποδείγματα από όλη την έκταση του θερμοκηπίου και αναμίχθηκαν σε ένα ενιαίο δείγμα ανά θερμοκήπιο. Τα δείγματα απεστάλησαν άμεσα στο εργαστήριο, κατάλληλα συσκευασμένα με παγοκύστες, ώστε να μην επηρεαστεί σε σημαντικό βαθμό το μικροβιακό τους φορτίο. Αμέσως με την παραλαβή τους τα δείγματα καταγράφηκαν και αποθηκεύτηκαν στους -20°C μέχρι να χρησιμοποιηθούν για εξαγωγή DNA και περαιτέρω αναλύσεις. Στο ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1 παρουσιάζονται τα στοιχεία των παραγωγών, η τοποθεσία

και η εγκατεστημένη καλλιέργεια που υπήρχε στο θερμοκήπιο κατά τη διάρκεια της δειγματοληψίας. Για ορισμένα θερμοκήπια, παρουσιάζεται και η προηγούμενη καλλιέργεια.

2.2 Υπολογισμός περιεχόμενης υγρασίας εδαφών

2.2.1 Υλικά και όργανα

- Φούρνος ξήρανσης, αεριζόμενος και θερμοστατικά ελεγχόμενος, ικανός να διατηρεί μια σταθερή θερμοκρασία $110 \pm 5^\circ\text{C}$ μέσα στον θάλαμο ξήρανσης
- Ζυγός ακριβείας μέχρι 2 δεκαδικών ψηφίων
- Αλουμινόχαρτο για την παρασκευή δοχείων για την τοποθέτηση των δειγμάτων. Στη συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήθηκε αλουμινόχαρτο διότι είναι ένα υλικό ανθεκτικό στη διάβρωση και στη μεταβολή της μάζας κατά την θέρμανση και ψύξη.
- Σπάτουλα/κουταλάκι

2.2.2 Πειραματικό Μέρος

Αρχικά παρασκευάζονται και αριθμούνται κατάλληλα τα δοχεία όπου θα τοποθετηθούν τα δείγματα εδάφους. Στη συνέχεια καθορίζεται και καταγράφεται η μάζα του κάθε δοχείου (M_c). Έπειτα τοποθετείται στο δοχείο μια ποσότητα δείγματος εδάφους ίση με περίπου 10g της οποίας η μάζα επίσης προσδιορίζεται και καταγράφεται (M_{cms}). Το έδαφος αναδεύεται επιμελώς έτσι ώστε η περιεχόμενη υγρασία του δείγματος εδάφους να είναι αντιπροσωπευτική ολόκληρου του εδάφους. Το δοχείο με το δείγμα τοποθετείται σε φούρνο ξήρανσης ρυθμισμένο στους 100°C για χρονικό διάστημα 16 ωρών. Την επόμενη μέρα, τα δοχεία με το δείγμα απομακρύνονται από τον φούρνο και η μάζα τους προσδιορίζεται και καταγράφεται ($M_{c ds}$) αφότου έρθουν σε θερμοκρασία δωματίου. Για τον προσδιορισμό της περιεχόμενης υγρασίας των εδαφών χρησιμοποιήθηκε η παρακάτω εξίσωση:

$$w = \left[\frac{M_{cms} - M_{c ds}}{M_{c ds} - M_c} \right] * 100$$

Όπου: **M_{cms}** : Mass of container and moist specimen, g

$M_{c ds}$: Mass of container and oven dry specimen, g

M_c : Mass of container, g

2.3 Εκχύλιση του ολικού DNA από τα δείγματα εδάφους

2.3.1 Θεωρητικό Μέρος

Η αδυναμία καλλιέργειας των περισσότερων μικροοργανισμών που περιέχονται σε περιβαλλοντικά δείγματα είναι ένα βασικό εμπόδιο στην κατανόηση της μικροβιακής οικολογίας και ποικιλότητας. Η χρήση τεχνικών που βασίζονται στο DNA υπερπηδά αυτό το εμπόδιο επιτρέποντας την παρακολούθηση συγκεκριμένων γονιδίων απευθείας στα

περιβαλλοντικά δείγματα (Fakruddin and Bin Mannan 2013). Το πρώτο βήμα για τον χαρακτηρισμό της μικροβιακής κοινότητας του εδάφους με μοριακές μεθόδους είναι η εξαγωγή του DNA από το έδαφος. Δύο μέθοδοι έχουν αναπτυχθεί για την απομόνωση του DNA:

- 1) Η μέθοδος άμεσης λύσης(Ogrametal., 1987)και
- 2) Η μέθοδος απομόνωσης κυττάρων(Torsvik 1980).

Η πρώτη μέθοδος βασίζεται στην άμεση λύση των κυττάρων στο έδαφος η οποία μπορεί να γίνει με μηχανικό, χημικό ή ενζυμικό τρόπο ή και με συνδυασμό τους. Μετά τη λύση το DNA εκχυλίζεται και καθαρίζεται. Ενώ στη δεύτερη μέθοδο πριν τη λύση των κυττάρων και την ανάκτηση του DNA γίνεται διαχωρισμός των κυττάρων από τα σωματίδια του εδάφους. Για την περαιτέρω ανάλυση του εκχυλισμένου DNA με μοριακές τεχνικές όπως είναι η PCR είναι απαραίτητο το DNA να είναι ελεύθερο προσμίξεων όπως πολυφαινολικά, χουμικά οξέα ή πολυσακχαρίδια και πρωτεΐνες. Η παρουσία τέτοιων ουσιών στο εκχυλισμένο DNA του εδάφους μπορούν να προκαλέσουν αναστολή της δράσης της πολυμεράσης κατά την PCR. Από μελέτες σύγκρισης των δύο μεθόδων έχει βρεθεί ότι με την μέθοδο της άμεσης λύσης εξάγεται μεγαλύτερη ποσότητα DNA ενώ με τη μέθοδο απομόνωσης κυττάρων παραλαμβάνεται DNA μεγαλύτερου μοριακού βάρους και υψηλότερης καθαρότητας. Επίσης, το DNA που εξάγεται από απομονωμένα κύτταρα προέρχεται κυρίως από βακτήρια ενώ με την μέθοδο άμεσης λύσης εξάγεται βακτηριακό και ευκαρυωτικό DNA(Roose-Amsaleg et al. 2001).

Και για τις δύο μεθόδους ένας μεγάλος αριθμός πρωτοκόλλων έχει δημοσιευτεί με διάφορες τροποποιήσεις που αποσκοπούν στη βελτίωση της ποιότητας και της ποσότητας του DNA που εκχυλίζεται. Παρόλα αυτά δεν επικρατήσει κάποια αποτελεσματική και επαναλήψιμη μεθοδολογία (Carote et al. 2012) Επίσης, διάφορα εμπορικά kit είναι διαθέσιμα για την εκχύλιση DNA από το έδαφος τα οποία χαίρουν αποδοχής από την επιστημονική κοινότητα γιατί είναι εύκολα στη χρήση και επιτρέπουν την ταυτόχρονη απομάκρυνση ανασταλτικών στοιχείων του εδάφους (π.χ. χουμικά οξέα) (Carote et al. 2012).

Τα εδάφη είναι ασυνεχή και ετερογενή περιβάλλοντα τα οποία περιέχουν μεγάλους αριθμούς ετερογενών μικροοργανισμών (O'Donovan et al. 2012). Το κύριο πρόβλημα κατά την δειγματοληψία και έρευνα στην μικροβιολογία εδάφους, είναι συνήθως η πολυπλοκότητα του ίδιου του εδάφους καθώς και οι παράγοντες που την επηρεάζουν όπως για παράδειγμα ο τύπος και τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του εδάφους, τα επίπεδα υγρασίας, το κλίμα και η χρήση ή όχι φυτοπροστατευτικών σκευασμάτων καθώς και η μικροβιολογία του(O'Donovan et al. 2012, Cahill 1999).

2.3.2 Πειραματικό Μέρος

Το ολικό DNA κάθε δείγματος εκχυλίστηκε με χρήση του εμπορικού kit«Power Soil™ DNA Isolation Kit» (MO BIO Laboratories, Inc.) σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή. Το kit χρησιμοποιεί τη μέθοδο της άμεσης λύσης των κυττάρων αξιοποιώντας συνδυασμό μηχανικών και χημικών μεθόδων. Για να επιβεβαιωθεί η ποιότητα και η ποσότητα των προϊόντων της εκχύλισης πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση σε πηκτές αγαρόζης 0,8%.

Από κάθε δείγμα εδάφους πραγματοποιήθηκαν 3 εκχυλίσσεις (a,b και c). Η συγκέντρωση του εκχυλισμένου DNA προσδιορίστηκε με χρήση του φθορισμόμετρο Qubit και παρασκευάστηκαν αραιώσεις με τελική συγκέντρωση 5ng/μl. Τα δείγματα των οποίων οι συγκεντρώσεις είναι μικρότερες ή ίσες των 5ng/μl χρησιμοποιήθηκαν ως έχουν.

2.4 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης

2.4.1 Θεωρητικό Μέρος

Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης είναι μια μέθοδος που χρησιμοποιείται στη βιοχημεία, μοριακή βιολογία και κλινική χημεία για το διαχωρισμό, την αναγνώριση και τον καθαρισμό τμημάτων DNA. Η αγαρόζη είναι ένα γραμμικό πολυμερές σακχάρων που εξάγεται από φύκια. Ιδιαίτερο χαρακτηριστικό της είναι ότι σε θερμοκρασίες 35-42°C η αγαρόζη στερεοποιείται διαμορφώνοντας μια πηκτή, ενώ αποδιατάσσεται σε θερμοκρασίες 85-95°C (Stellwagen 2009). Η στερεοποιημένη αγαρόζη σχηματίζει πόρους των οποίων το μέγεθος εξαρτάται από τη συγκέντρωση της αγαρόζης (Smith 1996). Κεντρική ιδέα της ηλεκτροφόρησης είναι ότι τα αρνητικά φορτισμένα μόρια DNA, λόγω των μορίων φωσφόρου που περιέχουν, κινούνται μέσα στο πορώδες πλέγμα της αγαρόζης υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου από τον αρνητικό προς τον θετικό πόλο του πεδίου (Brody and Kern 2004). Ο ρυθμός μετακίνησης των μορίων DNA εξαρτάται από το μέγεθος των μορίων, τη διαμόρφωση τους και το καθαρό τους φορτίο (Johnson and Grossman 1977). Η οπτικοποίηση των τμημάτων DNA επιτυγχάνεται με χρωστικές που προσδένονται στο DNA, όπως το βρωμιούχο αιθίδιο (Aaij and Borst 1972). Το βρωμιούχο αιθίδιο είναι μια κατιονική χρωστική παρεμβάλλεται ανάμεσα στα νουκλεοτίδια (Waring 1965) και φθορίζει όταν διεγείρεται με υπεριώδη ακτινοβολία (Brunk and Simpson 1977). Εκθέτοντας το πλέγμα σε υπεριώδη ακτινοβολία, τα τμήματα του DNA εμφανίζονται σαν μια σειρά από φωτεινές ζώνες, καθεμία από τις οποίες αντιστοιχεί σε ένα τμήμα συγκεκριμένου μεγέθους. Τα μεγέθη μπορούν να προσδιοριστούν μετά από σύγκριση με μόρια DNA γνωστού μεγέθους.

2.4.2 Υλικά και αντιδραστήρια

- Ρυθμιστικό διάλυμα TAE 50x (Tris-acetate-EDTA): 242 g Tris Base, 57.1 ml οξικό οξύ και 100 ml EDTA (0.5M, pH 8) προστίθενται σε 1 L ddH₂O
- Ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης 6x (Loading buffer): 5 ml γλυκερόλη, 1 ml Bromophenol blue, 0.5 ml 20x TAE και 3.5 ml ddH₂O
- Αγαρόζη
- Βρωμιούχο αιθίδιο (10 mg/ml)
- Μάρτυρας μοριακών μεγεθών τμημάτων DNA (Quick-Load® 2-Log DNA Ladder,): Αποτελείται από: τμήματα DNA γνωστού μοριακού βάρους από 100 bp μέχρι 10,002 bp., 3.3 mM Tris-HCl, 11 mM EDTA, 0.015%, 0.017% SDS και 2.5% Ficoll®-400

2.4.3 Πειραματικό Μέρος

Τα δείγματα DNA που εκχυλίστηκαν από το έδαφος ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης 0,8% προκειμένου να επιβεβαιωθεί η απόδοση της εκχύλισης. Αρχικά η πηκτή παρασκευάστηκε με διάλυση σε βρασμό της κατάλληλης ποσότητας αγαρόζης σε 1x TAE. Έπειτα στο διάλυμα προστέθηκε βρωμιούχο αιθίδιο με τελική συγκέντρωση 0,5μg/ml και μεταφέρθηκε σε ειδικά καλούπια προκειμένου να στερεοποιηθεί. Μετά τη στερεοποίηση

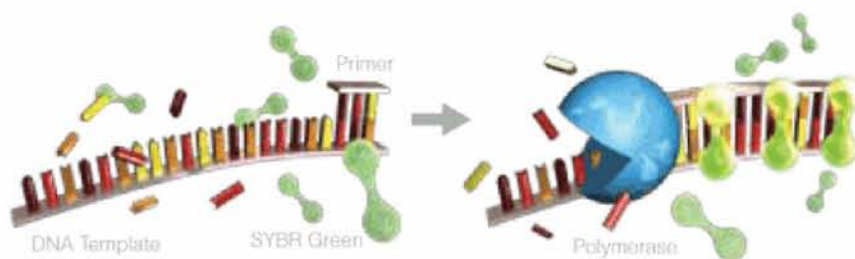
του διαλύματος, η πηκτή εμβαπτίστηκε σε διάλυμα 1x TAE και φορτώθηκαν 5μl δείγματος αναμεμειγμένα με 1μl διάλυμα φόρτωσης. Επίσης στη πηκτή φορτώθηκαν και 3μl από τον μάρτυρα μοριακών μεγεθών.

2.5 Εκτίμηση του πληθυσμού εδαφογενών φυτοπαθογόνων μυκήτων στο έδαφος με PCR πραγματικού χρόνου

2.5.1 Θεωρητικό Μέρος

Η PCR πραγματικού χρόνου αποτελεί παραλλαγή της συμβατικής PCR και χρησιμοποιείται για τον πολλαπλασιασμό, την ανίχνευση και την ποσοτικοποίηση ενός συγκεκριμένου τμήματος DNA σε πραγματικό χρόνο. Η ιδιαιτερότητα της PCR πραγματικού χρόνου έγκειται στη δυνατότητα παρακολούθησης και καταγραφής της ενίσχυσης του DNA σε όλη τη διάρκεια της αντίδρασης με τη χρήση φθοριζόντων χρωστικών.

Στη συγκεκριμένη μελέτη τα προϊόντα της PCR ανιχνεύτηκαν με την βοήθεια της χρωστικής SYBR Green, η οποία προσδένεται στο DNA και εκπέμπει φθορισμό μόνο όταν παρεμβάλλεται στην διπλή έλικα (Εικόνα 14). Η χρωστική SYBR Green δεν είναι ειδική για τη συγκεκριμένη αλληλουχία που πολλαπλασιάζεται. Αντίθετα, δεσμεύεται σε οποιοδήποτε δίκλωνο τμήμα DNA υπάρχει στο διάλυμα. Συνεπώς, η διαφοροποίηση μεταξύ του φθορισμού που εκπέμπεται από το μόριο-στόχο από τον φθορισμό άλλων δίκλωνων τμημάτων DNA που είναι δυνατόν να υπάρχουν στο διάλυμα, είναι αναγκαία. Για το λόγο αυτό μετά την ολοκλήρωση της ενίσχυσης είναι απαραίτητη η ανάλυση καμπύλης αποδιάταξης (dissociation curve), η οποία διευκολύνει την διαδικασία βελτιστοποίησης των συνθηκών. Η καμπύλη αποδιάταξης δίνει τη δυνατότητα διαχωρισμού του φθορισμού που προκύπτει από την ενίσχυση της αλληλουχίας-στόχου από τους φθορισμούς που οφείλονται στα διμερή των εκκινητών ή σε μη ειδικά προϊόντα.



Εικόνα 14 Λειτουργία χρωστικής SYBR Green. Όταν η χρωστική βρίσκεται ελεύθερη στο διάλυμα δεν παράγεται φθορισμός (αριστερά). Η ενσωμάτωσή της στο DNA κατά τη σύνθεσή του σε συνδυασμό με τη διέγερσή της με ακτινοβολία κατάλληλου μήκους κύματος, έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή φθορισμού (δεξιά). Η ένταση του φθορισμού αυτού είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του παραγόμενου προϊόντος.

Οι πληροφορίες που λαμβάνονται από την PCR πραγματικού χρόνου καταγράφονται με τη μορφή γραφημάτων, ως καμπύλες ενίσχυσης, και μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ποσοτικοποίηση των αρχικών ποσοτήτων DNA με ακρίβεια για μεγάλο εύρος ποσοτήτων. Η καμπύλη ενίσχυσης της PCR πραγματικού χρόνου μπορεί να χωριστεί σε 4 φάσεις. Την φάση στην οποία τα επίπεδα του ενδογενή φθορισμού (background fluorescence) είναι υψηλότερα από τα επίπεδα του φθορισμού που προέρχεται από τα προϊόντα των πρώτων κύκλων της PCR, την εκθετική φάση (exponential), την γραμμική φάση (linear) και την φάση κορεσμού (plateau). Κατά την διάρκεια της εκθετικής φάσης ενίσχυσης, η ποσότητα των συντιθέμενων προϊόντων είναι ανάλογη της αρχικής ποσότητας και κατά την διάρκεια αυτής της φάσης γίνεται η ποσοτικοποίηση των άγνωστων δειγμάτων. Κατά τη γραμμική φάση παρατηρείται μειωμένη παραγωγή αντιγράφων του γονιδίου – στόχου, λόγω μείωσης

των αντιδραστηρίων, ενώ κατά τη φάση κορεσμού, η αντίδραση και παραγωγή νέων αντιγράφων έχει σταματήσει λόγω εξάντλησης των αντιδραστηρίων.

Σημαντική παράμετρο για την ποσοτικοποίηση αποτελεί η τιμή Ct, που ορίζεται ως ο κύκλος κατά τον οποίο η ένταση του φθορισμού ξεπερνά μια τιμή-κατώφλι (threshold) και η ενίσχυση των προϊόντων περνά στη εκθετική φάση αύξησης. Η τιμή Ct είναι αντιστρόφως ανάλογη της λογαριθμικής τιμής της αρχικής συγκέντρωσης του γονιδίου στόχου. Συνεπώς, όσο υψηλότερη είναι η αρχική συγκέντρωση του γονιδίου-στόχου τόσο μικρότερη είναι η τιμή Ct.

Η ποσοτικοποίηση των αρχικών αλληλουχιών-στόχων ενός δείγματος με άγνωστη συγκέντρωση γίνεται με απόλυτο ή σχετικό προσδιορισμό των Ct τιμών. Στη συγκεκριμένη μελέτη έγινε απόλυτη ποσοτικοποίηση και για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των γονιδίων-στόχων στα υπό εξέταση «άγνωστα» δείγματα. Κατασκευάστηκε καμπύλη αναφοράς με ενίσχυση του γονιδίου-στόχου από διαδοχικές αραιώσεις ανασυνδυασμένων πλασμιδίων γνωστής συγκέντρωσης και στη συνέχεια καθορίστηκαν οι Ct τιμές κάθε συγκέντρωσης. Η καμπύλη αναφοράς χρησιμοποιήθηκε για την ποσοτικοποίηση των άγνωστων δειγμάτων με βάση τις Ct τιμές τους.

Στην πράξη, μία αξιόπιστη καμπύλη αναφοράς πρέπει να έχει τα εξής χαρακτηριστικά: τιμή $R^2 > 0.95$, κλίση που να κυμαίνεται από -3.0 έως -3.9 και αποτελεσματικότητα της αντίδρασης PCR, μεταξύ 80-115% (Zhang and Fang 2006).

2.5.2 Πειραματικό Μέρος

Αρχικά προσδιορίστηκαν οι συγκεντρώσεις των δειγμάτων DNA με χρήση της φθορισμομετρικής μεθόδου Qubit.

2.5.2.1 *Verticillium dahliae*

Προκειμένου να εκτιμηθεί ο πληθυσμός του εδαφογενούς φυτοπαθογόνου μύκητα *V. dahliae* στο έδαφος πραγματοποιήθηκε PCR πραγματικού χρόνου στα δείγματα DNA που εκχυλίστηκαν από τα δείγματα εδαφών. Στην περίπτωση αυτή χρησιμοποιήθηκε το ζευγάρι εκκινητών VdTubF2 και VdTubR4 (Debode et al. 2011) για την ενίσχυση ενός τμήματος 82bp του γονιδίου της β-τουμπουλίνης (Πίνακας 3). Το γονίδιο της β-τουμπουλίνης είναι μια πολύ συντηρημένη περιοχή του γονιδιώματος του *V. dahliae* η οποία χρησιμοποιείται ως εναλλακτική των rDNA περιοχών για τις φυλογενετικές αναλύσεις (Moore et al. 2002) και ήδη χρησιμοποιηθεί σε διάφορες μελέτες (Collado-Romero et al. 2008; Qin et al. 2006). Τα γονίδια της α- και β- τουμπουλίνης συνιστούν τους μικροσωληνίσκους που απαρτίζουν τον κυτταροσκελετό, την μιτωτική άτρακτο και το μαστίγιο στους ευκαρυώτες. Αυτό σημαίνει ότι εμπλέκονται σε βασικές για την επιβίωση του μικροοργανισμού λειτουργίες και επομένως είναι αρκετά καλά συντηρημένες (Moore et al. 2002)

Πίνακας 3. Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση του τμήματος 82bp του γονιδίου της β-τουμπουλίνης των μυκήτων που ανήκουν στο είδος *V. dahliae*.

Όνομα εκκινητή	Αλληλουχία	Αναφορά
VdTubF2	5'-GGCCAGT GCGTAAGTTATTCT-3'	Error! Bookmark not defined.
VdTubR4	5'-ATC TGG TTA CCC TGT TCA TCC-3'	(Debode et al. 2011)

Η PCR πραγματικού χρόνου πραγματοποιήθηκε σε σύστημα Mx3000P qPCR (Stratagen, UK) σε όλα τα περιβαλλοντικά δείγματα DNA καθώς και στη πρότυπη καμπύλη αναφοράς.

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στηνPCR πραγματικού χρόνου και οι συνθήκες πραγματοποίησης παρατίθενται στους παρακάτω πίνακες(Πίνακας 4 και 5):

Πίνακας 4 Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στηνPCR πραγματικού χρόνου για την εκτίμηση του πληθυσμού των μυκήτων που ανήκουν στο είδος *V. dahliae*

Αντιδραστήρια	Όγκος	Τελική συγκέντρωση
KAPA SYBR® FAST qPCR Master Mix (2x)	5μl	1x
VdTubF2(20μM)	0.1μl	0,2μM
VdTubR4 (20μM)	0.1μl	0,2μM
Rox Low (50x)	0.2μl	1x
BSA (20μg/μl)	0.2μl	400ng/μl
DNA	3μl	15ng/reaction
dH ₂ O	1.4μl	
Τελικός όγκος	10μl	

Πίνακας 5 Συνθήκες πραγματοποίησης της αντίδρασης PCR πραγματικού χρόνου για την εκτίμηση του πληθυσμού των μυκήτων που ανήκουν στο είδος *V. dahliae*.

	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος	Κύκλοι
Ενεργοποίηση ενζύμου	95°C	3min	1
Αποδιάταξη	95°C	15sec	40
Υβριδοποίηση/Επιμήκυνση	62°C	11sec	
Καμπύλη Αποδιάταξης	95°C	1min	1
	55°C	30sec	
	95°C	30sec	

2.5.2.2 *Fusarium oxysporum*

Προκειμένου να εκτιμηθεί να εκτιμηθεί πληθυσμός του εδαφογενούς φυτοπαθογόνου μύκητα *F. oxysporum* στο έδαφος πραγματοποιήθηκε PCR πραγματικού χρόνου στο DNA που εκχυλίστηκαν από τα δείγματα εδαφών. Στην περίπτωση αυτή χρησιμοποιήθηκε το ζευγάρι εκκινητών FOW1F και FOW4R (Li et al. 2014b)για την ενίσχυση του γονιδίου FOW1 (Πίνακας 6). Το γονίδιο FOW1 εμπλέκεται στην ανάπτυξη παθογένειας του μύκητα. Πιο συγκεκριμένα κωδικοποιεί μια μιτοχονδριακή πρωτεΐνη η οποία απαιτείται για την επιτυχή είσοδο του μύκητα στο ριζικό σύστημα του φυτού (Inoue et al. 2002).

Πίνακας 6 Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση του γονιδίου FOW των μυκήτων που ανήκουν στο είδος *F. oxysporum*.

Όνομα εκκινητή	Αλληλουχία	Αναφορά
FOW1F	5'-GGT ATC CTT GGT GGT GTC TCC-3'	(Li et al. 2014b)
FOW4R	5'-CTA CCC CAG TTG GTC ATC AGT-3'	(Li et al. 2014b)

Η PCR πραγματικού χρόνου πραγματοποιήθηκε σε σύστημα Mx3000P qPCR (Stratagen, UK) σε όλα τα περιβαλλοντικά δείγματα DNA καθώς και στη πρότυπη καμπύλη αναφοράς. Το τελικό προϊόν της ενίσχυσης που προέκυψε από την αντίδραση είχε μέγεθος 225 bp.

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στηνPCR πραγματικού χρόνου και οι συνθήκες πραγματοποίησης παρατίθενται στους παρακάτω πίνακες (Πίνακας 7 και 8):

Πίνακας 7 Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στηνPCR πραγματικού χρόνου για την εκτίμηση του πληθυσμού των μυκήτων που ανήκουν στο είδος *F. oxysporum*.

Αντιδραστήρια	Όγκος	Τελική συγκέντρωση
KAPA SYBR® FAST qPCR Master Mix (2x)	5μl	1x
FOW1F (20μM)	0.1μl	0,2μM
FOW4R (20μM)	0.1μl	0,2μM
Rox Low (50x)	0.2μl	1x
BSA (20μg/μl)	0.2μl	400ng/μl
H ₂ O	2.4μl	
DNA	2μl	10ng/reaction
Τελικός όγκος	10μl	

Πίνακας 8 Συνθήκες πραγματοποίησης της αντίδρασης PCR πραγματικού χρόνου για την εκτίμηση του πληθυσμού των μυκήτων που ανήκουν στο είδος *F. oxysporum*.

	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος	Κύκλοι
Ενεργοποίηση ενζύμου	95°C	3min	1
Αποδιάταξη	95°C	15sec	40
Υβριδοποίηση/Επιμήκυνση	58°C	30sec	
Καμπύλη Αποδιάταξης	95°C	1min	1
	55°C	30sec	
	95°C	30sec	

2.5.2.3 *Rhizoctonia solani*

Προκειμένου να εκτιμηθεί ο πληθυσμός του εδαφογενούς φυτοπαθογόνου μύκητα *R. solani* στο έδαφος πραγματοποιήθηκε PCR πραγματικού χρόνου στα DNA που εκχυλίστηκαν από τα δείγματα εδαφών. Στην περίπτωση αυτή χρησιμοποιήθηκε το ζευγάρι εκκινητών ST-RS1 και ITS4 (Lievens et al. 2005) για την ενίσχυση ενός τμήματος 145bp του γονιδιακού τόπου ITS2 (Πίνακας 9).

Πίνακας 9 Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση της περιοχής ITS του γονιδιώματος των μυκήτων που ανήκουν στο είδος *R. solani*

Όνομα εκκινητή	Αλληλουχία	Αναφορά
ST-RS1	5'-AGT GTT ATG CTT GGT TCC ACT-3'	(Lievens et al. 2005)
ITS4	5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3'	(Lievens et al. 2005)

Η PCR πραγματικού χρόνου πραγματοποιήθηκε σε σύστημα Mx3000P qPCR (Stratagen, UK) σε όλα τα περιβαλλοντικά δείγματα DNA καθώς και στη πρότυπη καμπύλη αναφοράς..

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στηνPCR πραγματικού χρόνου και οι συνθήκες πραγματοποίησης παρατίθενται στους παρακάτω πίνακες (Πίνακας 10 και 11):

Πίνακας 10 Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στηνPCR πραγματικού χρόνου για την εκτίμηση του πληθυσμού των μυκήτων που ανήκουν στο είδος *R. solani*.

Αντιδραστήρια	Όγκος	Τελική συγκέντρωση
KAPA SYBR® FAST qPCR Master Mix (2x)	5μl	1x
ST-RS1 (20μM)	0.1μl	0,2μM

ITS4 (20μM)	0.1μl	0,2μM
Rox Low (50x)	0.2μl	1x
BSA (20μg/μl)	0.2μl	400ng/μl
H ₂ O	1.2μl	
DNA	2μl	10ng/reaction
Τελικός όγκος	10μl	

Πίνακας 11 Συνθήκες πραγματοποίησης της αντίδρασης PCR πραγματικού χρόνου για την εκτίμηση του πληθυσμού των μυκήτων που ανήκουν στο είδος *R. solani*.

	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος	Κύκλοι
Ενεργοποίηση ενζύμου	95°C	3min	1
Αποδιάταξη	95°C	15sec	45
Υβριδοποίηση	60°C	20sec	
Επιμήκυνση	72°C	11sec	
Καμπύλη Αποδιάταξης	95°C	1min	1
	55°C	30sec	
	95°C	30sec	

2.5.2.4 *Pythium ultimum*

Προκειμένου να εκτιμηθεί ο πληθυσμός του εδαφογενούς φυτοπαθογόνου μύκητα *P. ultimum* στο έδαφος πραγματοποιήθηκε PCR πραγματικού χρόνου στα δείγματα DNA που εκχυλίστηκαν από τα δείγματα εδαφών. Στην περίπτωση αυτή χρησιμοποιήθηκε το ζευγάρι εκκινητών PuIF2 και PuIR2 (Spies et al. 2011) για την ενίσχυση ενός τμήματος 102bp της ITS περιοχής (Πίνακας 12).

Πίνακας 12 Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση τμήματος της περιοχής ITS του γονιδιώματος των μυκήτων που ανήκουν στο είδος *P. ultimum*.

Όνομα εκκινητή	Αλληλουχία	Αναφορά
PuIF2	5'-GCA GGA CGA AGG TTG GTC TG-3'	(Spies et al, 2011)
PuIR2	5'-GTC CCC ACA GTA TAA ATC AGT ATT TAG GT-3'	(Spies et al, 2011)

Η PCR πραγματικού χρόνου πραγματοποιήθηκε σε σύστημα Mx3000P qPCR (Stratagen, UK) σε όλα τα περιβαλλοντικά δείγματα DNA καθώς και στη πρότυπη καμπύλη αναφοράς.

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στην PCR πραγματικού χρόνου και οι συνθήκες πραγματοποίησης παρατίθενται στους παρακάτω πίνακες (Πίνακας 13 και 14):

Πίνακας 13 Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στην PCR πραγματικού χρόνου για την εκτίμηση του πληθυσμού των μυκήτων που ανήκουν στο είδος *P. ultimum*.

Αντιδραστήρια	Όγκος	Τελική συγκέντρωση
KAPA SYBR® FAST qPCR Master Mix (2x)	5μl	1x
PuIF2	0.1μl	0,2μM
PuIR2	0.1μl	0,2μM
Rox Low (50x)	0.2μl	1x
BSA (20μg/μl)	0.2μl	400ng/μl
H ₂ O	2.4μl	
DNA	2μl	10ng/reaction
Τελικός όγκος	10μl	

Πίνακας 14 Συνθήκες πραγματοποίησης της αντίδρασης PCR πραγματικού χρόνου για την εκτίμηση του πληθυσμού των μυκήτων που ανήκουν στο είδος *P. ultimum*.

	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος	Κύκλοι
Ενεργοποίηση ενζύμου	95°C	3min	1
Αποδιάταξη	95°C	15sec	40
Υβριδοποίηση	60°C	20sec	
Επιμήκυνση	72°C	11sec	
Καμπύλη Αποδιάταξης	95°C	1min	1
	55°C	30sec	
	95°C	30sec	

2.5.2.5 *Sclerotinia sclerotiorum*

Προκειμένου να εκτιμηθεί ο πληθυσμός του εδαφογενούς φυτοπαθογόνου μύκητα *S. sclerotiorum* στο έδαφος πραγματοποιήθηκε PCR πραγματικού χρόνου στα δείγματα DNA που εκχυλίστηκαν από τα δείγματα εδαφών. Στην περίπτωση αυτή χρησιμοποιήθηκε το ζευγάρι εκκινητών mtSSFor και mtSSRev (Rogers et al. 2009) για την ενίσχυση ενός τμήματος 125bp που περιλαμβάνει μέρος του μιτοχονδριακού ιντρονίου του rRNA της μικρής υπομονάδας του ριβοσώματος και της περιοχής ORF1 (OpenReadingFrame 1) (Πίνακας 15).

Πίνακας 15 Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση τμήματος του γονιδιώματος των μυκήτων που ανήκουν στο είδος *S. sclerotiorum*.

Όνομα εκκινητή	Αλληλουχία	Αναφορά
mtSSFor	5'-AGG TAA CAA GTC AGA AGA TGA TCG AAA GAG TT-3'	(Rogers et al, 2009)
mtSSRev	5'-GCA TTA AGC CTG TCC CTA AAA ACA AGG-3'	(Rogers et al, 2009)

Η PCR πραγματικού χρόνου πραγματοποιήθηκε σε σύστημα Mx3000P qPCR (Stratagen, UK) σε όλα τα περιβαλλοντικά δείγματα DNA καθώς και στη πρότυπη καμπύλη αναφοράς.

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στην PCR πραγματικού χρόνου και οι συνθήκες πραγματοποίησης παρατίθενται στους παρακάτω πίνακες (Πίνακας 16 και 17):

Πίνακας 16 Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στην PCR πραγματικού χρόνου για την εκτίμηση του πληθυσμού των μυκήτων που ανήκουν στο είδος *S. sclerotiorum*.

Αντιδραστήρια	Όγκος	Τελική συγκέντρωση
KAPA SYBR® FAST qPCR Master Mix (2x)	5μl	1x
mtSSFor	0.1μl	0,2μM
mtSSRev	0.1μl	0,2μM
Rox Low (50x)	0.2μl	1x
BSA (20μg/μl)	0.2μl	400ng/μl
H ₂ O	3.4μl	
DNA	1μl	5ng/reaction
Τελικός όγκος	10μl	

Πίνακας 17 Συνθήκες πραγματοποίησης της αντίδρασης PCR πραγματικού χρόνου για την εκτίμηση του πληθυσμού των μυκήτων που ανήκουν στο είδος *S. sclerotiorum*.

	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος	Κύκλοι
Ενεργοποίηση ενζύμου	95°C	3min	1
Αποδιάταξη	95°C	15sec	45

Υβριδοποίηση	53°C	30sec	1
Επιμήκυνση	72°C	30sec	
Καμπύλη Αποδιάταξης	95°C	1min	
	55°C	30sec	
	95°C	30sec	

2.5.2.6 *Pyrenochaeta lycopersici* τύπος I

Προκειμένου να εκτιμηθεί ο πληθυσμός του εδαφογενούς φυτοπαθογόνου μύκητα *P. lycopersici* τύπος I στο έδαφος πραγματοποιήθηκε PCR πραγματικού χρόνου στα δείγματα DNA που εκχυλίστηκαν από τα δείγματα εδαφών. Στην περίπτωση αυτή χρησιμοποιήθηκε το ζευγάρι εκκινητών P1yc1-F και P1yc1-R (Infantino and Pucci 2005) για την ενίσχυση ενός τμήματος 147bp του γονιδιακού τόπου ITS (Πίνακας 18).

Πίνακας 18 Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση τμήματος της περιοχής ITS του γονιδιώματος των μυκήτων που ανήκουν στο είδος *P. lycopersici* τύπος I.

Όνομα εκκινητή	Αλληλουχία	Αναφορά
P1yc1-F	5'-GTAGGATTGCGTGCTTTGGT-3'	(Infantino and Pucci 2005)
P1yc1-R	5'-AGT TTT CTG ACG CTG ATT GC-3'	(Infantino and Pucci 2005)

Η PCR πραγματικού χρόνου πραγματοποιήθηκε σε σύστημα Mx3000P qPCR (Stratagen, UK) σε όλα τα περιβαλλοντικά δείγματα DNA καθώς και στη πρότυπη καμπύλη αναφοράς.

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στην PCR πραγματικού χρόνου και οι συνθήκες πραγματοποίησης παρατίθενται στους παρακάτω πίνακες (Πίνακας 19 και 20):

Πίνακας 19 Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στην PCR πραγματικού χρόνου για την εκτίμηση του πληθυσμού των μυκήτων που ανήκουν στο είδος *P. lycopersici* τύπος I.

Αντιδραστήρια	Όγκος	Τελική συγκέντρωση
KAPA SYBR® FAST qPCR Master Mix (2x)	5μl	1x
P1yc1-F	0.1μl	0,2μM
P1yc1-R	0.1μl	0,2μM
Rox Low (50x)	0.2μl	1x
BSA (20μg/μl)	0.2μl	400ng/μl
H ₂ O	3.4μl	
DNA	1μl	
Τελικός όγκος	10μl	

Πίνακας 20 Συνθήκες πραγματοποίησης της αντίδρασης PCR πραγματικού χρόνου για την εκτίμηση του πληθυσμού των μυκήτων που ανήκουν στο είδος *P. lycopersici* τύπος I.

	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος	Κύκλοι
Ενεργοποίηση ενζύμου	95°C	3min	1
Αποδιάταξη	95°C	15sec	45
Υβριδοποίηση	63°C	20sec	
Επιμήκυνση	72°C	11sec	1
Καμπύλη Αποδιάταξης	95°C	1min	
	55°C	30sec	
	95°C	30sec	

2.5.2.7 *Pyrenochaeta lycopersici* τύπος II

Προκειμένου να εκτιμηθεί ο πληθυσμός του εδαφογενούς φυτοπαθογόνου μύκητα *P. lycopersici* τύπος II στο έδαφος πραγματοποιήθηκε PCR πραγματικού χρόνου στα δείγματα DNA που εκχυλίστηκαν από τα δείγματα εδαφών. Στην περίπτωση αυτή χρησιμοποιήθηκε το ζευγάρι εκκινητών P1yc2-F και P1yc2-R (Infantino and Pucci 2005) για την ενίσχυση ενός τμήματος 209bp του γονιδιακού τόπου ITS (Πίνακας 21).

Πίνακας 21 Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση τμήματος της περιοχής ITS του γονιδιώματος των μυκήτων που ανήκουν στο είδος *P. lycopersici* τύπος II.

Όνομα εκκινητή	Αλληλουχία	Αναφορά
P1yc2-F	5'-CTG CAA CAT TGG GGG CTG GT-3'	(Infantino and Pucci 2005)
P1yc2-R	5'-CGA TGC CAG AAC CAA GAG AT-3'	(Infantino and Pucci 2005)

Η PCR πραγματικού χρόνου πραγματοποιήθηκε στο σύστημα CFXManager (BioRad) σε όλα τα περιβαλλοντικά δείγματα DNA καθώς και στη πρότυπη καμπύλη αναφοράς.

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στην PCR πραγματικού χρόνου και οι συνθήκες πραγματοποίησης παρατίθενται στους παρακάτω πίνακες (Πίνακας 22 και 23):

Πίνακας 22 Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στην PCR πραγματικού χρόνου για την εκτίμηση του πληθυσμού των μυκήτων που ανήκουν στο είδος *Pyrenochaeta lycopersici* τύπος II.

Αντιδραστήρια	Όγκος	Τελική συγκέντρωση
KAPA SYBR® FAST qPCR Master Mix (2x)	5μl	1x
P1yc2-F	0.1μl	0,2μM
P1yc2-R	0.1μl	0,2μM
Rox Low (50x)	0.2μl	1x
BSA (20μg/μl)	0.2μl	400ng/μl
H ₂ O	3.4μl	
DNA	1μl	
Τελικός όγκος	10μl	

Πίνακας 23 Συνθήκες πραγματοποίησης της αντίδρασης PCR πραγματικού χρόνου για την εκτίμηση του πληθυσμού των μυκήτων που ανήκουν στο είδος *Pyrenochaeta lycopersici* τύπος II.

	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος	Κύκλοι
Ενεργοποίηση ενζύμου	95°C	3min	1
Αποδιάταξη	95°C	15sec	45
Υβριδοποίηση	58°C	20sec	
Επιμήκυνση	72°C	11sec	
Καμπύλη Αποδιάταξης	95°C	1min	1
	55°C	30sec	
	95°C	30sec	

2.6 Κατασκευή πρότυπης καμπύλης αναφοράς

Σε όλες τις περιπτώσεις, ο πληθυσμός των φυτοπαθογόνων μυκήτων εκτιμήθηκε με την χρήση εξωτερικής καμπύλης αναφοράς που προετοιμάστηκε όπως περιγράφεται παρακάτω. Αρχικά, πραγματοποιήθηκε PCR ενίσχυση σε δείγματα DNA από τους μύκητες *Verticillium dahliae*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani*, *Pythium ultimum*, *Sclerotinia sclerotiorum*,

Pyrenochaeta lycopersici τύπος I και II που περιέχονται στην συλλογή του εργαστηρίου, με την χρήση των ζευγών εκκινητών που περιγράφηκαν παραπάνω για καθένα από τα παθογόνα. Ακολούθησε καθαρισμός των προϊόντων της PCR αντίδρασης με το kit «NucleoSpin ExtractII» της Macherey-Nagel. Στη συνέχεια ακολούθησε ένθεση του καθαρού τμήματος DNA στον πλασμιδιακό φορέα pGEM-TEasy (Promega) σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή. Ακολούθησε εισαγωγή του πλασμιδιακού φορέα με μετασχηματισμό σε δεκτικά κύτταρα *E.coli* DH5α. Συγκεκριμένα, σε 90 μl δεκτικών κυττάρων προστέθηκαν 5 μl από την αντίδραση της λιγάσης και το μίγμα ανακινήθηκε ελαφρά. Ακολούθησε επώαση στον πάγο για 30min και στη συνέχεια προκλήθηκε θερμικό σοκ στους 42°C για 55sec. Τα κύτταρα επανατοποθετήθηκαν στον πάγο για 2min και προστέθηκαν 200μl LB. Ακολούθησε επώαση στους 37°C για 60min. Στη συνέχεια, προστέθηκαν στα κύτταρα 50μl X-GAL (2%) και 10μl IPTG (0,1M) και ο συνολικός όγκος της καλλιέργειας επιστρώθηκε σε τρυβλία θρεπτικού υποστρώματος LB με αμπικιλίνη (100μg/ml). Τα τρυβλία επώαστηκαν στους 37°C για 16 ώρες. Μετά την ανάπτυξη των αποικιών, πραγματοποιήθηκε επιλογή λευκών αποικιών και εμβολιασμός τους σε 5ml θρεπτικού διαλύματος LB με αμπικιλίνη. Ακολούθησε επώαση με συνεχή ανάδευση στους 37°C για 16 ώρες. Μετά το πέρας των 16 ωρών, πραγματοποιήθηκε απομόνωση του πλασμιδιακού DNA με το kit «NucleoSpinPlasmid» (MACHEREY-NAGEL) και σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή.

Στα πλασμίδια που απομονώθηκαν εφαρμόστηκε PCR με τα ζεύγη εκκινητών που αναφέρθηκαν παραπάνω για κάθε φυτοπαθογόνο για την επιβεβαίωση της ύπαρξης του σωστού ενθέματος - γονιδίου στο πλασμίδιο. Ακολούθησε μέτρηση του φθορισμού (260nm) των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων (QubitFluorometric Quantitation) και μετατροπή της συγκέντρωσης σε αριθμό αντιγράφων σύμφωνα με τον τύπο (Whelanetal. 2003):

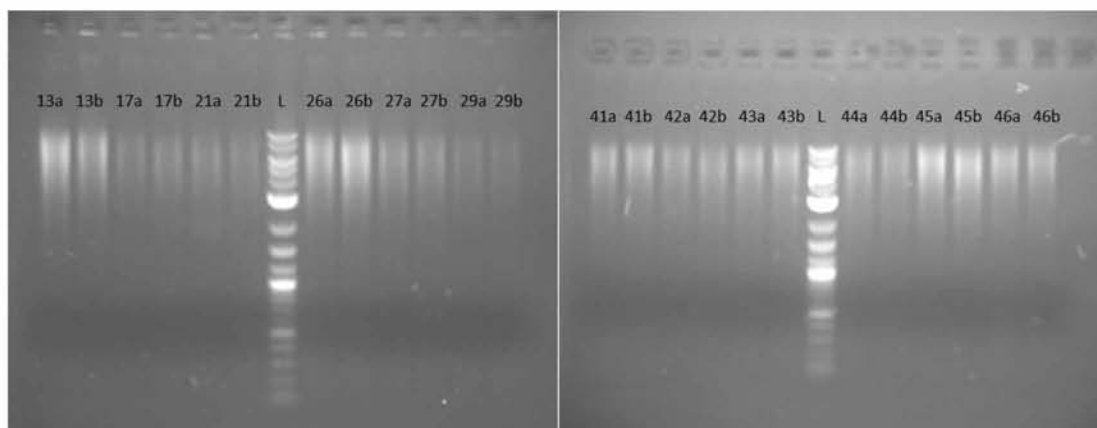
$$DNA(copy) = \frac{6.02 * 10^{23} (copies mol^{-1}) * DNA amount (g)}{DNA length (bp) * 660 (g mol^{-1}bp^{-1})}$$

Τέλος, έγιναν διαδοχικές αραιώσεις για την κατασκευή των καμπυλών αναφοράς. Σε κάθε περίπτωση, χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 3 επαναλήψεις από τις αραιώσεις 10⁶ έως 10⁰.

3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Εκχύλιση ολικού DNA από τα δείγματα εδαφών

Για τον έλεγχο της απόδοσης της εκχύλισης και της ποιότητας (θραύση ή λύση) του DNA που εκχυλίστηκε από τα επιμέρους δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν 5μl από κάθε δείγμα DNA σε πηκτή αγαρόζης 0.8% με 1μl loading buffer και 3μl μάρτυρα γνωστών μοριακών μεγεθών και συγκεντρώσεων DNA (Ladder) (Εικόνα 15 και 16).



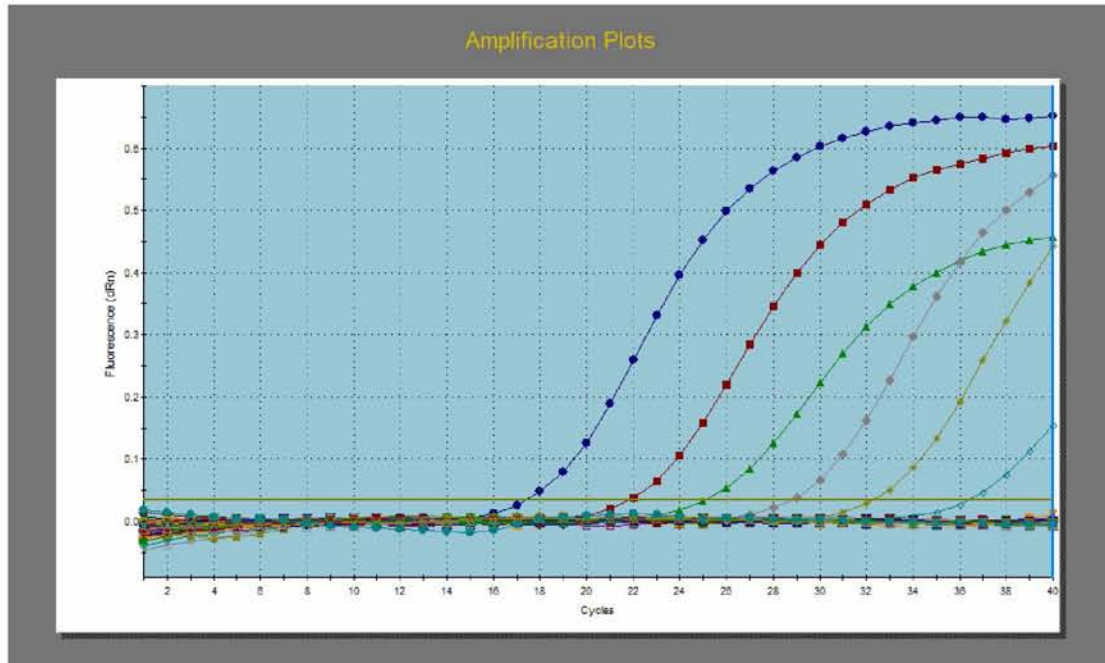
Εικόνα 15&16. Ενδεικτικές εικόνες ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αγαρόζης 0,8% του εκχυλισμένου DNA από τα δείγματα εδάφους. L: 10kb DNA Ladder

Η συγκέντρωση του εκχυλισμένου DNA κάθε δείγματος εδάφους μετρήθηκε με χρήση φθορισμόμετρου Qubit. Οι μετρήσεις αναγράφονται στο ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 2.

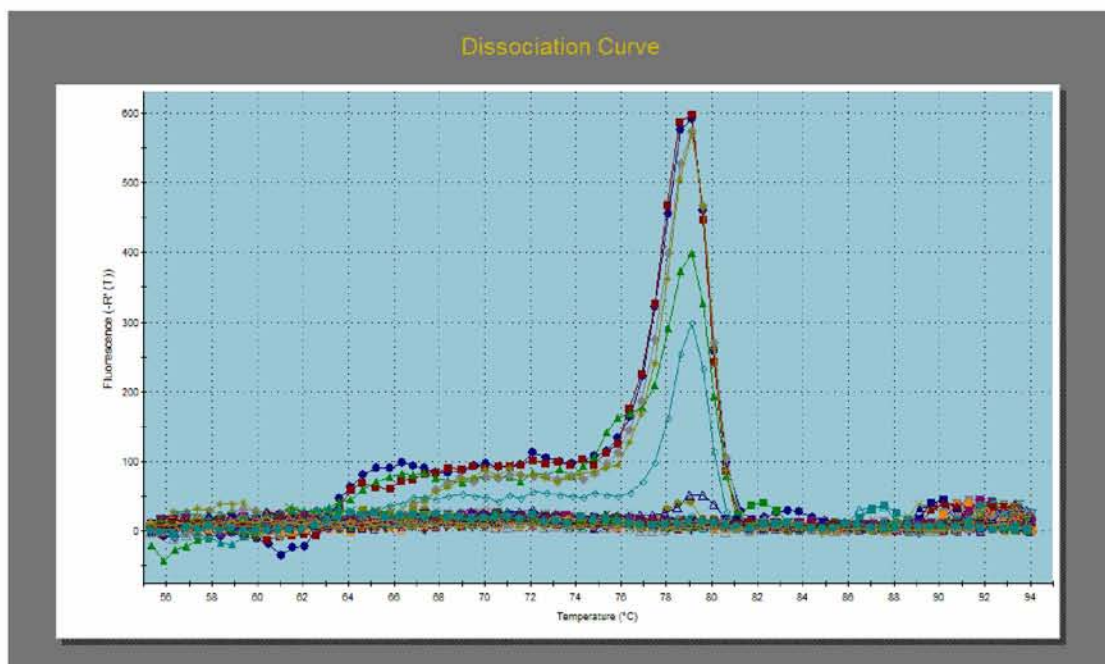
3.2 Εκτίμηση του πληθυσμού των κυριότερων φυτοπαθογόνων εδαφογενών μυκήτων

3.2.1 *Verticillium dahliae*

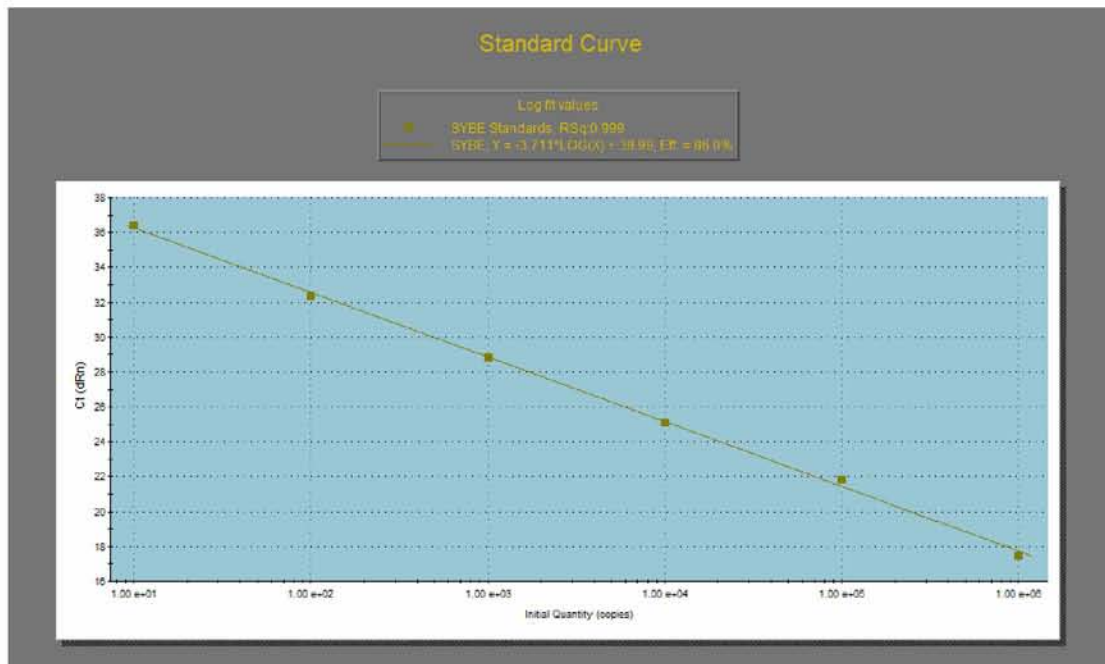
Παρακάτω παρουσιάζονται ενδεικτικές καμπύλες ενίσχυσης, αποδιάταξης και αναφοράς της PCR πραγματικού χρόνου για την εκτίμηση του πληθυσμού των μυκήτων του γένους *V. dahliae* (Σχήματα 1,2,3). Οι καμπύλες αναφοράς εμφανίζουν πολύ καλή γραμμικότητα ($r^2 = 0,999$) σε εύρος από 10^1 ως και 10^6 αντίγραφα του τμήματος του γονιδίου της β -τουμπουλίνης. Όπως φαίνεται από την καμπύλη αποδιάταξης παρατηρήθηκε μια κορυφή στους 79.1°C που αντιστοιχεί στο προϊόν – στόχο.



Σχήμα 1 Ενδεικτική καμπύλη ενίσχυσης της αντίδρασης PCR πραγματικού χρόνου για την εκτίμηση της αφθονίας του μύκητα *Verticillium dahliae* στα δείγματα εδάφους.



Σχήμα 2 Ενδεικτική καμπύλη αποδιάταξης της αντίδρασης PCR πραγματικού χρόνου για την εκτίμηση της αφθονίας του μύκητα *Verticillium dahliae* στα δείγματα εδάφους.

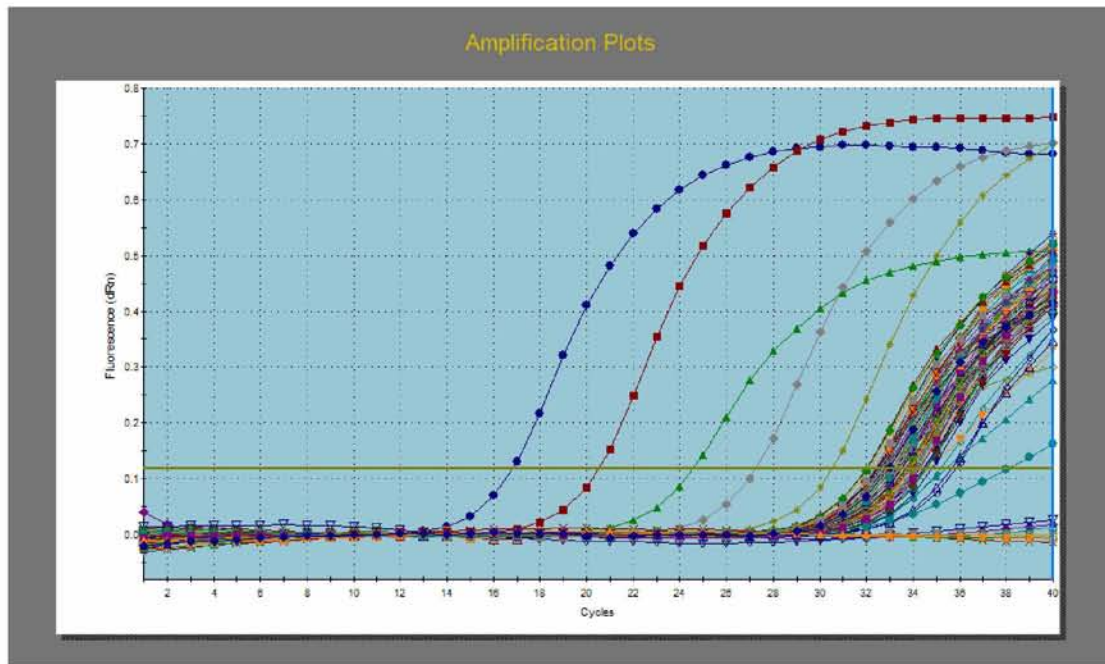


Σχήμα 3 Ενδεικτική καμπύλη αναφοράς της αντίδρασης PCR πραγματικού χρόνου για την εκτίμηση του πληθυσμού του μύκητα *Verticillium dahliae* στα δείγματα εδάφους.

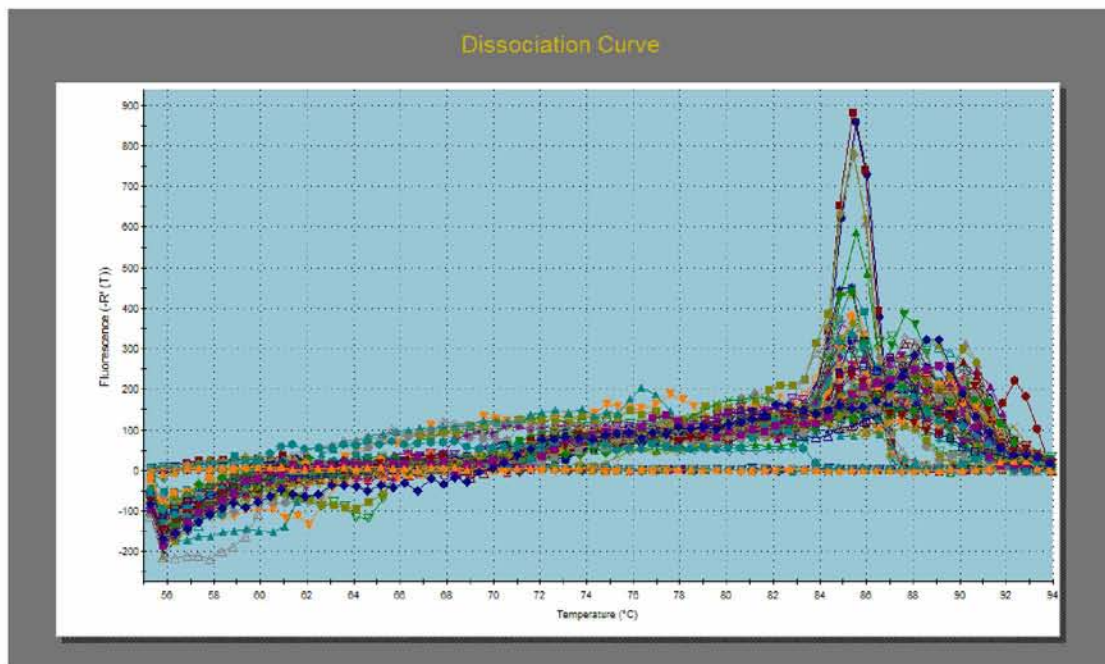
Από την ανάλυση των δειγμάτων εδάφους προέκυψε ότι τα επίπεδα του πληθυσμού του μύκητα *Verticillium dahliae* βρίσκονται σε επίπεδα χαμηλότερα από το όριο ανίχνευσης της μεθόδου.

3.2.2 *Fusarium oxysporum*

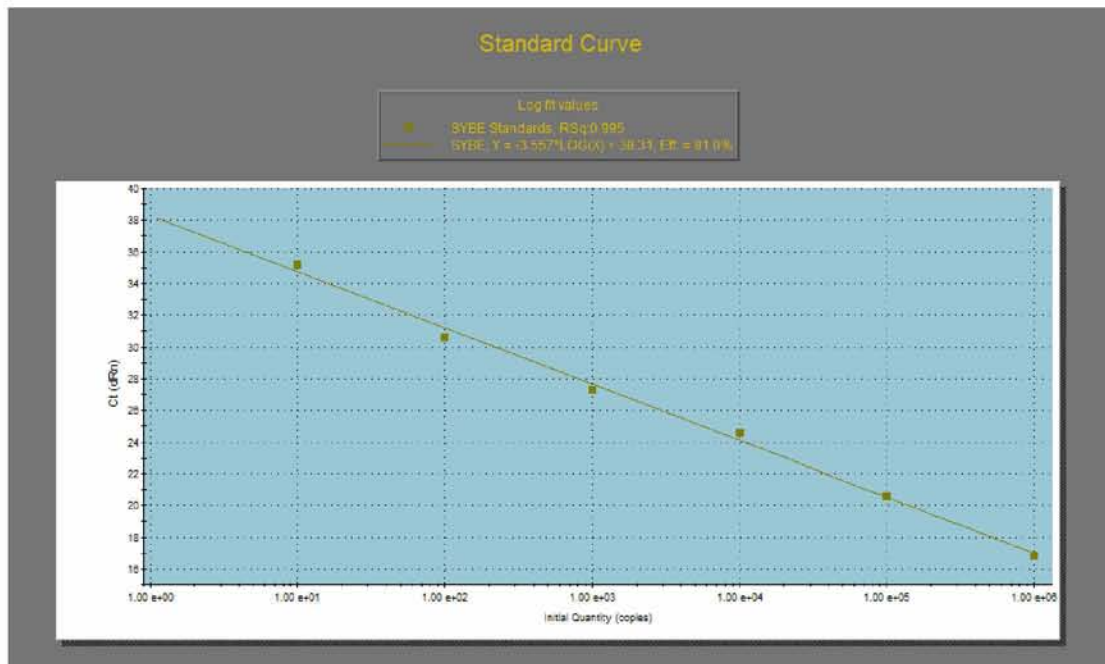
Παρακάτω παρουσιάζονται ενδεικτικές καμπύλες ενίσχυσης, αποδιάταξης και αναφοράς για την PCR πραγματικού χρόνου για την εκτίμηση της αφθονίας των μυκήτων του γένους *F. oxysporum* (Σχήματα 4,5,6). Οι καμπύλες αναφοράς εμφανίζουν πολύ καλή γραμμικότητα ($r^2 = 0,995$) σε εύρος από 10^1 ως και 10^6 αντίγραφα του γονιδίου FOW1. Όπως φαίνεται από την καμπύλη αποδιάταξης, παρατηρήθηκε μια κορυφή στους 85.5°C που αντιστοιχεί στο προϊόν – στόχο (όπως επιβεβαιώθηκε και με ηλεκτροφόρηση των προϊόντων που προέκυψαν από την PCR πραγματικού χρόνου). Τα δείγματα που εμφάνισαν κορυφή στην καμπύλη αποδιάταξης σε υψηλότερη θερμοκρασία θεωρήθηκαν ως αρνητικά και δεν εκτιμήθηκαν περαιτέρω.



Σχήμα 4 Ενδεικτική καμπύλη ενίσχυσης της αντίδρασης PCR πραγματικού χρόνου για την εκτίμηση της αφθονίας του μύκητα *Fusarium oxysporum* στα δείγματα εδάφους.



Σχήμα 5 Ενδεικτική καμπύλη αποδιάταξης της αντίδρασης PCR πραγματικού χρόνου για την εκτίμηση της αφθονίας του μύκητα *Fusarium oxysporum* στα δείγματα εδάφους



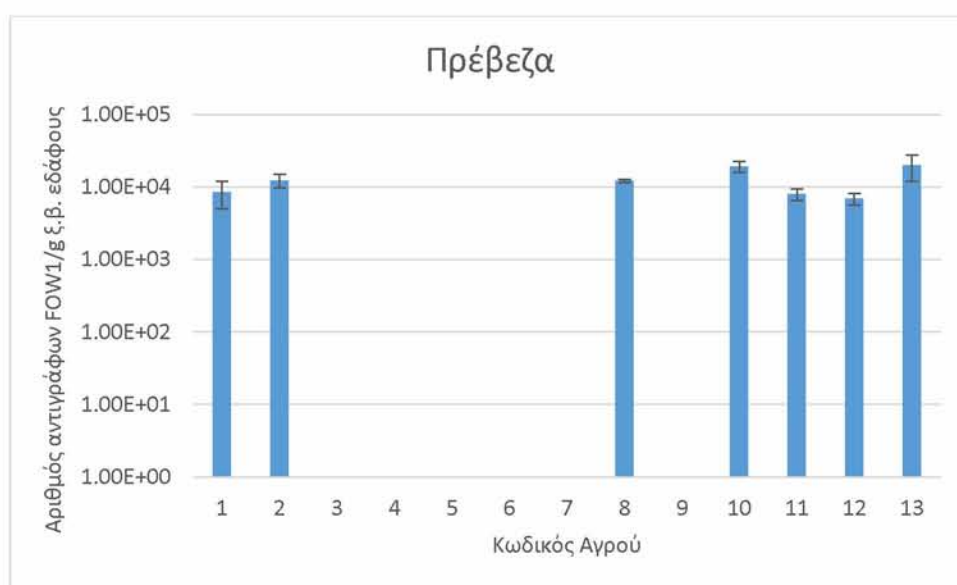
Σχήμα 6 Ενδεικτική καμπύλη αναφοράς της αντίδρασης PCR πραγματικού χρόνου για την εκτίμηση της αφθονίας του μύκητα *Fusarium oxysporum* στα δείγματα εδάφους

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα 24 και στα γραφήματα 1 έως 4. Γενικότερα καταγράφηκαν πληθυσμοί του μύκητα *Fusarium oxysporum*, σε επίπεδα υψηλότερα από το όριο ανίχνευσης της μεθόδου, σε αρκετά εδάφη από σχεδόν όλες τις περιοχές που μελετήθηκαν. Μοναδική εξαίρεση αποτέλεσαν τα 12 δείγματα από την περιοχή της Ιεράπετρας όπου ο πληθυσμός του μύκητα όπως προσδιορίστηκε με την μέθοδο q-PCR βρισκόταν σε επίπεδα χαμηλότερα από το όριο ανίχνευσης της μεθόδου. Να τονιστεί ότι στο δείγμα 2 μόνο 2 από τις 3 επαναλήψεις έδωσαν τιμές υψηλότερες από το όριο ανίχνευσης της μεθόδου (Πίνακας 24, τιμές με έντονο χρώμα).

Πίνακας 24 Ο αριθμός αντιγράφων του γονιδίου FOW1 του *F. oxysporum* ανά gr ξηρού βάρους εδάφους στα εδαφικά δείγματα που αξιολογήθηκαν. Παρουσιάζεται ο μέσος όρος τριών επαναλήψεων και η τυπική απόκλιση. Κ.ο.α: δηλώνει ότι οι τιμές ήταν κάτω από το όριο ανίχνευσης της μεθόδου.

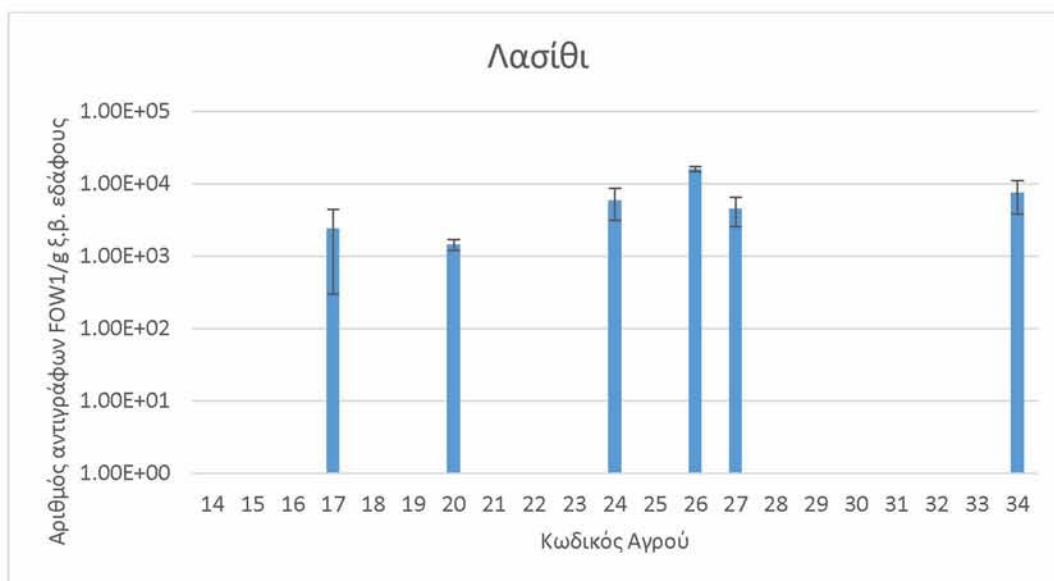
#	Προέλευση	Αριθμός αντιγρ. /γεδάφους ξ.β.	Τυπική απόκλιση	#	Προέλευση	Αριθμός αντιγρ. /g εδάφους ξ.β.	Τυπική απόκλιση
1	Πρέβεζα	8.55x10 ³	3.5x10 ³	39	Γιαννιτσοχώρι	κ.ο.α	-
2	Πρέβεζα	1.2x10⁴	2.6x10 ³	40	Τερψιθέα	κ.ο.α	-
3	Πρέβεζα	κ.ο.α	-	41	Τερψιθέα	1.1x10 ⁴	5.8x10 ³
4	Πρέβεζα	κ.ο.α	-	42	Λαγκουβάρδος	κ.ο.α	-
5	Πρέβεζα	κ.ο.α	-	43	Τερψιθέα	κ.ο.α	-
6	Πρέβεζα	κ.ο.α	-	44	Φιλιατρά	2.8x10 ³	5.7x10 ²
7	Πρέβεζα	κ.ο.α	-	45	Αγ. Κυριακή	8.8x10 ³	3.2x10 ³
8	Πρέβεζα	1.2x10 ⁴	6.1x10 ²	46	Φιλιατρά	κ.ο.α	-
9	Πρέβεζα	κ.ο.α	-	47	Λασίθι, Ιεράπετρα	κ.ο.α	-
10	Πρέβεζα	1.9x10 ⁴	3.5x10 ³	48	Λασίθι, Ιεράπετρα	κ.ο.α	-
11	Πρέβεζα	7.9x10 ³	1.5x10 ³	49	Λασίθι, Ιεράπετρα	κ.ο.α	-
12	Πρέβεζα	6.9x10 ³	1.3x10 ³	50	Λασίθι, Ιεράπετρα	κ.ο.α	-

13		1.99×10^4	7.9×10^3	51	Λασίθι, Ιεράπετρα	κ.ο.α	-
14	Λασίθι	κ.ο.α	-	52	Λασίθι, Ιεράπετρα	κ.ο.α	-
15	Λασίθι	κ.ο.α	-	53	Λασίθι, Ιεράπετρα	κ.ο.α	-
16	Λασίθι	κ.ο.α	-	54	Λασίθι, Ιεράπετρα	κ.ο.α	-
17	Λασίθι	2.4×10^3	2.1×10^3	55	Λασίθι, Ιεράπετρα, Χωστό	κ.ο.α	-
18	Λασίθι	κ.ο.α	-	56	Λασίθι, Ιεράπετρα, Γαβρίλης	κ.ο.α	-
19	Λασίθι	κ.ο.α	-	57	Λασίθι, Ιεράπετρα, Γούδουρα ς	κ.ο.α	-
20	Λασίθι	1.5×10^3	2.5×10^2	58	Λασίθι, Ιεράπετρα, Γούδουρα ς	κ.ο.α	-
21	Λασίθι	κ.ο.α	-	59	Ηράκλειο, Τυμπάκι	κ.ο.α	-
22	Λασίθι	κ.ο.α	-	60	Ηράκλειο, Τυμπάκι	κ.ο.α	-
23	Λασίθι	κ.ο.α	-	61	Ηράκλειο, Τυμπάκι	1.5×10^4	1.6×10^3
24	Λασίθι	5.9×10^3	2.8×10^3	62	Ηράκλειο, Τυμπάκι	κ.ο.α	-
25	Λασίθι	κ.ο.α	-	63	Ηράκλειο, Τυμπάκι	κ.ο.α	-
26	Λασίθι	1.6×10^4	1.3×10^3	64	Ηράκλειο, Τυμπάκι	κ.ο.α	-
27	Λασίθι	4.5×10^3	1.9×10^3	65	Ηράκλειο, Τυμπάκι	κ.ο.α	-
28	Λασίθι	κ.ο.α	-	66	Ηράκλειο, Τυμπάκι	κ.ο.α	-
29	Λασίθι	κ.ο.α	-	67	Ηράκλειο, Τυμπάκι	κ.ο.α	-
30	Λασίθι	κ.ο.α	-	68	Ηράκλειο, Τυμπάκι	2.9×10^4	3.7×10^3
31	Λασίθι	κ.ο.α	-	69	Ηράκλειο, Τυμπάκι	κ.ο.α	-
32	Λασίθι	κ.ο.α	-	70	Ηράκλειο, Τυμπάκι	κ.ο.α	-
33	Λασίθι	κ.ο.α	-	71	Ηράκλειο, Τυμπάκι	1.9×10^3	9.1×10^2
34	Λασίθι	7.4×10^3	3.6×10^3	72	Ηράκλειο, Τυμπάκι	κ.ο.α	-
35	Απρίλης	1.7×10^4	2.1×10^3	73	Ηράκλειο, Τυμπάκι	8.1×10^4	9.7×10^3
36	Αγ. Κυριακή	4.8×10^3	7.9×10^2	74	Ηράκλειο, Τυμπάκι	1.8×10^4	1.1×10^3
37	Αγ. Κυριακή	4.3×10^3	2.7×10^3	75	Ηράκλειο, Τυμπάκι	κ.ο.α	-
38	Λιμενάρι	κ.ο.α	-				

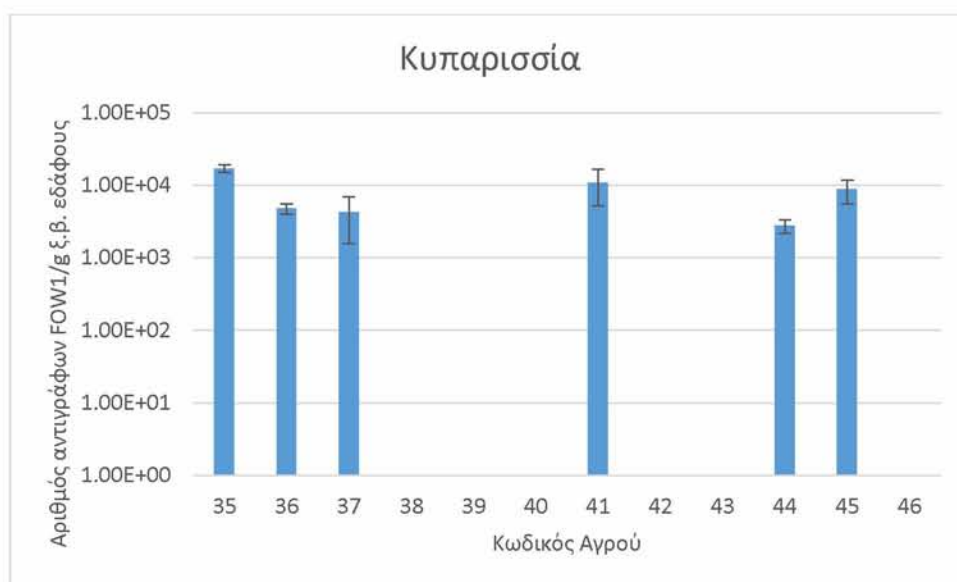


Γράφημα 1. Η αφθονία των μυκήτων του είδους *F. oxysporum* σε δείγματα εδάφους από την περιοχή της Πρέβεζας όπως προσδιορίστηκε με την μέθοδο PCR πραγματικού χρόνου και εκφράστηκε ως αριθμός

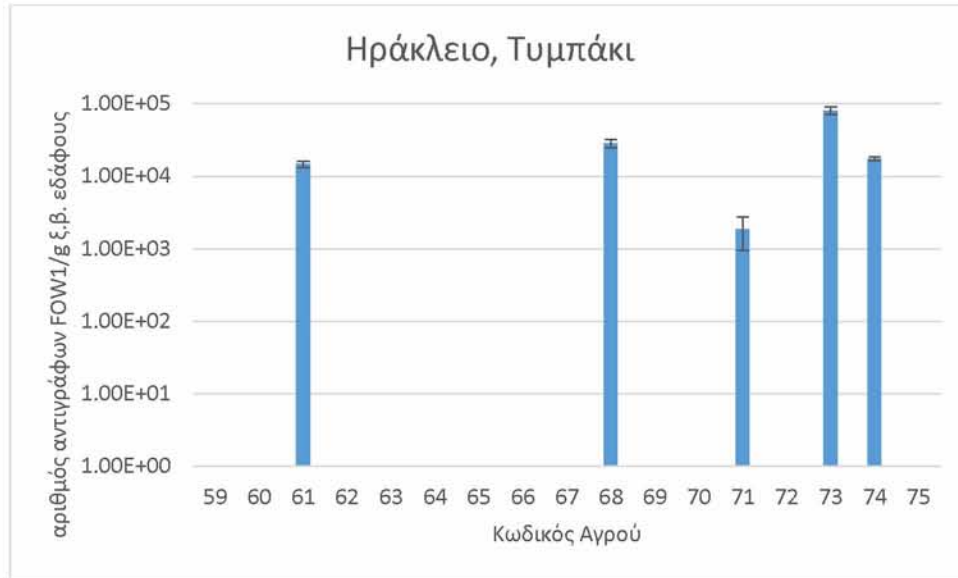
αντιγράφων του γονιδίου FOW1 ανά γραμμάριο ξηρού βάρους εδάφους. Κάθε τιμή είναι ο μέσος όρος των επαναλήψεων \pm την τυπική απόκλιση



Γράφημα 2. Η αφθονία των μυκήτων του είδους *F. oxysporum* σε δείγματα εδάφους από την περιοχή του Λασιθίου όπως προσδιορίστηκε με την μέθοδο PCR πραγματικού χρόνου και εκφράστηκε ως αριθμός αντιγράφων του γονιδίου FOW1 ανά γραμμάριο ξηρού βάρους εδάφους. Κάθε τιμή είναι ο μέσος όρος των επαναλήψεων \pm την τυπική απόκλιση.



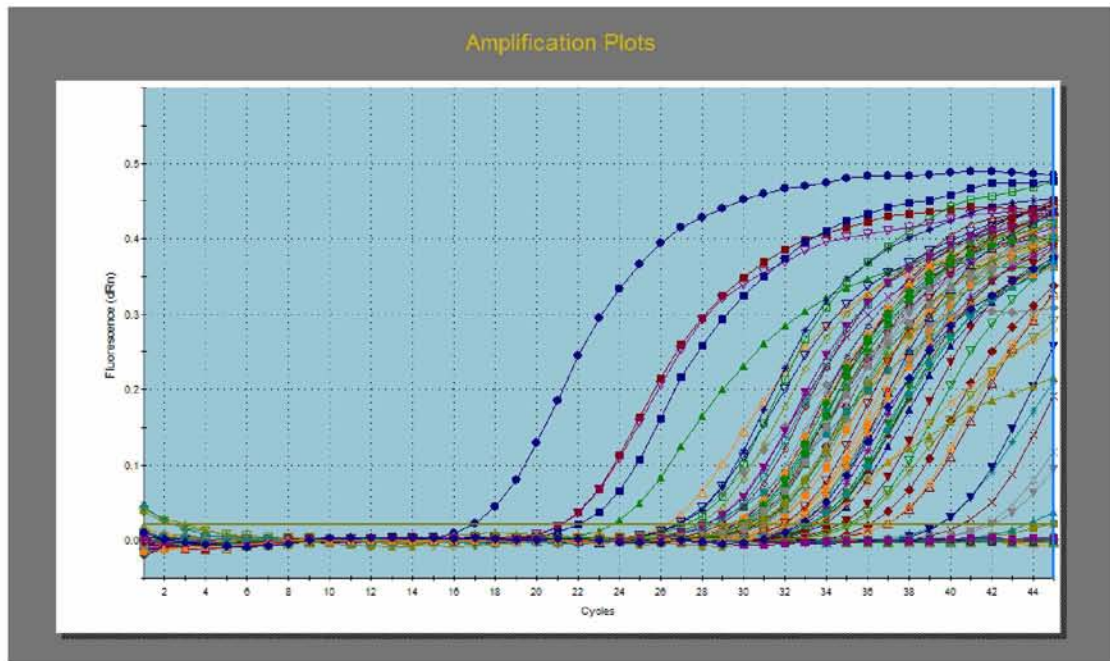
Γράφημα 3. Η αφθονία των μυκήτων του είδους *F. oxysporum* σε δείγματα εδάφους από την περιοχή της Κυπαρισσίας όπως προσδιορίστηκε με την μέθοδο PCR πραγματικού χρόνου και εκφράστηκε ως αριθμός αντιγράφων του γονιδίου FOW1 ανά γραμμάριο ξηρού βάρους εδάφους. Κάθε τιμή είναι ο μέσος όρος των επαναλήψεων \pm την τυπική απόκλιση.



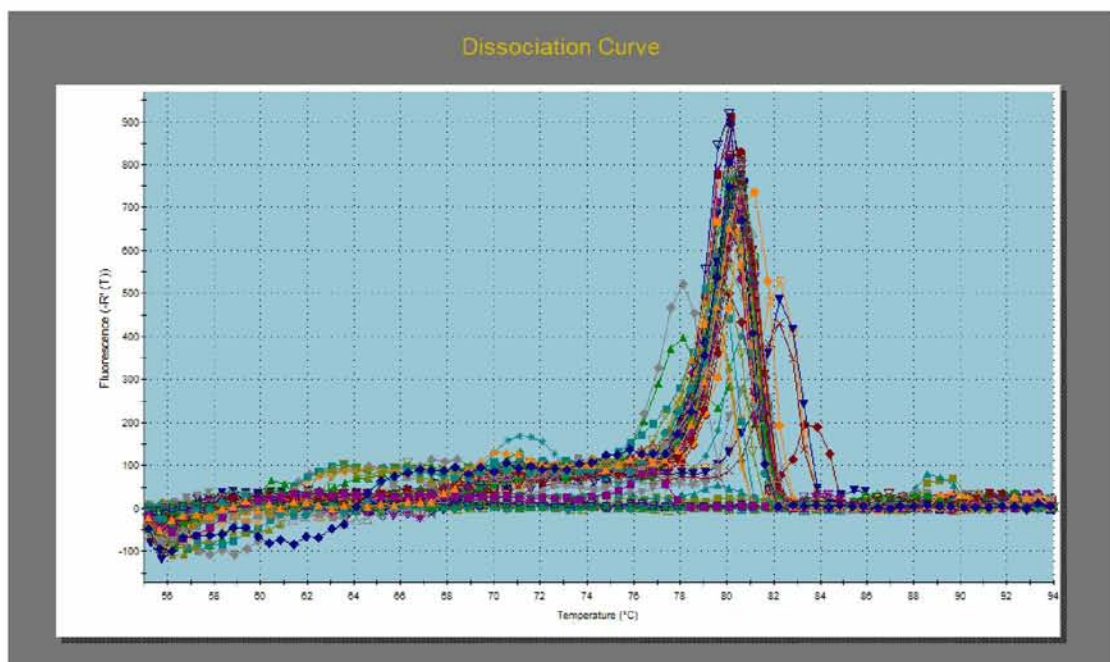
Γράφημα 4. Η αφθονία των μυκήτων του γένους *F. oxysporum* σε δείγματα εδάφους από την περιοχή του Τυμπακίου όπως προσδιορίστηκε με την μέθοδο PCR πραγματικού χρόνου και εκφράστηκε ως αριθμός αντιγράφων του γονιδίου FOW1 ανά γραμμάριο ξηρού βάρους εδάφους. Κάθε τιμή είναι ο μέσος όρος των επαναλήψεων ± την τυπική απόκλιση.

3.2.3 *Rhizoctonia solani*

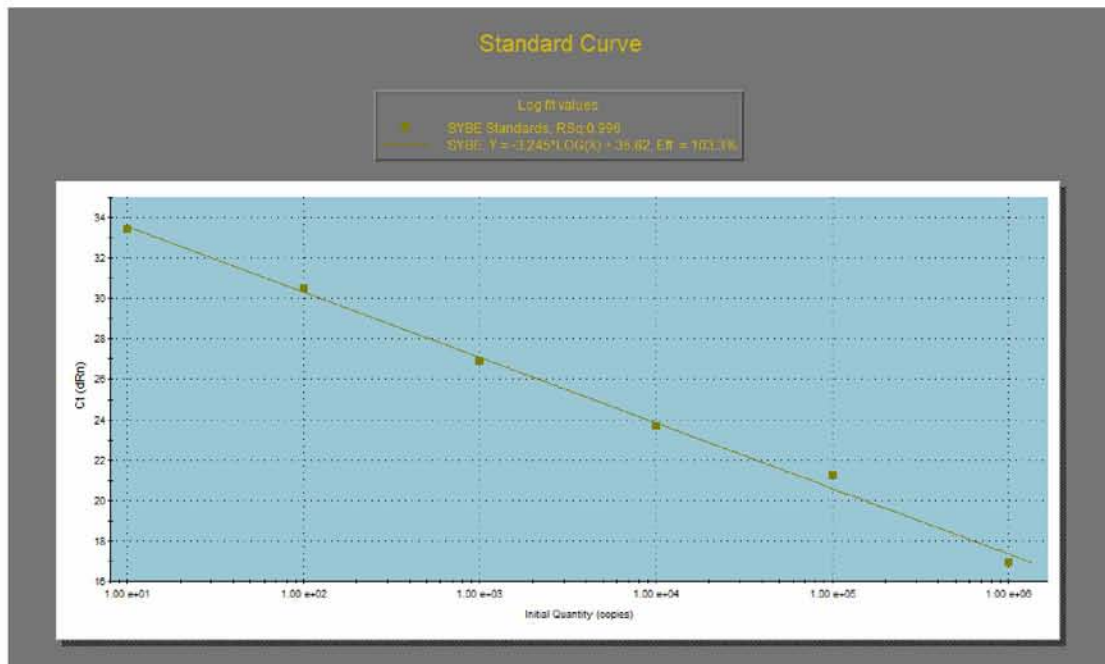
Παρακάτω παρουσιάζονται ενδεικτικές καμπύλες ενίσχυσης, αποδιάταξης και αναφοράς για την PCR πραγματικού χρόνου για την εκτίμηση της αφθονίας των μυκήτων του είδους *R. solani* (Σχήματα 7,8,9). Οι καμπύλες αναφοράς εμφανίζουν πολύ καλή γραμμικότητα ($r^2 = 0,996$) σε εύρος 10^1 ως και 10^6 αντίγραφα του γονιδιακού τόπου ITS2. Όπως φαίνεται από την καμπύλη αποδιάταξης, παρατηρήθηκε, στην συντριπτική πλειοψηφία των δειγμάτων, μια κορυφή στους 80°C που αντιστοιχεί στο προϊόν – στόχο. Δείγματα που έδωσαν στην καμπύλη αποδιάταξης κορυφή σε άλλη θερμοκρασία θεωρήθηκαν ως μη θετικά στην παρουσία *R. solani*.



Σχήμα 7 Ενδεικτική καμπύλη ενίσχυσης της αντίδρασης PCR πραγματικού χρόνου για την εκτίμηση της αφθονίας του μύκητα *Rhizoctonia solani* στα δείγματα εδάφους.



Σχήμα 8 Ενδεικτική καμπύλη αποδιάταξης της αντίδρασης PCR πραγματικού χρόνου για την εκτίμηση της αφθονίας του μύκητα *Rhizoctonia solani* στα δείγματα εδάφους.



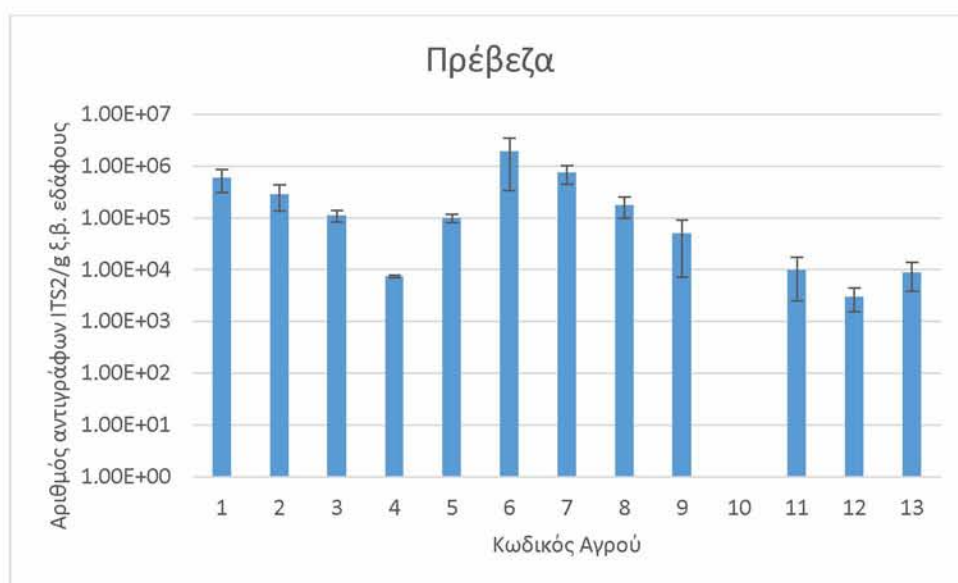
Σχήμα 9 Καμπύλη αναφοράς της αντίδρασης PCR πραγματικού χρόνου για την εκτίμηση της αφθονίας του μύκητα *Rhizoctonia solani* στα δείγματα εδάφους

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα 25 και στα γραφήματα 5 έως 9. Γενικότερα καταγράφηκαν πληθυσμοί του μύκητα *Rhizoctonia solani*, σε επίπεδα υψηλότερα από το όριο ανίχνευσης της μεθόδου, σχεδόν σε όλα τα εδάφη όλων των περιοχών από όπου έγινε η δειγματοληψία. Να τονιστεί ότι στα δείγματα 4, 11, 22, 23, 45, 47, 48, 50, 72 και 74 μόνο 2 από τις 3 επαναλήψεις έδωσαν τιμές υψηλότερες από το όριο ανίχνευσης της μεθόδου (Πίνακας 25, τιμές με έντονο χρώμα).

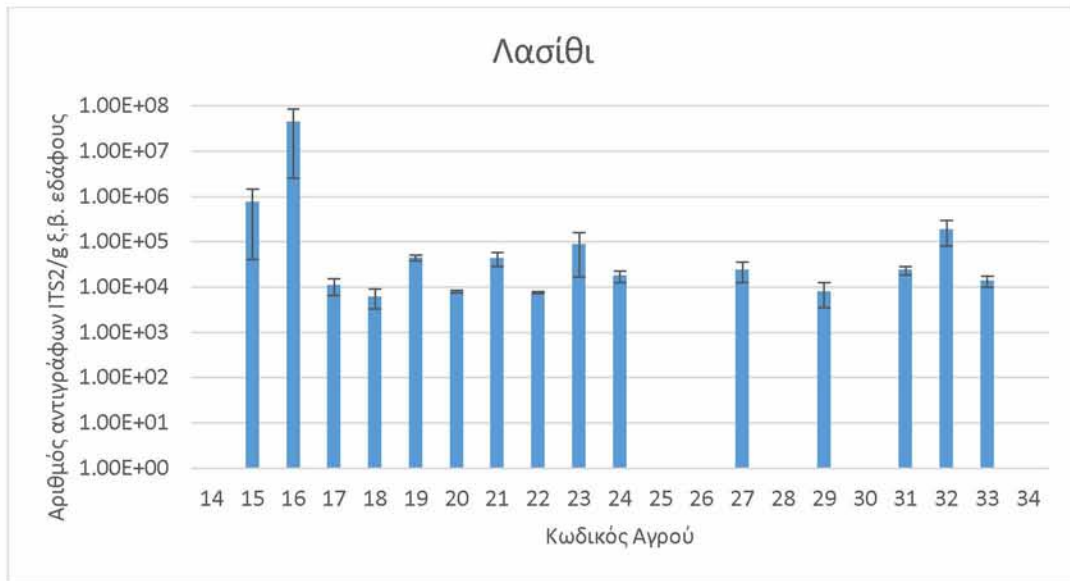
Πίνακας 25. Ο αριθμός αντιγράφων του γονιδιακού τόπου ITS2 του μύκητα *Rhizoctonia solani* ανά g ξηρού βάρους εδάφους στα εδαφικά δείγματα που αξιολογήθηκαν. Παρουσιάζεται ο μέσος όρος τριών επαναλήψεων και η τυπική απόκλιση. Κ.ο.α. δηλώνει ότι οι τιμές ήταν κάτω από το όριο ανίχνευσης της μεθόδου.

#	Προέλευση	Αριθμός αντιγρ. /g εδάφους ξ.β.	Τυπική απόκλιση	#	Προέλευση	Αριθμός αντιγρ. /g εδάφους ξ.β.	Τυπική απόκλιση
1	Πρέβεζα	5.9x10 ⁵	2.81E+05	39	Γιαννιτσοχώρι	κ.ο.α	-
2	Πρέβεζα	2.9x10 ⁵	1.50E+05	40	Τερψιθέα	1.6x10 ⁷	7.6x10 ⁶
3	Πρέβεζα	1.1x10 ⁵	2.79E+04	41	Τερψιθέα	2.6x10 ⁴	2.5x10 ⁴
4	Πρέβεζα	7.5x10³	3.65E+02	42	Λαγκουβάρδος	1.0x10 ⁵	1.5x10 ⁴
5	Πρέβεζα	9.9x10 ⁴	1.79E+04	43	Τερψιθέα	8.2x10 ³	1.7x10 ³
6	Πρέβεζα	1.9x10 ⁶	1.59E+06	44	Φιλιατρά	2.1x10 ⁴	1.6x10 ⁴
7	Πρέβεζα	7.4x10 ⁵	2.91E+05	45	Αγ. Κυριακή	5.1x10³	1.1x10 ³
8	Πρέβεζα	1.8x10 ⁵	7.60E+04	46	Φιλιατρά	κ.ο.α	-
9	Πρέβεζα	4.95x10 ⁴	4.24E+04	47	Λασίθι, Ιεράπετρα	6.9x10³	2.8x10 ³
10	Πρέβεζα	κ.ο.α	-	48	Λασίθι, Ιεράπετρα	1.6x10⁴	3.7x10 ³
11	Πρέβεζα	9.95x10³	7.48E+03	49	Λασίθι, Ιεράπετρα	κ.ο.α	-
12	Πρέβεζα	3x10 ³	1.5x10 ³	50	Λασίθι, Ιεράπετρα	6.3x10³	3.8x10 ²
13		8.8x10 ³	5.0x10 ³	51	Λασίθι, Ιεράπετρα	κ.ο.α	-
14	Λασίθι	κ.ο.α	-	52	Λασίθι, Ιεράπετρα	κ.ο.α	-

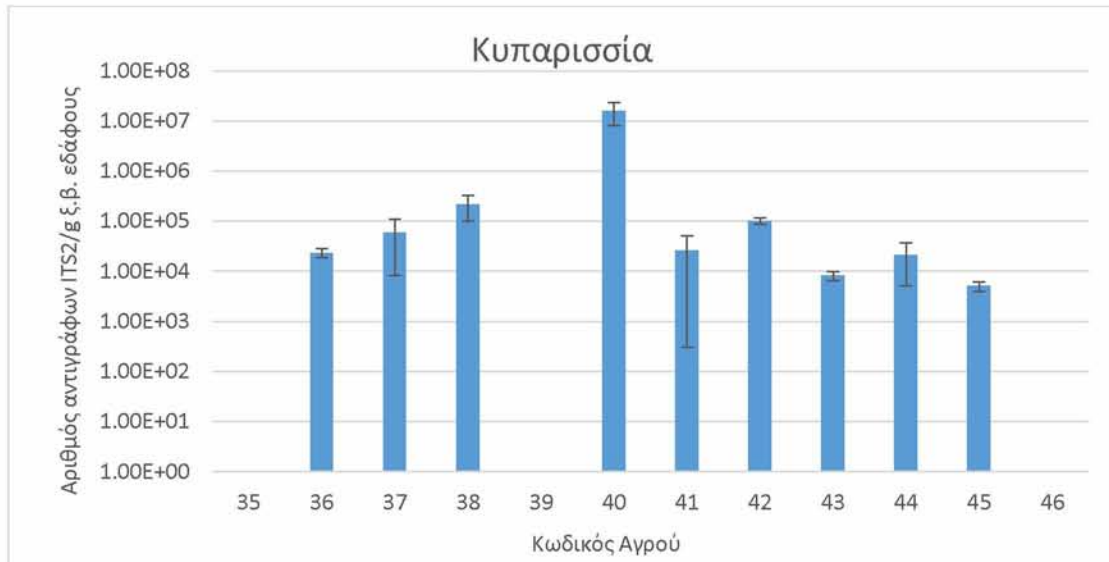
15	Λασίθι	7.5×10^5	7.1×10^5	53	Λασίθι, Ιεράπετρα	κ.ο.α	-
16	Λασίθι	4.4×10^7	4.2×10^7	54	Λασίθι, Ιεράπετρα	5.5×10^4	2.4×10^4
17	Λασίθι	1.1×10^4	4.4×10^3	55	Λασίθι, Ιεράπετρα, Χωστό	1.5×10^4	1.5×10^4
18	Λασίθι	6.1×10^3	2.9×10^3	56	Λασίθι, Ιεράπετρα, Γαβρίλης	κ.ο.α	-
19	Λασίθι	4.4×10^4	6.9×10^3	57	Λασίθι, Ιεράπετρα, Γούδουρας	κ.ο.α	-
20	Λασίθι	7.95×10^3	5.0×10^2	58	Λασίθι, Ιεράπετρα, Γούδουρας	4.1×10^3	7.5×10^2
21	Λασίθι	4.3×10^4	1.5×10^4	59	Ηράκλειο, Τυμπάκι	κ.ο.α	-
22	Λασίθι	7.5×10^3	3.1×10^2	60	Ηράκλειο, Τυμπάκι	κ.ο.α	-
23	Λασίθι	8.8×10^4	7.1×10^4	61	Ηράκλειο, Τυμπάκι	8.1×10^3	4.1×10^3
24	Λασίθι	1.8×10^4	5.2×10^3	62	Ηράκλειο, Τυμπάκι	κ.ο.α	-
25	Λασίθι	κ.ο.α	-	63	Ηράκλειο, Τυμπάκι	κ.ο.α	-
26	Λασίθι	κ.ο.α	-	64	Ηράκλειο, Τυμπάκι	2.9×10^5	1.6×10^5
27	Λασίθι	2.4×10^4	1.2×10^4	65	Ηράκλειο, Τυμπάκι	4.1×10^4	2.9×10^4
28	Λασίθι	κ.ο.α	-	66	Ηράκλειο, Τυμπάκι	2.9×10^6	2.9×10^6
29	Λασίθι	7.95×10^3	4.5×10^3	67	Ηράκλειο, Τυμπάκι	κ.ο.α	-
30	Λασίθι	κ.ο.α	-	68	Ηράκλειο, Τυμπάκι	1.9×10^4	1.8×10^3
31	Λασίθι	2.4×10^4	4.9×10^3	69	Ηράκλειο, Τυμπάκι	κ.ο.α	-
32	Λασίθι	1.9×10^5	1.1×10^5	70	Ηράκλειο, Τυμπάκι	κ.ο.α	-
33	Λασίθι	1.4×10^4	3.6×10^3	71	Ηράκλειο, Τυμπάκι	2.95×10^4	2.3×10^4
34	Λασίθι	κ.ο.α	-	72	Ηράκλειο, Τυμπάκι	7.9×10^4	7.1×10^3
35	Απρίλης	κ.ο.α	-	73	Ηράκλειο, Τυμπάκι	2.4×10^5	5.8×10^4
36	Αγ. Κυριακή	2.3×10^4	4.8×10^3	74	Ηράκλειο, Τυμπάκι	7.1×10^3	5.1×10^3
37	Αγ. Κυριακή	5.9×10^4	5.1×10^4	75	Ηράκλειο, Τυμπάκι	κ.ο.α	-
38	Λιμενάρι	2.2×10^5	1.1×10^5				



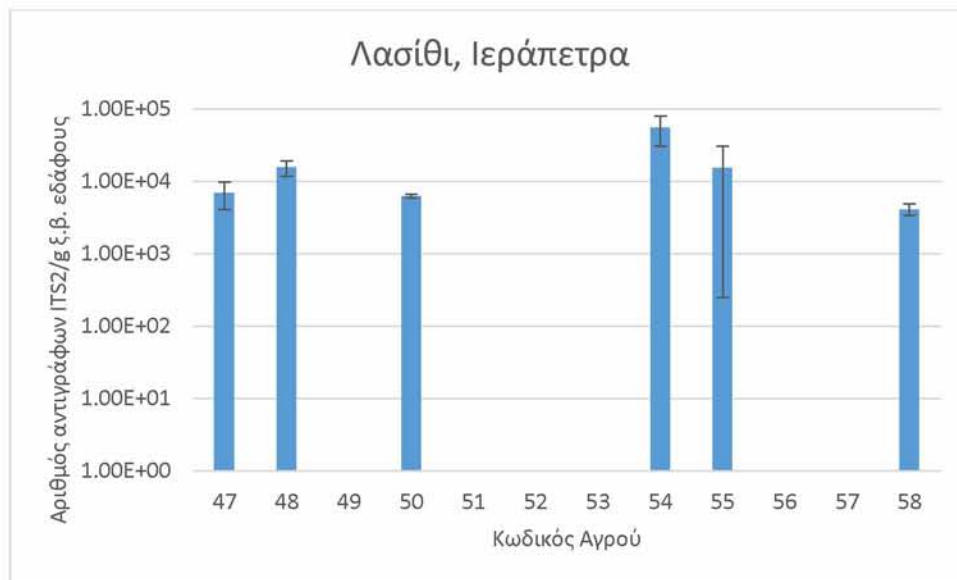
Γράφημα 5. Η αφθονία των μυκήτων του είδους *R. solani* σε δείγματα εδάφους από την περιοχή της Πρέβεζας όπως προσδιορίστηκε με την μέθοδο PCR πραγματικού χρόνου και εκφράστηκε ως αριθμός αντιγράφων του γονιδιακού τόπου ITS2 ανά γραμμάριο ξηρού θάρους εδάφους. Κάθε τιμή είναι ο μέσος όρος των επαναλήψεων ± την τυπική απόκλιση.



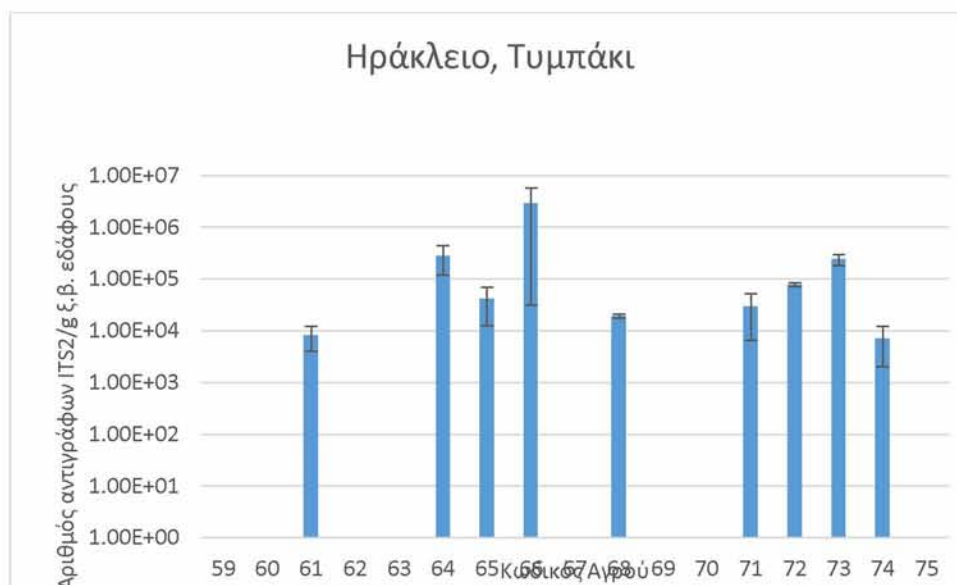
Γράφημα 6. Η αφθονία των μυκήτων του είδους *R. solani* σε δείγματα εδάφους από την περιοχή του Λασιθίου όπως προσδιορίστηκε με την μέθοδο PCR πραγματικού χρόνου και εκφράστηκε ως αριθμός αντιγράφων του γονιδιακού τόπου ITS2 ανά γραμμάριο ξηρού βάρους εδάφους. Κάθε τιμή είναι ο μέσος όρος των επαναλήψεων ± την τυπική απόκλιση.



Γράφημα 7. Η αφθονία των μυκήτων του είδους *R. solani* σε δείγματα εδάφους από την περιοχή της Κυπαρισσίας όπως προσδιορίστηκε με την μέθοδο PCR πραγματικού χρόνου και εκφράστηκε ως αριθμός αντιγράφων του γονιδιακού τόπου ITS2 ανά γραμμάριο ξηρού βάρους εδάφους. Κάθε τιμή είναι ο μέσος όρος των επαναλήψεων ± την τυπική απόκλιση.



Γράφημα 8. Η αφθονία των μυκήτων του είδους *R. solani* σε δείγματα εδάφους από την περιοχή της Ιεράπετρας όπως προσδιορίστηκε με την μέθοδο PCR πραγματικού χρόνου και εκφράστηκε ως αριθμός αντιγράφων του γονιδιακού τόπου ITS2 ανά γραμμάριο ξηρού βάρους εδάφους. Κάθε τιμή είναι ο μέσος όρος των επαναλήψεων \pm την τυπική απόκλιση.

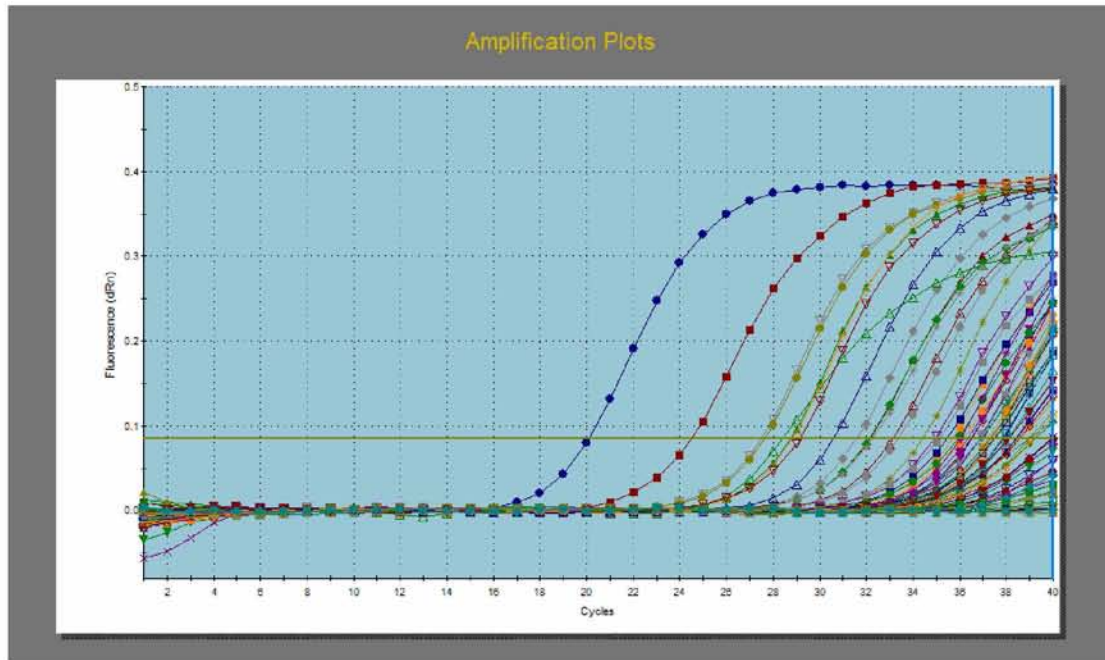


Γράφημα 9. Η αφθονία των μυκήτων του είδους *R. solani* σε δείγματα εδάφους από την περιοχή του Τυμπακίου όπως προσδιορίστηκε με την μέθοδο PCR πραγματικού χρόνου και εκφράστηκε ως αριθμός αντιγράφων του γονιδιακού τόπου ITS2 ανά γραμμάριο ξηρού βάρους εδάφους. Κάθε τιμή είναι ο μέσος όρος των επαναλήψεων \pm την τυπική απόκλιση.

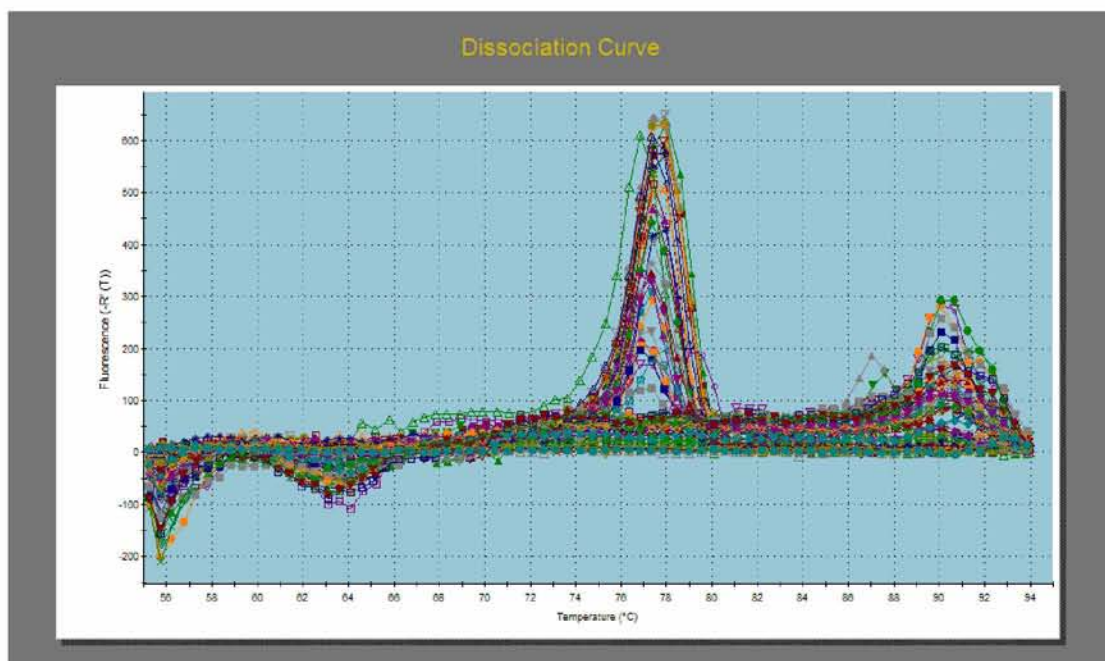
3.2.4 *Pythium ultimum*

Παρακάτω παρουσιάζονται ενδεικτικές καμπύλες ενίσχυσης, αποδιάταξης και αναφοράς της PCR πραγματικού χρόνου για την εκτίμηση της αφθονίας των μυκήτων του είδους *P. ultimum* (Σχήματα 10,11,12). Οι καμπύλες αναφοράς εμφανίζουν πολύ καλή γραμμικότητα ($r^2 = 0,995$) σε εύρος αντιγράφων από 10^1 ως και 10^6 αντίγραφα του γονιδιακού τόπου ITS.

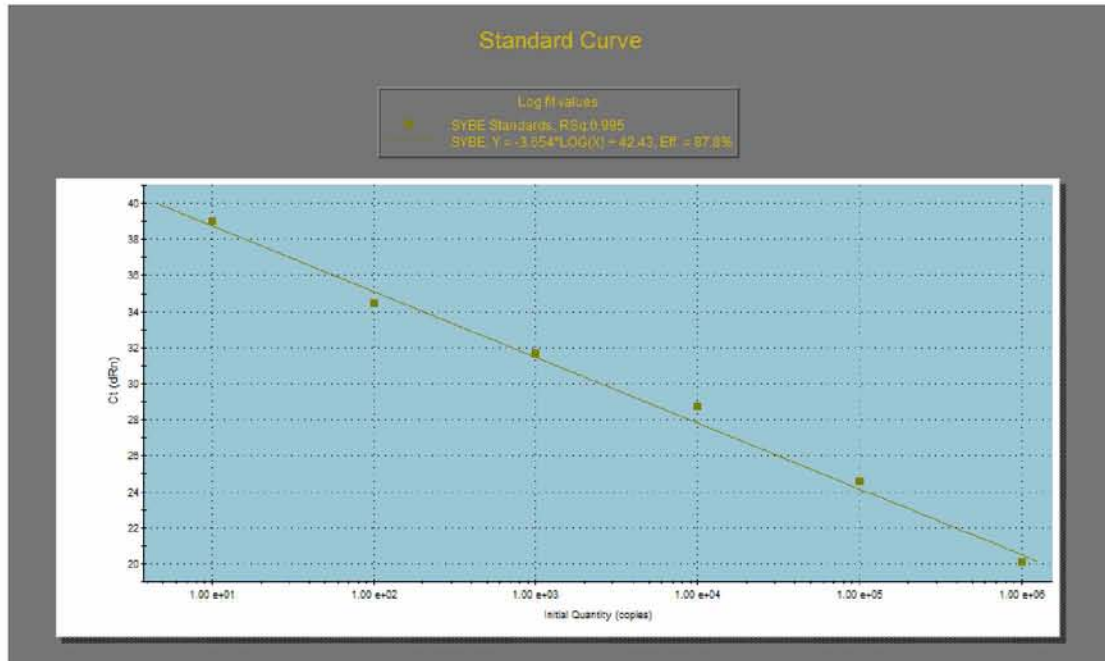
Όπως φαίνεται από την καμπύλη αποδιάταξης, παρατηρήθηκε, στην συντριπτική πλειοψηφία των δειγμάτων, μια κορυφή στους 78°C που αντιστοιχεί στο προϊόν – στόχο. Δείγματα που έδωσαν στην καμπύλη αποδιάταξης κορυφή σε άλλη θερμοκρασία θεωρήθηκαν ως μη θετικά στην παρουσία *P. ultimum*.



Σχήμα 10 Ενδεικτική καμπύλη ενίσχυσης της αντίδρασης PCR πραγματικού χρόνου για την εκτίμηση της αφθονίας του μύκητα *Rythium ultimum* στα δείγματα εδάφους.



Σχήμα 11 Ενδεικτική καμπύλη αποδιάταξης της αντίδρασης PCR πραγματικού χρόνου για την εκτίμηση της αφθονίας του μύκητα *Rythium ultimum* στα δείγματα εδάφους



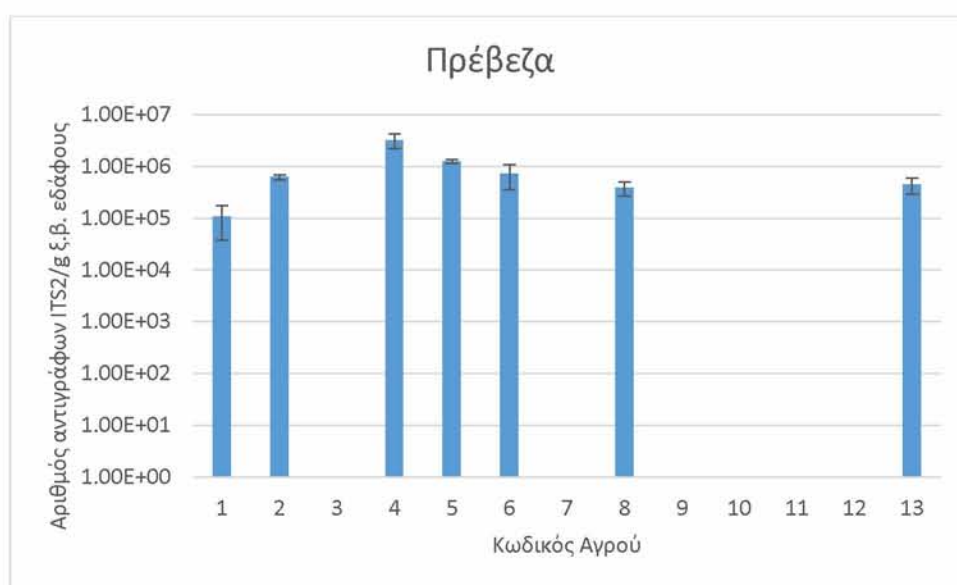
Σχήμα 12 Καμπύλη αναφοράς της αντίδρασης PCR πραγματικού χρόνου για την εκτίμηση της αφθονίας του μύκητα *Rhizium ultimum* στα δείγματα εδάφους

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα 26 και στα γραφήματα 10 έως 14. Γενικότερα καταγράφηκαν πληθυσμοί του μύκητα *Rhizium ultimum*, σε επίπεδα υψηλότερα από το όριο ανίχνευσης της μεθόδου, στο 1/3 περίπου των εδαφών. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι στο Λασιίθι και στην Ιεράπετρα μόνο ένα πολύ μικρό ποσοστό των εδαφών εμφάνισαν πληθυσμούς *P. ultimum* σε επίπεδα υψηλότερα από το όριο ανίχνευσης. Να τονιστεί ότι στα δείγματα 1, 8, 50 και 72 μόνο 2 από τις 3 επαναλήψεις έδωσαν τιμές υψηλότερες από το όριο ανίχνευσης της μεθόδου (Πίνακας 26, τιμές με έντονο χρώμα).

Πίνακας 26. Ο αριθμός αντιγράφων του γονιδιακού τόπου ITS του μύκητα *Rhizium ultimum* ανά gr ξηρού βάρους εδάφους στα εδαφικά δείγματα που αξιολογήθηκαν. Παρουσιάζεται ο μέσος όρος τριών επαναλήψεων και η τυπική απόκλιση. Κ.ο.α. δηλώνει ότι οι τιμές ήταν κάτω από το όριο ανίχνευσης της μεθόδου.

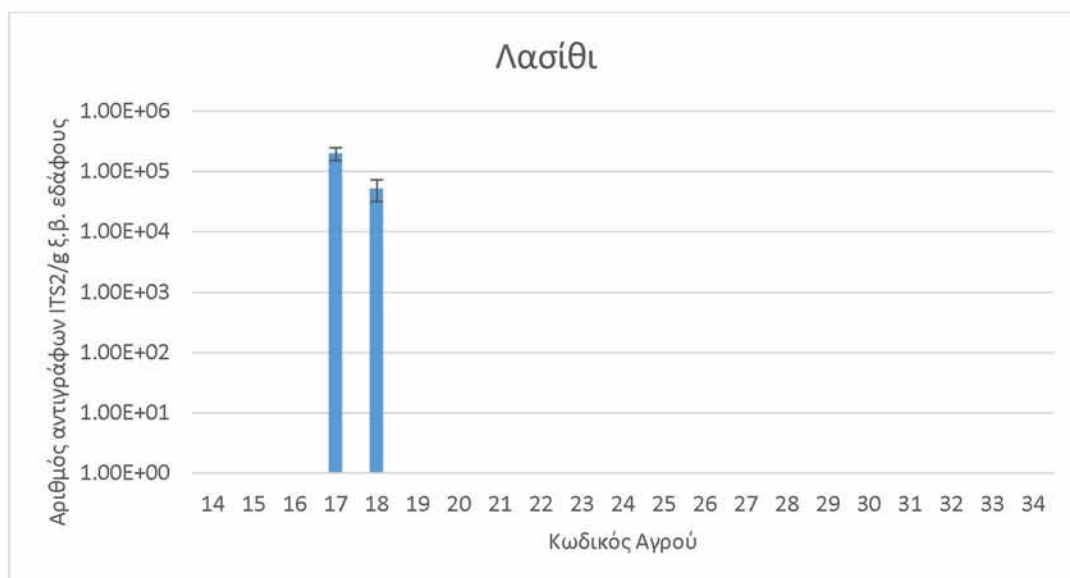
#	Προέλευση	Αριθμός αντιγρ. /g εδάφους ξ.β.	Τυπική απόκλιση	#	Προέλευση	Αριθμός αντιγρ. /g εδάφους ξ.β.	Τυπική απόκλιση
1	Πρέβεζα	1.1x10⁵	6.9x10 ⁴	39	Γιαννιτσοχώρι	1.9x10 ⁵	1.0x10 ⁵
2	Πρέβεζα	6.2x10 ⁵	7.4x10 ⁴	40	Τερψιθέα	κ.ο.α	-
3	Πρέβεζα	κ.ο.α	-	41	Τερψιθέα	κ.ο.α	-
4	Πρέβεζα	3.3x10 ⁶	1.0x10 ⁶	42	Λαγκουβάρδος	κ.ο.α	-
5	Πρέβεζα	1.3x10 ⁶	1.1x10 ⁵	43	Τερψιθέα	κ.ο.α	-
6	Πρέβεζα	7.3x10 ⁵	3.7x10 ⁵	44	Φιλιατρά	κ.ο.α	-
7	Πρέβεζα	κ.ο.α	-	45	Αγ. Κυριακή	4.0x10 ⁶	2.0x10 ⁵
8	Πρέβεζα	3.9x10⁵	1.2x10 ⁵	46	Φιλιατρά	κ.ο.α	-
9	Πρέβεζα	κ.ο.α	-	47	Λασιίθι, Ιεράπετρα	κ.ο.α	-
10	Πρέβεζα	κ.ο.α	-	48	Λασιίθι, Ιεράπετρα	κ.ο.α	-
11	Πρέβεζα	κ.ο.α	-	49	Λασιίθι, Ιεράπετρα	κ.ο.α	-
12	Πρέβεζα	κ.ο.α	-	50	Λασιίθι, Ιεράπετρα	9.8x10⁴	1.9x10 ⁴

13		4.5×10^5	1.5×10^5	51	Λασιίθι, Ιεράπετρα	κ.ο.α	-
14	Λασιίθι	κ.ο.α	-	52	Λασιίθι, Ιεράπετρα	4.2×10^3	1.9×10^3
15	Λασιίθι	κ.ο.α	-	53	Λασιίθι, Ιεράπετρα	κ.ο.α	-
16	Λασιίθι	κ.ο.α	-	54	Λασιίθι, Ιεράπετρα	κ.ο.α	-
17	Λασιίθι	1.99×10^5	4.8×10^4	55	Λασιίθι, Ιεράπετρα, Χωστό	κ.ο.α	-
18	Λασιίθι	5.3×10^4	2.1×10^4	56	Λασιίθι, Ιεράπετρα, Γαβρίλης	κ.ο.α	-
19	Λασιίθι	κ.ο.α	-	57	Λασιίθι, Ιεράπετρα, Γούδουρα ς	κ.ο.α	-
20	Λασιίθι	κ.ο.α	-	58	Λασιίθι, Ιεράπετρα, Γούδουρα ς	κ.ο.α	-
21	Λασιίθι	κ.ο.α	-	59	Ηράκλειο, Τυμπάκι	κ.ο.α	-
22	Λασιίθι	κ.ο.α	-	60	Ηράκλειο, Τυμπάκι	κ.ο.α	-
23	Λασιίθι	κ.ο.α	-	61	Ηράκλειο, Τυμπάκι	3.5×10^6	1.1×10^6
24	Λασιίθι	κ.ο.α	-	62	Ηράκλειο, Τυμπάκι	3.8×10^3	3.3×10^2
25	Λασιίθι	κ.ο.α	-	63	Ηράκλειο, Τυμπάκι	κ.ο.α	-
26	Λασιίθι	κ.ο.α	-	64	Ηράκλειο, Τυμπάκι	κ.ο.α	-
27	Λασιίθι	κ.ο.α	-	65	Ηράκλειο, Τυμπάκι	κ.ο.α	-
28	Λασιίθι	κ.ο.α	-	66	Ηράκλειο, Τυμπάκι	2.5×10^5	3.6×10^4
29	Λασιίθι	κ.ο.α	-	67	Ηράκλειο, Τυμπάκι	3.5×10^3	2.6×10^3
30	Λασιίθι	κ.ο.α	-	68	Ηράκλειο, Τυμπάκι	2.7×10^6	1.4×10^6
31	Λασιίθι	κ.ο.α	-	69	Ηράκλειο, Τυμπάκι	κ.ο.α	-
32	Λασιίθι	κ.ο.α	-	70	Ηράκλειο, Τυμπάκι	κ.ο.α	-
33	Λασιίθι	κ.ο.α	-	71	Ηράκλειο, Τυμπάκι	κ.ο.α	-
34	Λασιίθι	κ.ο.α	-	72	Ηράκλειο, Τυμπάκι	7.8×10^3	7.2×10^3
35	Απρίλης	2.7×10^5	5.2×10^4	73	Ηράκλειο, Τυμπάκι	5.0×10^7	4.5×10^6
36	Αγ. Κυριακή	κ.ο.α	-	74	Ηράκλειο, Τυμπάκι	1.6×10^6	3.99×10^5
37	Αγ. Κυριακή	6.5×10^4	3.6×10^4	75	Ηράκλειο, Τυμπάκι	κ.ο.α	-
38	Λιμενάρι	κ.ο.α	-				

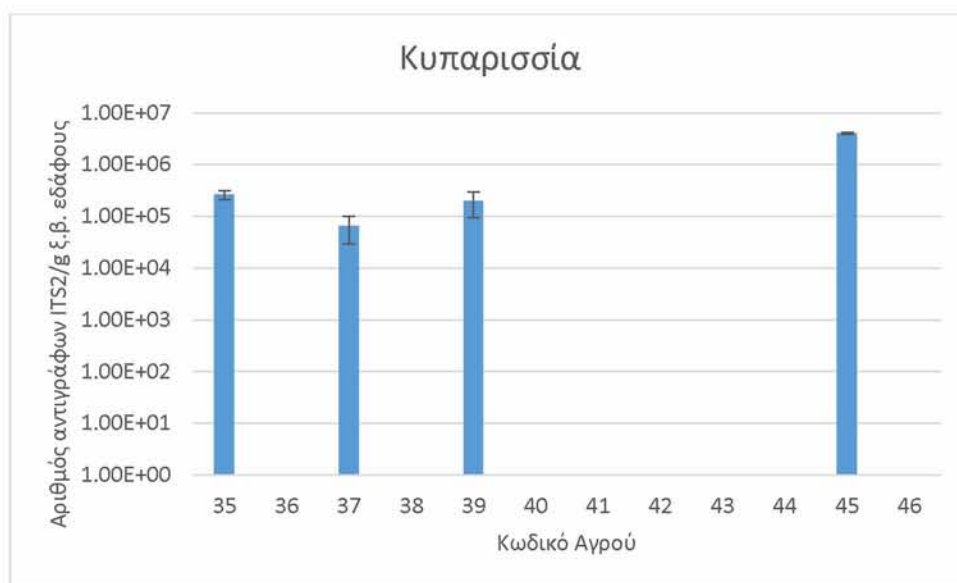


Γράφημα 10. Η αφθονία των μυκήτων του είδους *P. ultimum* σε δείγματα εδάφους από την περιοχή της Πρέβεζας όπως προσδιορίστηκε με την μέθοδο PCR πραγματικού χρόνου και εκφράστηκε ως αριθμός

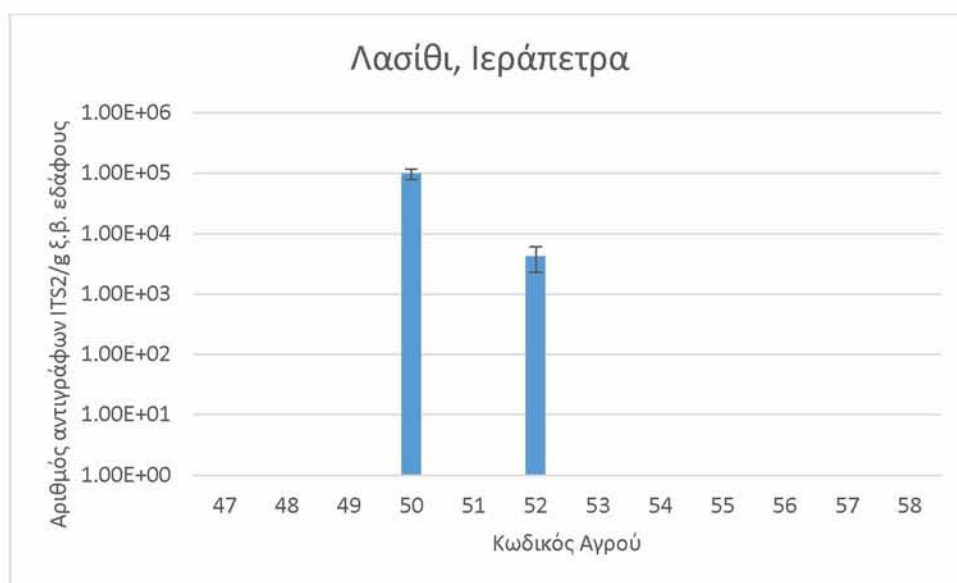
αντιγράφων του γονιδιακού τόπου ITS2 ανά γραμμάριο ξηρού θάρους εδάφους. Κάθε τιμή είναι ο μέσος όρος των επαναλήψεων \pm την τυπική απόκριση.



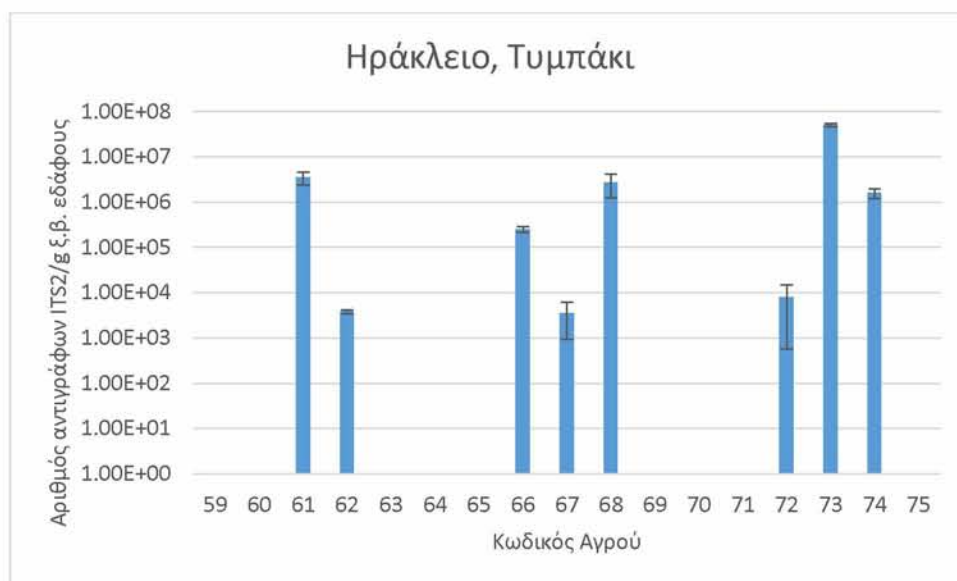
Γράφημα 11 Η αφθονία των μυκήτων του είδους *P. ultimum* σε δείγματα εδάφους από την περιοχή του Λασιθίου όπως προσδιορίστηκε με την μέθοδο PCRπραγματικού χρόνου και εκφράστηκε ως αριθμός αντιγράφων του γονιδιακού τόπου ITS2 ανά γραμμάριο ξηρού θάρους εδάφους. Κάθε τιμή είναι ο μέσος όρος των επαναλήψεων \pm την τυπική απόκριση.



Γράφημα 12. Η αφθονία των μυκήτων του είδους *P. ultimum* σε δείγματα εδάφους από την περιοχή της Κυπαρισσίας όπως προσδιορίστηκε με την μέθοδο PCRπραγματικού χρόνου και εκφράστηκε ως αριθμός αντιγράφων του γονιδιακού τόπου ITS2 ανά γραμμάριο ξηρού θάρους εδάφους. Κάθε τιμή είναι ο μέσος όρος των επαναλήψεων \pm την τυπική απόκριση.



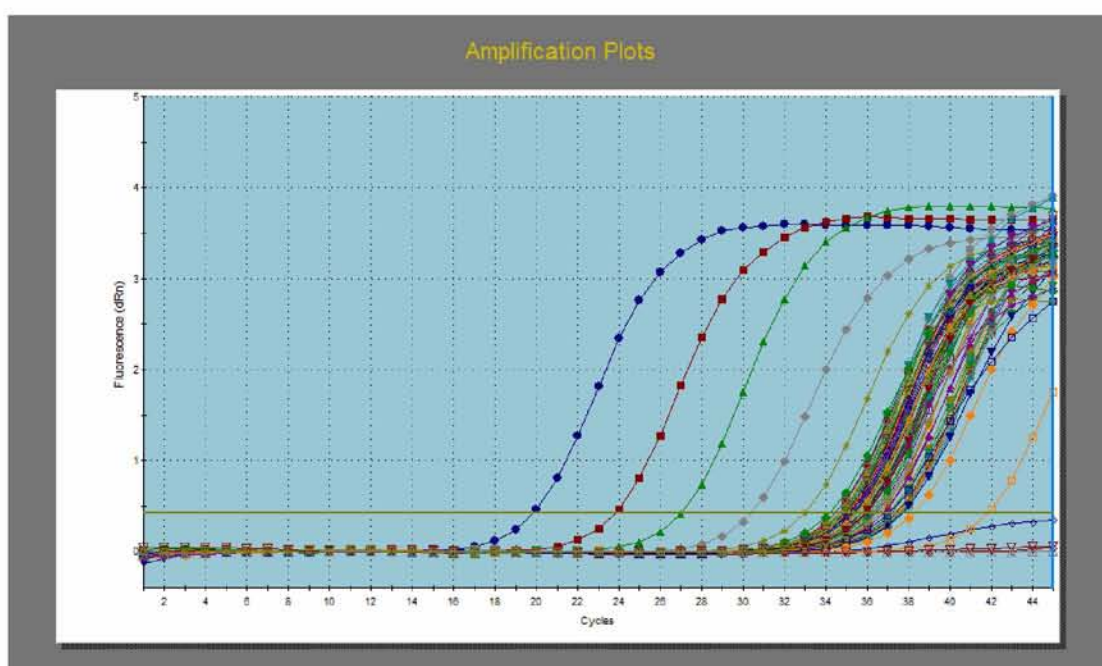
Γράφημα 13 Η αφθονία των μυκήτων του είδους *P. ultimum* σε δείγματα εδάφους από την περιοχή της Ιεράπετρας όπως προσδιορίστηκε με την μέθοδο PCR πραγματικού χρόνου και εκφράστηκε ως αριθμός αντιγράφων του γονιδιακού τόπου ITS2 ανά γραμμάριο ξηρού βάρους εδάφους. Κάθε τιμή είναι ο μέσος όρος των επαναλήψεων \pm την τυπική απόκριση.



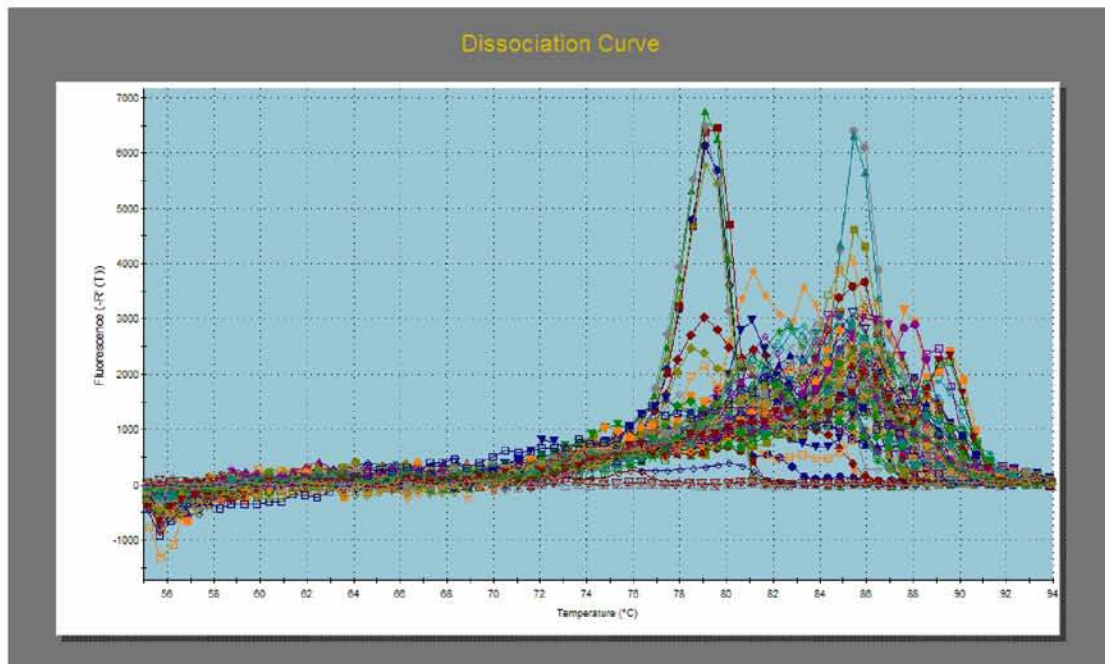
Γράφημα 14 Η αφθονία των μυκήτων του είδους *P. ultimum* σε δείγματα εδάφους από την περιοχή του Τυμπακίου όπως προσδιορίστηκε με την μέθοδο PCR πραγματικού χρόνου και εκφράστηκε ως αριθμός αντιγράφων του γονιδιακού τόπου ITS2 ανά γραμμάριο ξηρού βάρους εδάφους. Κάθε τιμή είναι ο μέσος όρος των επαναλήψεων \pm την τυπική απόκριση.

3.2.5 *Sclerotinia sclerotiorum*

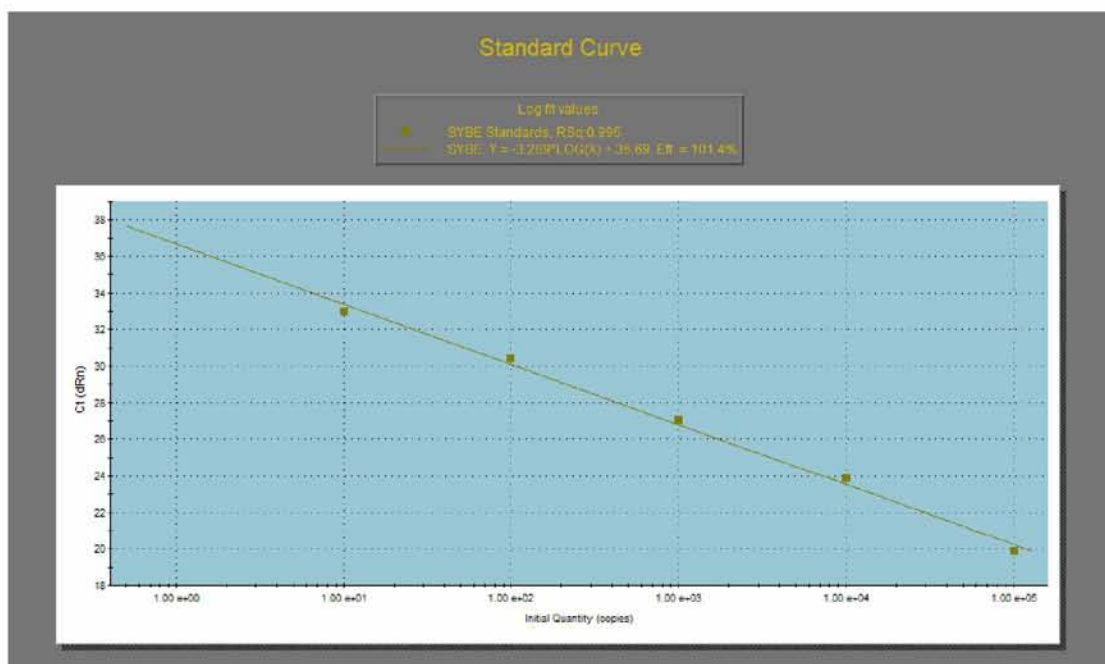
Παρακάτω παρουσιάζονται ενδεικτικές καμπύλες ενίσχυσης, αποδιάταξης και αναφοράς της PCR πραγματικού χρόνου για την εκτίμηση του πληθυσμού των μυκήτων του είδους *S. sclerotiorum* (Σχήματα 13, 14, 15). Οι καμπύλες αναφοράς εμφανίζουν πολύ καλή γραμμικότητα ($r^2 = 0,995$) σε εύρος από 10^1 ως και 10^5 αντίγραφα της μικρής υπομονάδας rRNA του μιτοχondριακού ιντρονίου και της περιοχής ORF1. Όπως φαίνεται από την καμπύλη αποδιάταξης, παρατηρήθηκε, στην συντριπτική πλειοψηφία των δειγμάτων, μια κορυφή στους 79°C που αντιστοιχεί στο προϊόν – στόχοόπως επιβεβαιώθηκε και με ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων. Δείγματα που έδωσαν στην καμπύλη αποδιάταξης κορυφή σε άλλη θερμοκρασία θεωρήθηκαν ως μη θετικά στην παρουσία *S. sclerotiorum*.



Σχήμα 13 Ενδεικτική καμπύλη ενίσχυσης της αντίδρασης PCR πραγματικού χρόνου για την εκτίμηση του πληθυσμού του μύκητα *Sclerotinia sclerotiorum* στα δείγματα εδάφους.



Σχήμα 14 Ενδεικτική καμπύλη αποδιάταξης της αντίδρασης PCR πραγματικού χρόνου για την εκτίμηση του πληθυσμού του μύκητα *Sclerotinia sclerotiorum* στα δείγματα εδάφους.

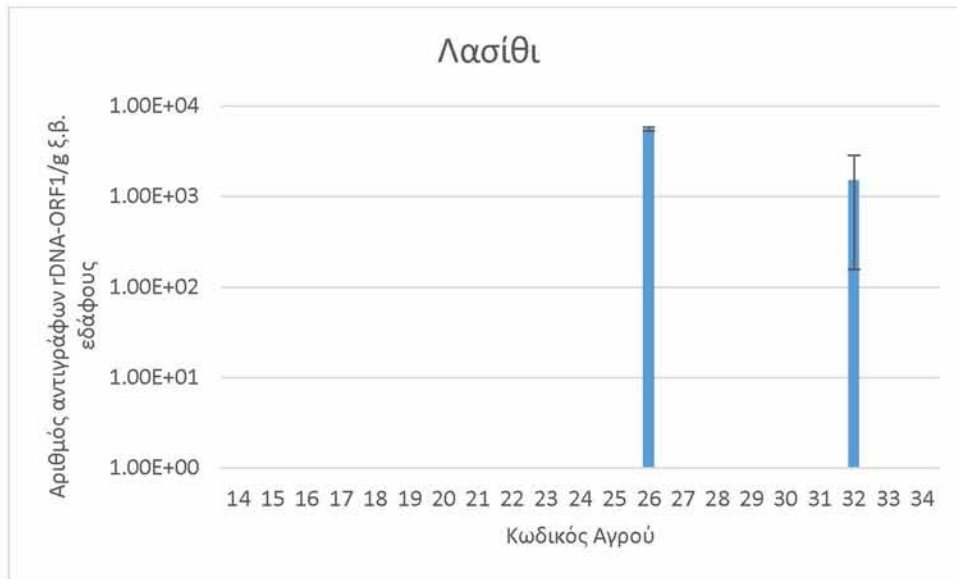


Σχήμα 15 Καμπύλη αναφοράς της αντίδρασης PCR πραγματικού χρόνου για την εκτίμηση του πληθυσμού του μύκητα *Sclerotinia sclerotiorum* στα δείγματα εδάφους.

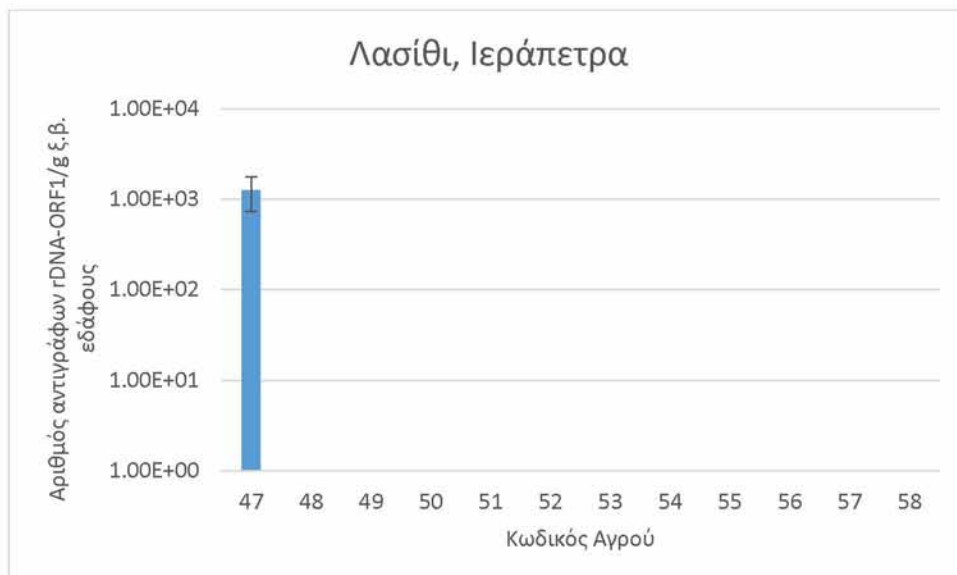
Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα 27 και στα γραφήματα 15 και 16. Γενικότερα καταγράφηκαν πληθυσμοί του μύκητα *Sclerotinia sclerotiorum*, σε επίπεδα υψηλότερα από το όριο ανίχνευσης της μεθόδου σε μόλις 3 εδάφη από το σύνολο των 75 εδαφών που εξετάστηκαν. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι αυτά τα εδάφη βρίσκονται στην περιοχή του Λασιθίου (Λασιθι και Ιεράπετρα). Να τονιστεί ότι στα δείγματα 32 και 47 μόνο 2 από τις 3 επαναλήψεις έδωσαν τιμές υψηλότερες από το όριο ανίχνευσης της μεθόδου (Πίνακας 27, τιμές με έντονο χρώμα).

Πίνακας 27 Ο αριθμός αντιγράφων της μικρής ριβοσωμικής υπομονάδας του μιτοχονδριακού ιντρονίου και της περιοχής ORF1 του μύκητα *Sclerotinia sclerotiorum* ανά g ξηρού θάρους εδάφους. Παρουσιάζεται ο μέσος όρος τριών επαναλήψεων και η τυπική απόκλιση. Κ.ο.α. δηλώνει ότι οι τιμές ήταν κάτω από το όριο ανίχνευσης της μεθόδου.

#	Προέλευση	Αριθμός αντιγρ. /g εδάφους ξ.β.	Τυπική απόκλιση	#	Προέλευση	Αριθμός αντιγρ. /g εδάφους ξ.β.	Τυπική απόκλιση
1	Πρέβεζα	κ.ο.α	-	39	Γιαννιτσοχώρι	κ.ο.α	-
2	Πρέβεζα	κ.ο.α	-	40	Τερψιθέα	κ.ο.α	-
3	Πρέβεζα	κ.ο.α	-	41	Τερψιθέα	κ.ο.α	-
4	Πρέβεζα	κ.ο.α	-	42	Λαγκουβάρδος	κ.ο.α	-
5	Πρέβεζα	κ.ο.α	-	43	Τερψιθέα	κ.ο.α	-
6	Πρέβεζα	κ.ο.α	-	44	Φιλιατρά	κ.ο.α	-
7	Πρέβεζα	κ.ο.α	-	45	Αγ. Κυριακή	κ.ο.α	-
8	Πρέβεζα	κ.ο.α	-	46	Φιλιατρά	κ.ο.α	-
9	Πρέβεζα	κ.ο.α	-	47	Λασιθι, Ιεράπετρα	1.3x10³	5.2x10 ²
10	Πρέβεζα	κ.ο.α	-	48	Λασιθι, Ιεράπετρα	κ.ο.α	-
11	Πρέβεζα	κ.ο.α	-	49	Λασιθι, Ιεράπετρα	κ.ο.α	-
12	Πρέβεζα	κ.ο.α	-	50	Λασιθι, Ιεράπετρα	κ.ο.α	-
13		κ.ο.α	-	51	Λασιθι, Ιεράπετρα	κ.ο.α	-
14	Λασιθι	κ.ο.α	-	52	Λασιθι, Ιεράπετρα	κ.ο.α	-
15	Λασιθι	κ.ο.α	-	53	Λασιθι, Ιεράπετρα	κ.ο.α	-
16	Λασιθι	κ.ο.α	-	54	Λασιθι, Ιεράπετρα	κ.ο.α	-
17	Λασιθι	κ.ο.α	-	55	Λασιθι, Ιεράπετρα, Χωστό	κ.ο.α	-
18	Λασιθι	κ.ο.α	-	56	Λασιθι, Ιεράπετρα,Γαβρίλης	κ.ο.α	-
19	Λασιθι	κ.ο.α	-	57	Λασιθι, Ιεράπετρα,Γούδουρα ς	κ.ο.α	-
20	Λασιθι	κ.ο.α	-	58	Λασιθι, Ιεράπετρα,Γούδουρα ς	κ.ο.α	-
21	Λασιθι	κ.ο.α	-	59	Ηράκλειο, Τυμπάκι	κ.ο.α	-
22	Λασιθι	κ.ο.α	-	60	Ηράκλειο, Τυμπάκι	κ.ο.α	-
23	Λασιθι	κ.ο.α	-	61	Ηράκλειο, Τυμπάκι	κ.ο.α	-
24	Λασιθι	κ.ο.α	-	62	Ηράκλειο, Τυμπάκι	κ.ο.α	-
25	Λασιθι	κ.ο.α	-	63	Ηράκλειο, Τυμπάκι	κ.ο.α	-
26	Λασιθι	5.5x10 ³	2.9x10 ²	64	Ηράκλειο, Τυμπάκι	κ.ο.α	-
27	Λασιθι	κ.ο.α	-	65	Ηράκλειο, Τυμπάκι	κ.ο.α	-
28	Λασιθι	κ.ο.α	-	66	Ηράκλειο, Τυμπάκι	κ.ο.α	-
29	Λασιθι	κ.ο.α	-	67	Ηράκλειο, Τυμπάκι	κ.ο.α	-
30	Λασιθι	κ.ο.α	-	68	Ηράκλειο, Τυμπάκι	κ.ο.α	-
31	Λασιθι	κ.ο.α	-	69	Ηράκλειο, Τυμπάκι	κ.ο.α	-
32	Λασιθι	1.5x10³	1.4x10 ³	70	Ηράκλειο, Τυμπάκι	κ.ο.α	-
33	Λασιθι	κ.ο.α	-	71	Ηράκλειο, Τυμπάκι	κ.ο.α	-
34	Λασιθι	κ.ο.α	-	72	Ηράκλειο, Τυμπάκι	κ.ο.α	-
35	Απρίλης	κ.ο.α	-	73	Ηράκλειο, Τυμπάκι	κ.ο.α	-
36	Αγ. Κυριακή	κ.ο.α	-	74	Ηράκλειο, Τυμπάκι	κ.ο.α	-
37	Αγ. Κυριακή	κ.ο.α	-	75	Ηράκλειο, Τυμπάκι	κ.ο.α	-
38	Λιμενάρι	κ.ο.α	-				



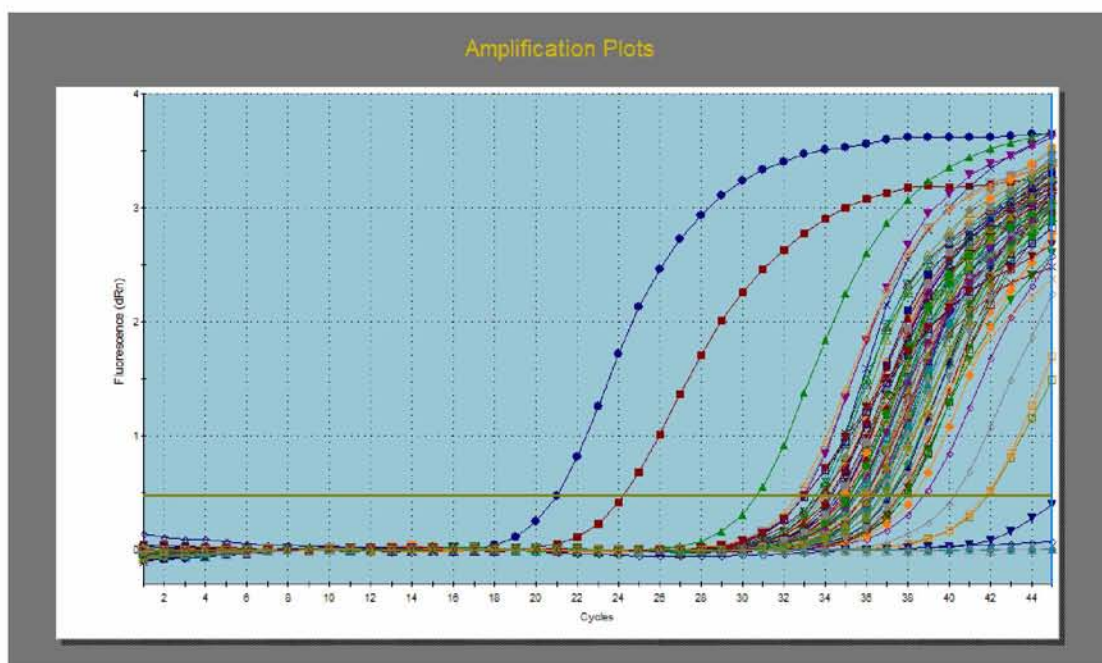
Γράφημα 15 Η αφθονία των μυκήτων του είδους *S. sclerotiorum* σε δείγματα εδάφους από την περιοχή του Λασιθίου όπως προσδιορίστηκε με την μέθοδο PCR πραγματικού χρόνου και εκφράστηκε ως αριθμός αντιγράφων του γονιδίου-στόχου ανά γραμμάριο ξηρού βάρους εδάφους. Κάθε τιμή είναι ο μέσος όρος των επαναλήψεων ± την τυπική απόκριση.



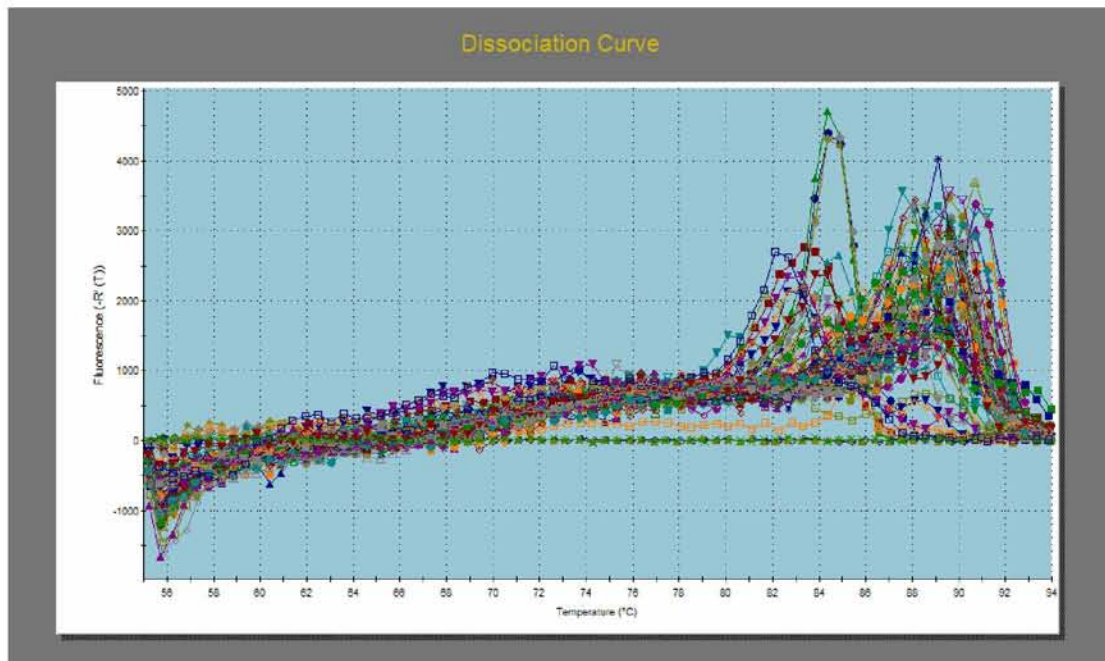
Γράφημα 16 Η αφθονία των μυκήτων του είδους *S. sclerotiorum* σε δείγματα εδάφους από την περιοχή της Ιεράπετρας όπως προσδιορίστηκε με την μέθοδο PCR πραγματικού χρόνου και εκφράστηκε ως αριθμός αντιγράφων του γονιδίου-στόχου ανά γραμμάριο ξηρού βάρους εδάφους. Κάθε τιμή είναι ο μέσος όρος των επαναλήψεων ± την τυπική απόκριση.

3.2.6 *Pyrenochaeta lycopersici* τύπος I

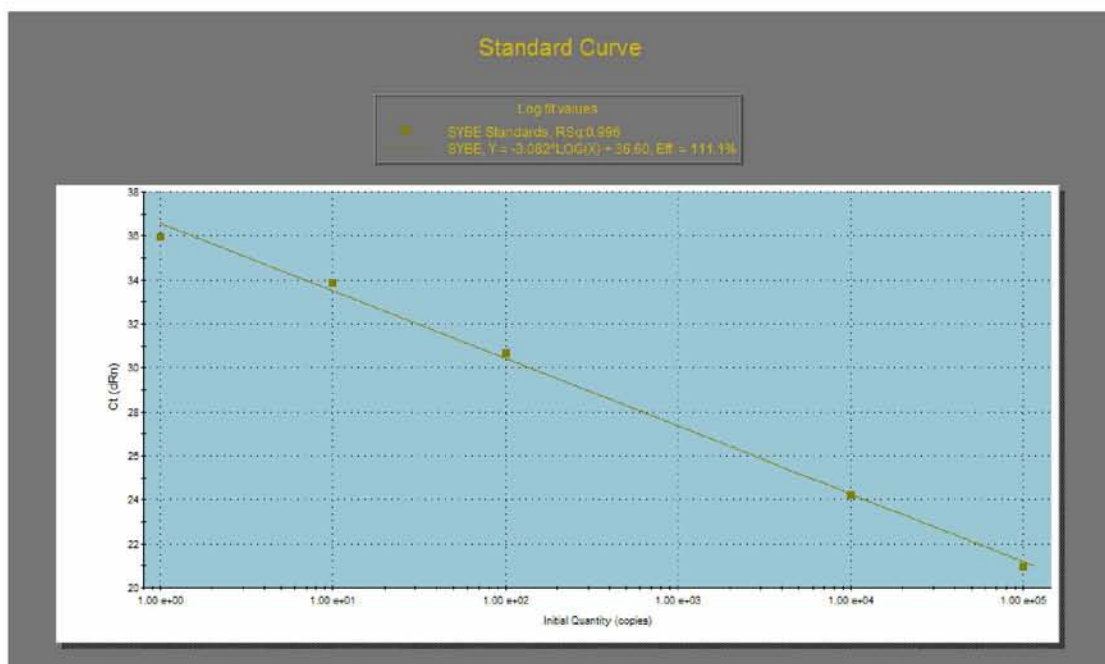
Παρακάτω παρουσιάζονται ενδεικτικές καμπύλες ενίσχυσης, αποδιάταξης και αναφοράς της PCR πραγματικού χρόνου για την εκτίμηση του πληθυσμού των μυκήτων του γένους *P. lycopersici* τύπος I (Σχήματα 16, 17, 18). Οι καμπύλες αναφοράς εμφανίζουν πολύ καλή γραμμικότητα ($r^2 = 0,996$) σε εύρος από 10^0 ως και 10^5 αντίγραφα του γονιδιακού τόπου ITS. Όπως φαίνεται από την καμπύλη αποδιάταξης, παρατηρήθηκε, στην συντριπτική πλειοψηφία των δειγμάτων, μια κορυφή στους 84°C που αντιστοιχεί στο προϊόν – στόχο. Δείγματα που έδωσαν στην καμπύλη αποδιάταξης κορυφή σε άλλη θερμοκρασία θεωρήθηκαν ως μη θετικά στην παρουσία *P. lycopersici* τύπος I.



Σχήμα 16 Ενδεικτική καμπύλη ενίσχυσης της αντίδρασης PCR πραγματικού χρόνου για την εκτίμηση του πληθυσμού του μύκητα *Pyrenochaeta lycopersici* τύπος I στα δείγματα εδάφους.



Σχήμα 17 Ενδεικτική καμπύλη αποδιάταξης της αντίδρασης PCR πραγματικού χρόνου για την εκτίμηση του πληθυσμού του μύκητα *Pyrenochaeta lycopersici* τύπος I στα δείγματα εδάφους.

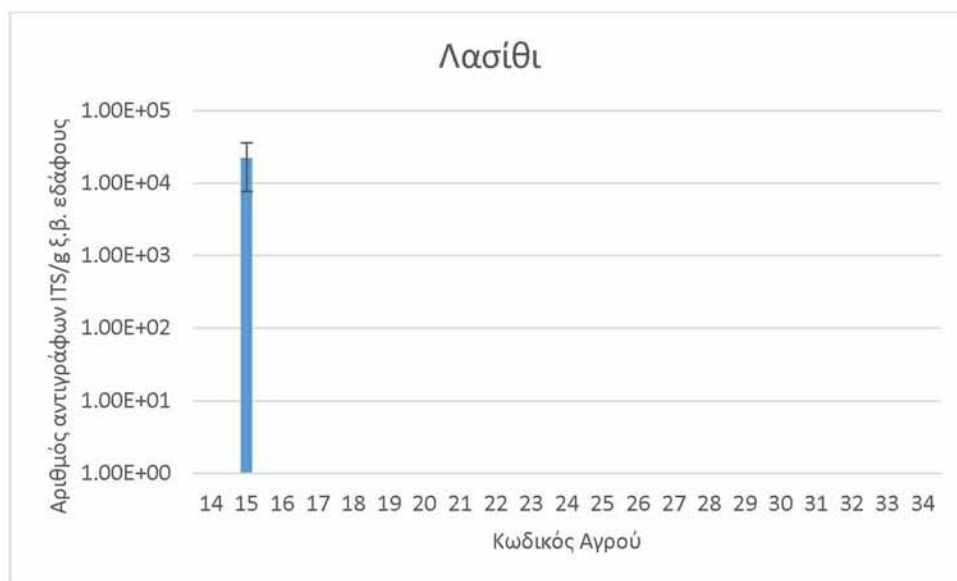


Σχήμα 18 Καμπύλη αναφοράς της αντίδρασης PCR πραγματικού χρόνου για την εκτίμηση του πληθυσμού του μύκητα *Pyrenochaeta lycopersici* τύπος I στα δείγματα εδάφους.

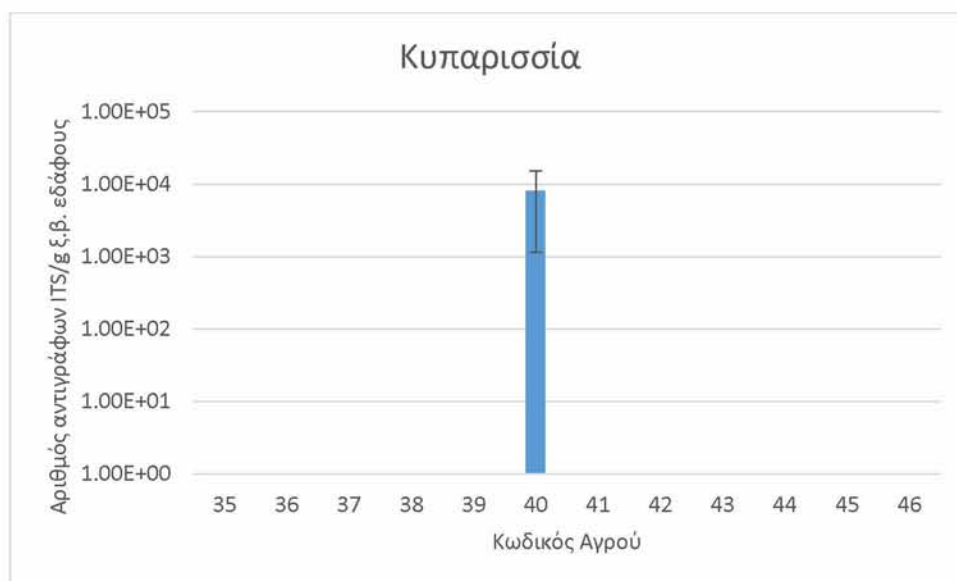
Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα 28 και στα γραφήματα 17 έως 19. Γενικότερα καταγράφηκαν πληθυσμοί του μύκητα *Pyrenochaeta lycopersici* τύπος I, σε επίπεδα υψηλότερα από το όριο ανίχνευσης της μεθόδου, σε μόλις 5 εδάφη από το σύνολο των 75 εδαφών που εξετάστηκαν. Στα υπόλοιπα δείγματα τα επίπεδα του πληθυσμού του *P. lycopersici* βρίσκονται σε επίπεδα χαμηλότερα από το όριο ανίχνευσης της μεθόδου ή δίνουν παραπροϊόντα (Σχήμα 19). Τα εδάφη στα οποία ανιχνεύεται ο μύκητας βρίσκονται στην περιοχή του Λασιθίου, της Κυπαρισσίας και του Τυμπακίου. Να τονιστεί ότι στα δείγματα 40, 61 και 68 μόνο 2 από τις 3 επαναλήψεις έδωσαν τιμές υψηλότερες από το όριο ανίχνευσης της μεθόδου (Πίνακας 28, τιμές με έντονο χρώμα).

Πίνακας 28 Ο αριθμός αντιγράφων του γονιδιακού τόπου ITS του μύκητα *Pyrenochaeta lycopersici* τύπος I ανά g ξηρού θάρους εδάφους στα εδαφικά δείγματα που αξιολογήθηκαν. Παρουσιάζεται ο μέσος όρος τριών επαναλήψεων και η τυπική απόκλιση. κ.ο.α δηλώνει ότι οι τιμές ήταν κάτω από το όριο ανίχνευσης της μεθόδου

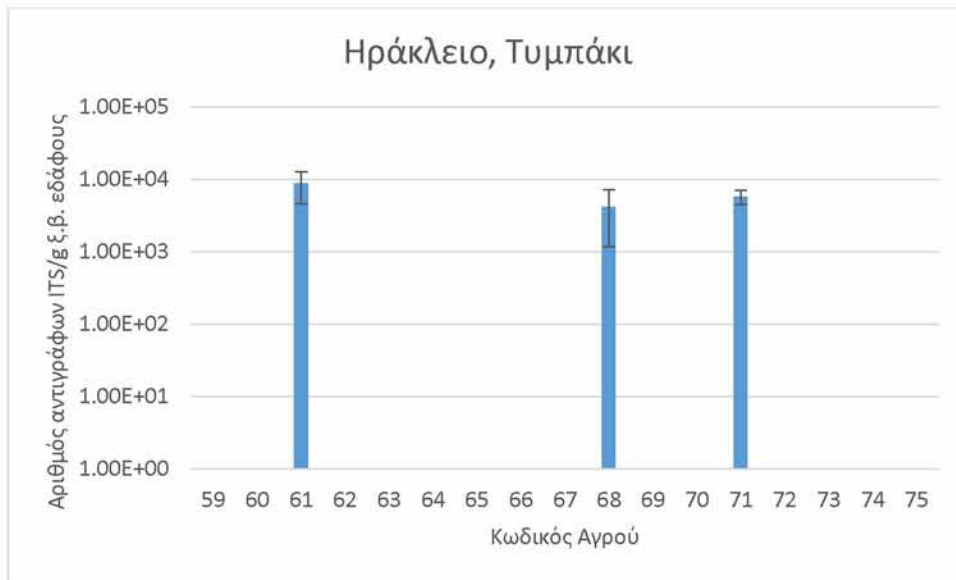
#	Προέλευση	Αριθμός αντιγρ. /g εδάφους ξ.β.	Τυπική απόκλιση	#	Προέλευση	Αριθμός αντιγρ. /g εδάφους ξ.β.	Τυπική απόκλιση
1	Πρέβεζα	κ.ο.α	-	39	Γιαννιτσοχώρι	κ.ο.α	-
2	Πρέβεζα	κ.ο.α	-	40	Τερψιθέα	8.1x10³	7.0x10 ³
3	Πρέβεζα	κ.ο.α	-	41	Τερψιθέα	κ.ο.α	-
4	Πρέβεζα	κ.ο.α	-	42	Λαγκουβάρδος	κ.ο.α	-
5	Πρέβεζα	κ.ο.α	-	43	Τερψιθέα	κ.ο.α	-
6	Πρέβεζα	κ.ο.α	-	44	Φιλιατρά	κ.ο.α	-
7	Πρέβεζα	κ.ο.α	-	45	Αγ. Κυριακή	κ.ο.α	-
8	Πρέβεζα	κ.ο.α	-	46	Φιλιατρά	κ.ο.α	-
9	Πρέβεζα	κ.ο.α	-	47	Λασίθι, Ιεράπετρα	κ.ο.α	-
10	Πρέβεζα	κ.ο.α	-	48	Λασίθι, Ιεράπετρα	κ.ο.α	-
11	Πρέβεζα	κ.ο.α	-	49	Λασίθι, Ιεράπετρα	κ.ο.α	-
12	Πρέβεζα	κ.ο.α	-	50	Λασίθι, Ιεράπετρα	κ.ο.α	-
13		κ.ο.α	-	51	Λασίθι, Ιεράπετρα	κ.ο.α	-
14	Λασίθι	κ.ο.α	-	52	Λασίθι, Ιεράπετρα	κ.ο.α	-
15	Λασίθι	2.2x10 ⁴	1.4x10 ⁴	53	Λασίθι, Ιεράπετρα	κ.ο.α	-
16	Λασίθι	κ.ο.α	-	54	Λασίθι, Ιεράπετρα	κ.ο.α	-
17	Λασίθι	κ.ο.α	-	55	Λασίθι, Ιεράπετρα, Χωστό	κ.ο.α	-
18	Λασίθι	κ.ο.α	-	56	Λασίθι, Ιεράπετρα, Γαβρίλης	κ.ο.α	-
19	Λασίθι	κ.ο.α	-	57	Λασίθι, Ιεράπετρα, Γούδουρας	κ.ο.α	-
20	Λασίθι	κ.ο.α	-	58	Λασίθι, Ιεράπετρα, Γούδουρας	κ.ο.α	-
21	Λασίθι	κ.ο.α	-	59	Ηράκλειο, Τυμπάκι	κ.ο.α	-
22	Λασίθι	κ.ο.α	-	60	Ηράκλειο, Τυμπάκι	κ.ο.α	-
23	Λασίθι	κ.ο.α	-	61	Ηράκλειο, Τυμπάκι	8.7x10³	4.1x10 ³
24	Λασίθι	κ.ο.α	-	62	Ηράκλειο, Τυμπάκι	κ.ο.α	-
25	Λασίθι	κ.ο.α	-	63	Ηράκλειο, Τυμπάκι	κ.ο.α	-
26	Λασίθι	κ.ο.α	-	64	Ηράκλειο, Τυμπάκι	κ.ο.α	-
27	Λασίθι	κ.ο.α	-	65	Ηράκλειο, Τυμπάκι	κ.ο.α	-
28	Λασίθι	κ.ο.α	-	66	Ηράκλειο, Τυμπάκι	κ.ο.α	-
29	Λασίθι	κ.ο.α	-	67	Ηράκλειο, Τυμπάκι	κ.ο.α	-
30	Λασίθι	κ.ο.α	-	68	Ηράκλειο, Τυμπάκι	4.2x10³	2.99x10 ³
31	Λασίθι	κ.ο.α	-	69	Ηράκλειο, Τυμπάκι	κ.ο.α	-
32	Λασίθι	κ.ο.α	-	70	Ηράκλειο, Τυμπάκι	κ.ο.α	-
33	Λασίθι	κ.ο.α	-	71	Ηράκλειο, Τυμπάκι	5.8x10 ³	1.3x10 ³
34	Λασίθι	κ.ο.α	-	72	Ηράκλειο, Τυμπάκι	κ.ο.α	-
35	Απρίλης	κ.ο.α	-	73	Ηράκλειο, Τυμπάκι	κ.ο.α	-
36	Αγ. Κυριακή	κ.ο.α	-	74	Ηράκλειο, Τυμπάκι	κ.ο.α	-
37	Αγ. Κυριακή	κ.ο.α	-	75	Ηράκλειο, Τυμπάκι	κ.ο.α	-
38	Λιμενάρι	κ.ο.α	-				



Γράφημα 17Η αφθονία του μύκητα *Ryzenochaeta lycopersici* τύπος I σε δείγματα εδάφους από την περιοχή του Λασιθίου όπως προσδιορίστηκε με την μέθοδο PCR πραγματικού χρόνου και εκφράστηκε ως αριθμός αντιγράφων του γονιδιακού τόπου ITS ανά γραμμάριο ξηρού βάρους εδάφους. Κάθε τιμή είναι ο μέσος όρος των επαναλήψεων ± την τυπική απόκριση.



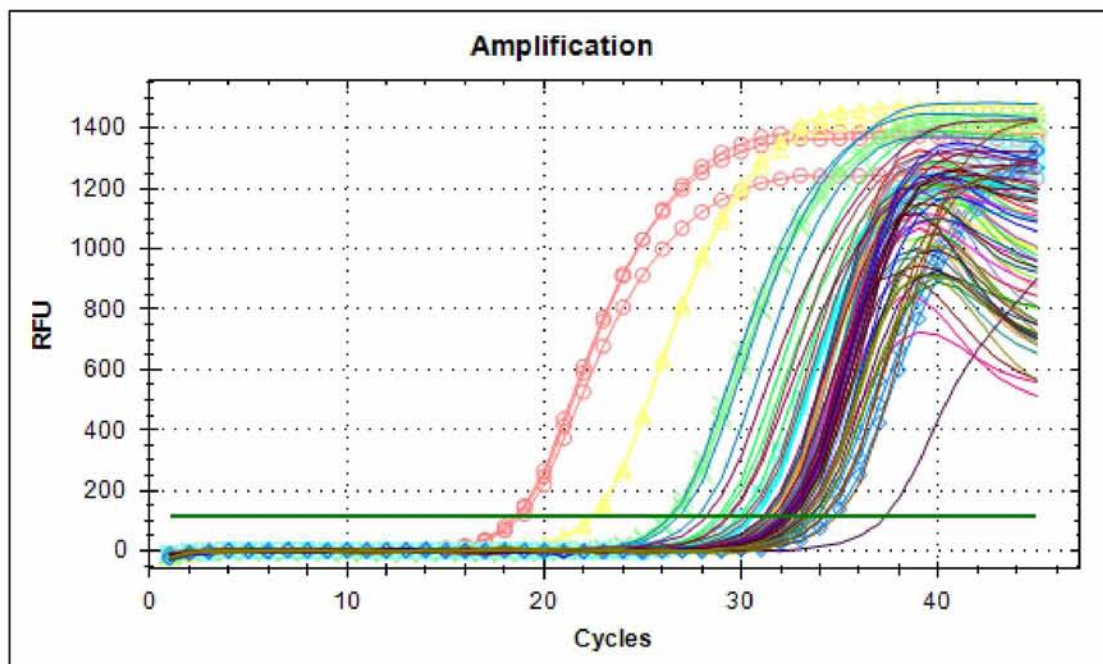
Γράφημα 18. Η αφθονία του μύκητα *Ryzenochaeta lycopersici* τύπος I σε δείγματα εδάφους από την περιοχή της Κυπαρισσίας όπως προσδιορίστηκε με την μέθοδο PCR πραγματικού χρόνου και εκφράστηκε ως αριθμός αντιγράφων του γονιδιακού τόπου ITS ανά γραμμάριο ξηρού βάρους. Κάθε τιμή είναι ο μέσος όρος των επαναλήψεων ± την τυπική απόκριση.



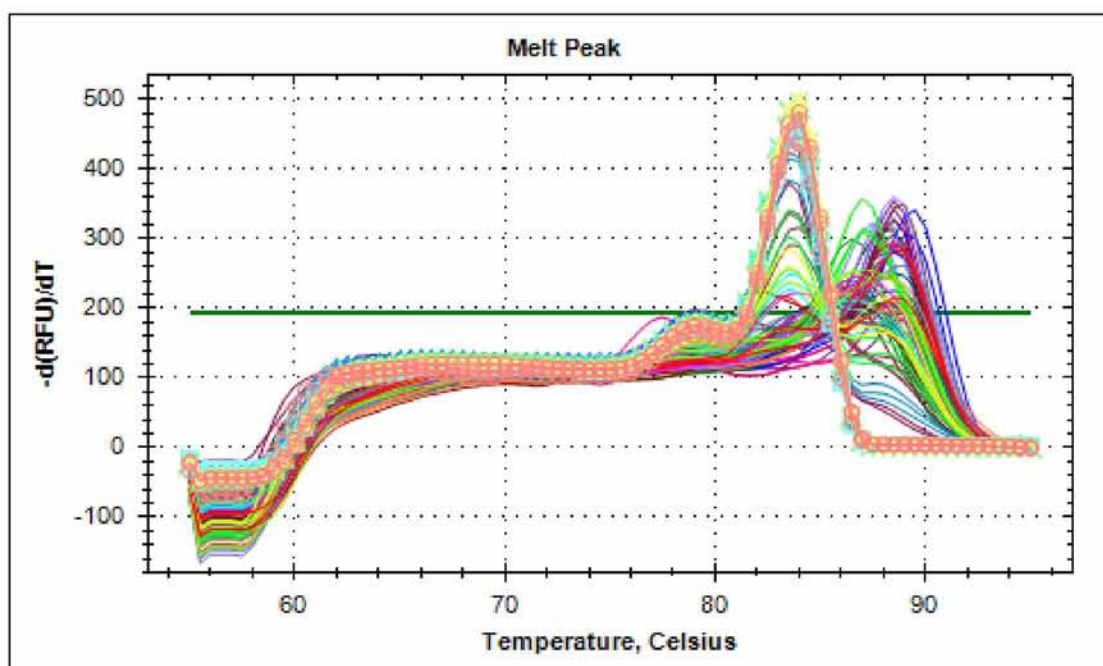
Γράφημα 19. Η αφθονία του μύκητα *Pyrenochaeta lycopersici* τύπος I σε δείγματα εδάφους από την περιοχή του Τυμπακίου όπως προσδιορίστηκε με την μέθοδο PCR πραγματικού χρόνου και εκφράστηκε ως αριθμός αντιγράφων του γονιδιακού τόπου ITS ανά γραμμάριο ξηρού βάρους εδάφους. Κάθε τιμή είναι ο μέσος όρος των επαναλήψεων ± την τυπική απόκλιση.

3.2.7 *Pyrenochaeta lycopersici* τύπος II

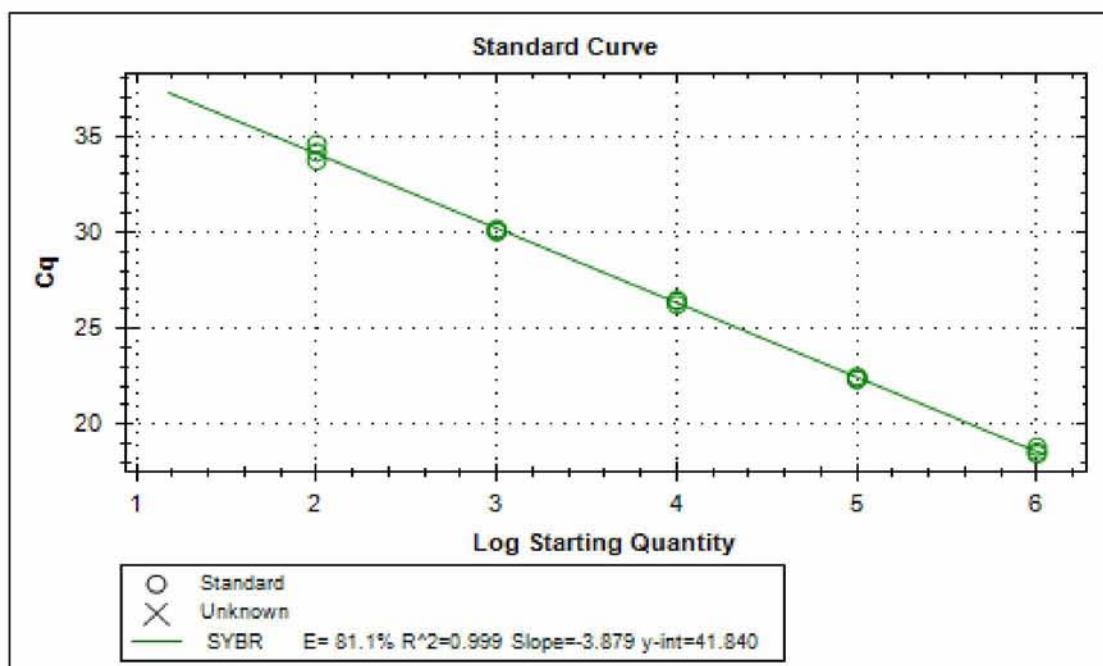
Παρακάτω παρουσιάζονται ενδεικτικές καμπύλες ενίσχυσης, αποδιάταξης και αναφοράς της PCR πραγματικού χρόνου για την εκτίμηση του πληθυσμού των μυκήτων του γένους *P. lycopersici* τύπος II (Σχήματα 19, 20, 21). Οι καμπύλες αναφοράς εμφανίζουν πολύ καλή γραμμικότητα ($r^2 = 0,999$) σε εύρος από 10^2 ως και 10^6 αντίγραφα του γονιδιακού τόπου ITS. Όπως φαίνεται από την καμπύλη αποδιάταξης μια κορυφή στους 84°C που αντιστοιχεί στο προϊόν – στόχο. Δείγματα που έδωσαν στην καμπύλη αποδιάταξης κορυφή σε άλλη θερμοκρασία θεωρήθηκαν ως μη θετικά στην παρουσία *P. lycopersici* τύπος II.



Σχήμα 19 Ενδεικτική καμπύλη ενίσχυσης της αντίδρασης PCR πραγματικού χρόνου για την εκτίμηση του πληθυσμού του μύκητα *Ryzenochaeta lycopersici* τύπος II στα δείγματα εδάφους.



Σχήμα 20 Ενδεικτική καμπύλη αποδιάταξης της αντίδρασης PCR πραγματικού χρόνου για την εκτίμηση του πληθυσμού του μύκητα *Ryzenochaeta lycopersici* τύπος II στα δείγματα εδάφους.



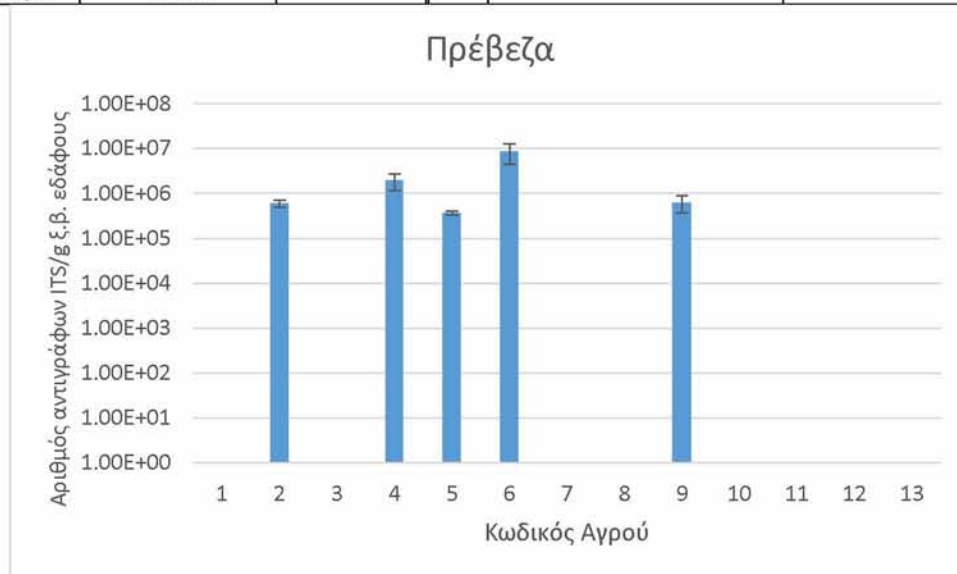
Σχήμα 21 Καμπύλη αναφοράς της αντίδρασης PCR πραγματικού χρόνου για την εκτίμηση του πληθυσμού του μύκητα *Pyrenochaeta lycopersici* τύπος II στα δείγματα εδάφους.

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα 29 και στα γραφήματα 20 έως 23. Γενικότερα καταγράφηκαν πληθυσμοί του μύκητα *Pyrenochaeta lycopersici* τύπος II, σε επίπεδα υψηλότερα από το όριο ανίχνευσης της μεθόδου, σε μόλις 12 εδάφη από το σύνολο των 75 εδαφών που εξετάστηκαν. Στα υπόλοιπα δείγματα τα επίπεδα του πληθυσμού του *P. lycopersici* τύπος II βρίσκονται σε επίπεδα χαμηλότερα από το όριο ανίχνευσης της μεθόδου ή δίνουν παραπροϊόντα (Σχήμα 20). Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι και πάλι στα εδάφη από την Ιεράπετρα δεν ανιχνεύθηκαν πληθυσμοί του συγκεκριμένου φυτοπαθογόνου. Να τονιστεί ότι στα δείγματα 40, 61 και 68 μόνο 2 από τις 3 επαναλήψεις έδωσαν τιμές υψηλότερες από το όριο ανίχνευσης της μεθόδου (Πίνακας 29, τιμές με έντονο χρώμα).

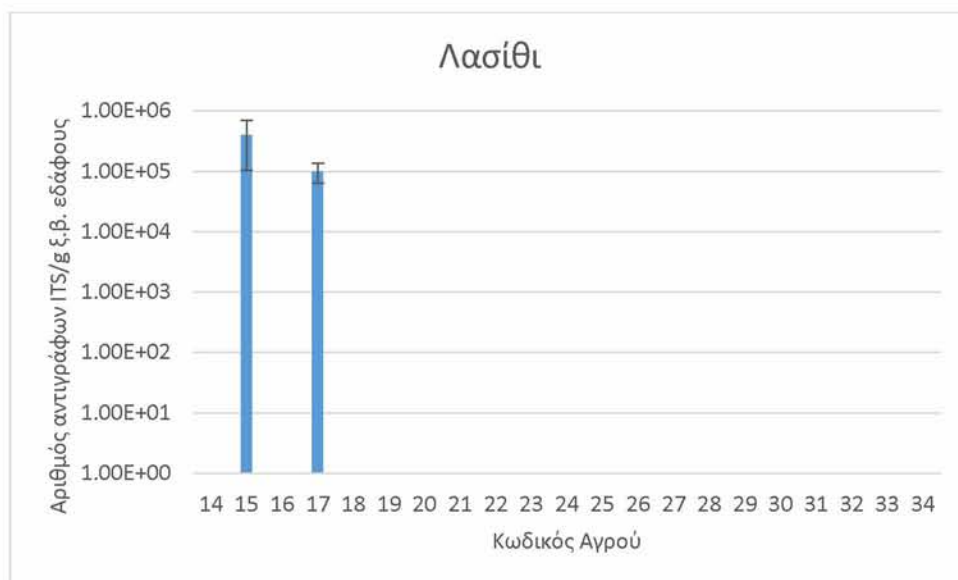
Πίνακας 29. Ο αριθμός αντιγράφων του γονιδιακού τόπου ITS του μύκητα *Pyrenochaeta lycopersici* τύπος II ανά g ξηρού θάρους εδάφους στα εδαφικά δείγματα που αξιολογήθηκαν. Παρουσιάζεται ο μέσος όρος τριών επαναλήψεων και η τυπική απόκλιση. . κ.ο.α δηλώνει ότι οι τιμές ήταν κάτω από το όριο ανίχνευσης της μεθόδου.

#	Προέλευση	Αριθμός αντιγρ. /g εδάφους ξ.β.	Τυπική απόκλιση	#	Προέλευση	Αριθμός αντιγρ. /g εδάφους ξ.β.	Τυπική απόκλιση
1	Πρέβεζα	κ.ο.α	-	39	Γιαννιτσοχώρι	1.9x10 ⁵	2.3x10 ⁴
2	Πρέβεζα	5.97x10 ⁵	1.0x10 ⁵	40	Τερψιθέα	3.5x10 ⁵	3.1x10 ⁴
3	Πρέβεζα	κ.ο.α	-	41	Τερψιθέα	κ.ο.α	-
4	Πρέβεζα	1.96x10 ⁶	8.0x10 ⁵	42	Λαγκουβάρδος	6.4x10 ⁵	1.6x10 ⁵
5	Πρέβεζα	3.7x10 ⁵	3.7x10 ⁴	43	Τερψιθέα	κ.ο.α	-
6	Πρέβεζα	8.5x10 ⁶	4.1x10 ⁶	44	Φιλιατρά	κ.ο.α	-
7	Πρέβεζα	κ.ο.α	-	45	Αγ. Κυριακή	κ.ο.α	-
8	Πρέβεζα	κ.ο.α	-	46	Φιλιατρά	κ.ο.α	-
9	Πρέβεζα	6.3x10 ⁵	2.6x10 ⁵	47	Λασίθι, Ιεράπετρα	κ.ο.α	-
10	Πρέβεζα	κ.ο.α	-	48	Λασίθι, Ιεράπετρα	κ.ο.α	-
11	Πρέβεζα	κ.ο.α	-	49	Λασίθι, Ιεράπετρα	κ.ο.α	-
12	Πρέβεζα	κ.ο.α	-	50	Λασίθι, Ιεράπετρα	κ.ο.α	-

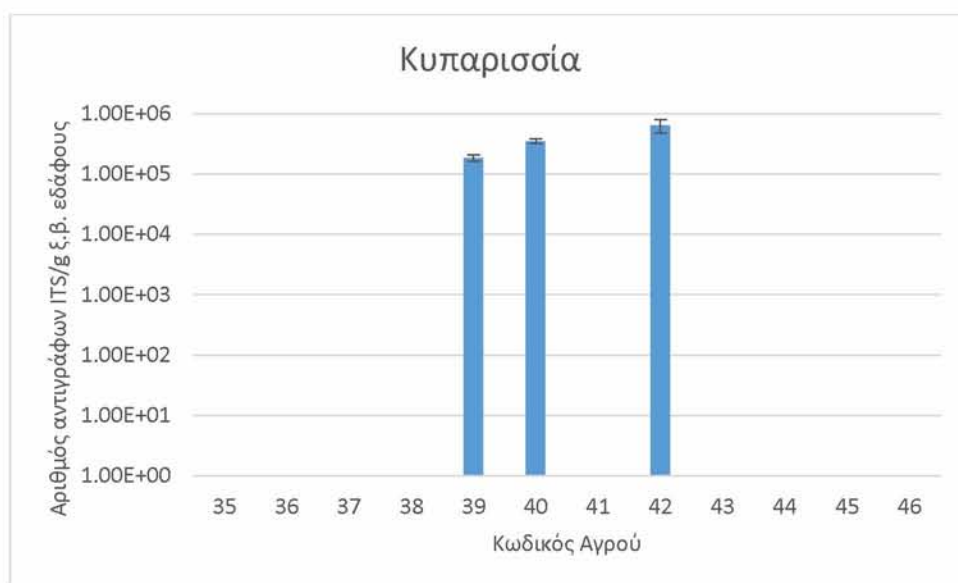
13		κ.ο.α	-	51	Λασιίθι, Ιεράπετρα	κ.ο.α	-
14	Λασιίθι	κ.ο.α	-	52	Λασιίθι, Ιεράπετρα	κ.ο.α	-
15	Λασιίθι	3.98×10^5	2.9×10^5	53	Λασιίθι, Ιεράπετρα	κ.ο.α	-
16	Λασιίθι	κ.ο.α	-	54	Λασιίθι, Ιεράπετρα	κ.ο.α	-
17	Λασιίθι	9.9×10^4	3.5×10^4	55	Λασιίθι, Ιεράπετρα, Χωστό	κ.ο.α	-
18	Λασιίθι	κ.ο.α	-	56	Λασιίθι, Ιεράπετρα, Γαβρίλης	κ.ο.α	-
19	Λασιίθι	κ.ο.α	-	57	Λασιίθι, Ιεράπετρα, Γούδουρα ς	κ.ο.α	-
20	Λασιίθι	κ.ο.α	-	58	Λασιίθι, Ιεράπετρα, Γούδουρα ς	κ.ο.α	-
21	Λασιίθι	κ.ο.α	-	59	Ηράκλειο, Τυμπάκι	κ.ο.α	-
22	Λασιίθι	κ.ο.α	-	60	Ηράκλειο, Τυμπάκι	κ.ο.α	-
23	Λασιίθι	κ.ο.α	-	61	Ηράκλειο, Τυμπάκι	κ.ο.α	-
24	Λασιίθι	κ.ο.α	-	62	Ηράκλειο, Τυμπάκι	κ.ο.α	-
25	Λασιίθι	κ.ο.α	-	63	Ηράκλειο, Τυμπάκι	κ.ο.α	-
26	Λασιίθι	κ.ο.α	-	64	Ηράκλειο, Τυμπάκι	κ.ο.α	-
27	Λασιίθι	κ.ο.α	-	65	Ηράκλειο, Τυμπάκι	κ.ο.α	-
28	Λασιίθι	κ.ο.α	-	66	Ηράκλειο, Τυμπάκι	κ.ο.α	-
29	Λασιίθι	κ.ο.α	-	67	Ηράκλειο, Τυμπάκι	κ.ο.α	-
30	Λασιίθι	κ.ο.α	-	68	Ηράκλειο, Τυμπάκι	κ.ο.α	-
31	Λασιίθι	κ.ο.α	-	69	Ηράκλειο, Τυμπάκι	κ.ο.α	-
32	Λασιίθι	κ.ο.α	-	70	Ηράκλειο, Τυμπάκι	κ.ο.α	-
33	Λασιίθι	κ.ο.α	-	71	Ηράκλειο, Τυμπάκι	3.5×10^5	1.8×10^4
34	Λασιίθι	κ.ο.α	-	72	Ηράκλειο, Τυμπάκι	κ.ο.α	-
35	Απρίλης	κ.ο.α	-	73	Ηράκλειο, Τυμπάκι	7.0×10^5	2.5×10^5
36	Αγ. Κυριακή	κ.ο.α	-	74	Ηράκλειο, Τυμπάκι	κ.ο.α	-
37	Αγ. Κυριακή	κ.ο.α	-	75	Ηράκλειο, Τυμπάκι	κ.ο.α	-
38	Λιμενάρι	κ.ο.α	-				



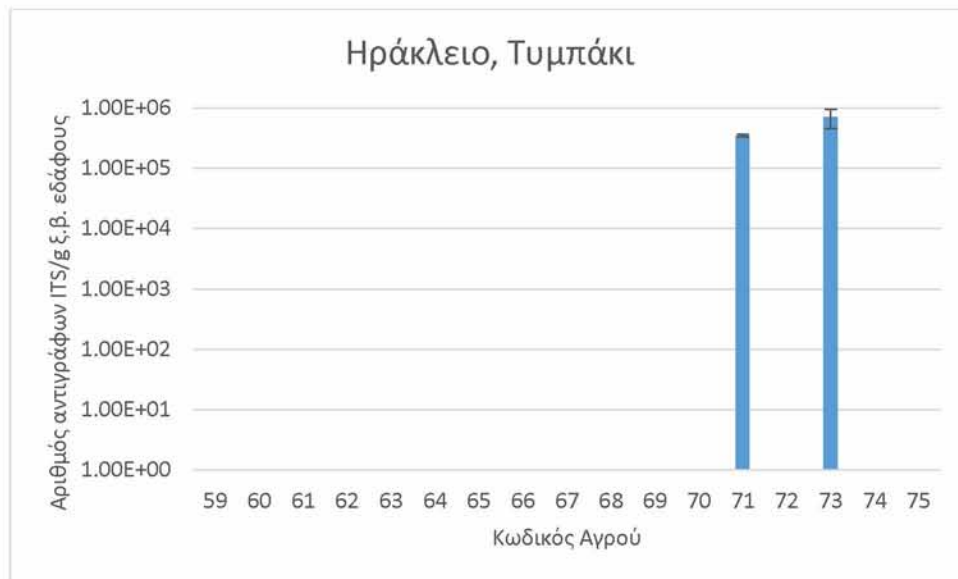
Γράφημα 20. Η αφθονία του μύκητα *Pyrenochaeta lycopersici* τύπος II σε δείγματα εδάφους από την περιοχή της Πρέβεζας όπως προσδιορίστηκε με την μέθοδο PCR πραγματικού χρόνου και εκφράστηκε ως αριθμός αντιγράφων του γονιδιακού τόπου ITS ανά γραμμάριο ξηρού θάρους εδάφους. Κάθε τιμή είναι ο μέσος όρος των επαναλήψεων ± την τυπική απόκλιση.



Γράφημα 21. Η αφθονία του μύκητα *Pyrenochaeta lycopersici* τύπος II σε δείγματα εδάφους από την περιοχή του Λασιθίου όπως προσδιορίστηκε με την μέθοδο PCR πραγματικού χρόνου και εκφράστηκε ως αριθμός αντιγράφων του γονιδιακού τόπου ITS ανά γραμμάριο ξηρού βάρους εδάφους. Κάθε τιμή είναι ο μέσος όρος των επαναλήψεων ± την τυπική απόκλιση.



Γράφημα 22. Η αφθονία του μύκητα *Pyrenochaeta lycopersici* τύπος II σε δείγματα εδάφους από την περιοχή της Κυπαρισσίας όπως προσδιορίστηκε με την μέθοδο PCR πραγματικού χρόνου και εκφράστηκε ως αριθμός αντιγράφων του γονιδιακού τόπου ITS ανά γραμμάριο ξηρού βάρους εδάφους. Κάθε τιμή είναι ο μέσος όρος των επαναλήψεων ± την τυπική απόκλιση.

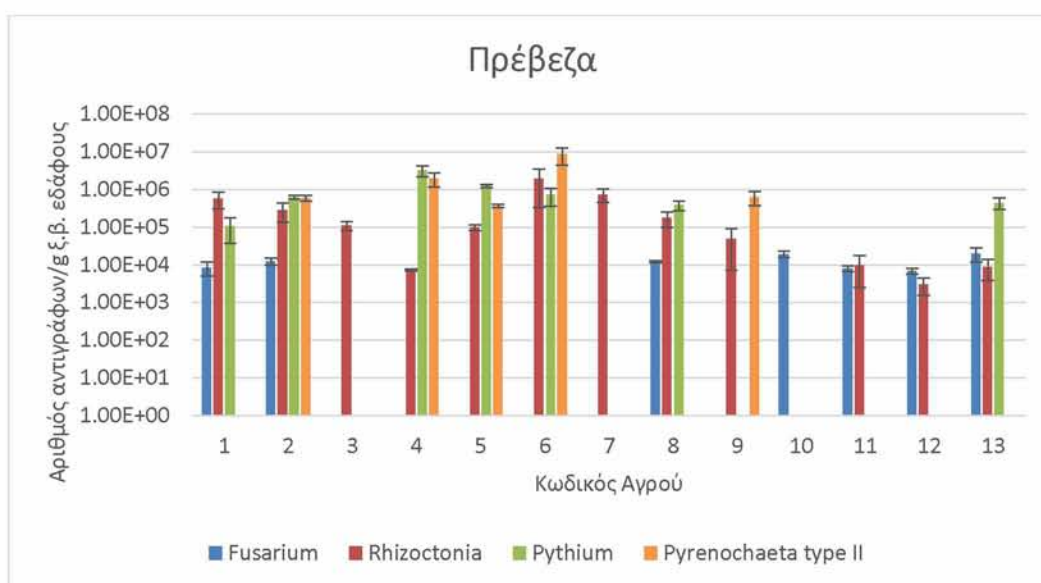


Γράφημα 23. Η αφθονία του μύκητα *Pyrenochaeta lycopersici* τύπος II σε δείγματα εδάφους από την περιοχή του Τυμπακίου όπως προσδιορίστηκε με την μέθοδο PCR πραγματικού χρόνου και εκφράστηκε ως αριθμός αντιγράφων του γονιδιακού τόπου ITS ανά γραμμάριο ξηρού βάρους εδάφους. Κάθε τιμή είναι ο μέσος όρος των επαναλήψεων ± την τυπική απόκλιση.

3.3 Εκτίμηση του πληθυσμού των φυτοπαθογόνων μυκήτων ανά περιοχή

3.3.1 Πρέβεζα

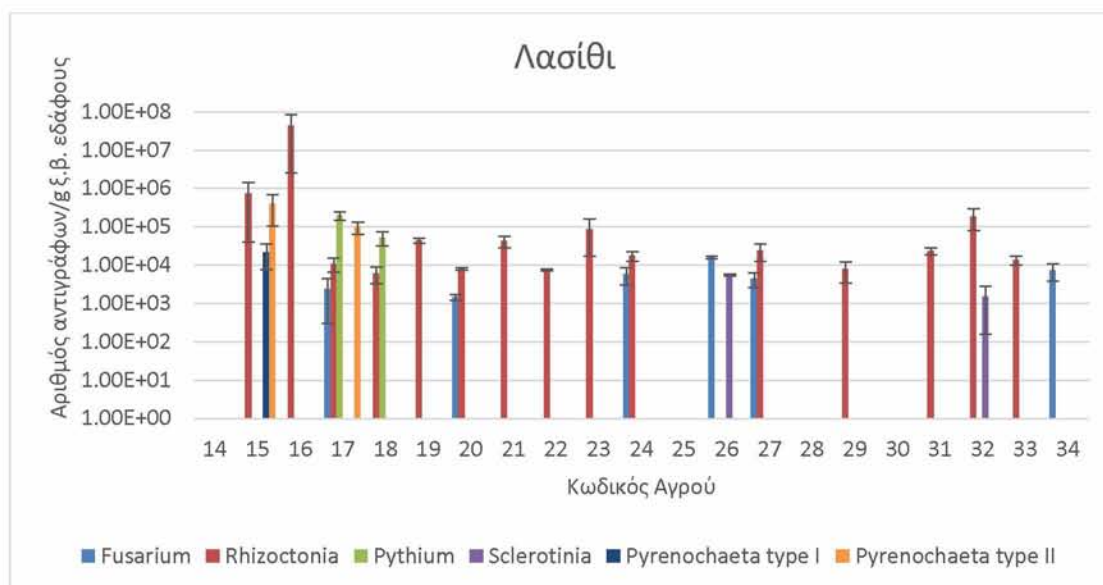
Συνοπτικά η περιοχή της Πρέβεζας εμφανίζει μεγάλη ποικιλότητα εδαφογενών παθογόνων μυκήτων με συστηματική ανίχνευση των *Rhizoctonia solani* (12/14 δείγματα), *Pythium ultimum* (7/12 δείγματα) και *Fusarium oxysporum* (7/12 δείγματα) ενώ σε 5/12 δείγματα ανιχνεύθηκαν πληθυσμοί του *Pyrenochaeta lycopersici* τύπος II (Γράφημα 24). Στην περιοχή της Πρέβεζας εντοπίστηκαν δείγματα εδάφους όπως το No. 2 όπου ανιχνεύτηκαν ταυτόχρονα 4 εδαφογενή παθογόνα (*F. oxysporum*, *R. solani*, *P. ultimum*, *Pyrenochaeta lycopersici*) και αρκετά όπου ανιχνεύθηκαν 3 παθογόνα όπως τα εδάφη No. 1, 4, 5, 6, 8 & 13 καταδεικνύοντας την υψηλή πίεση των καλλιεργειών με εδαφογενή παθογόνα στην συγκεκριμένη περιοχή.



Γράφημα 24. Συγκεντρωτικά τα επίπεδα των πληθυσμών των μυκήτων που ανιχνεύθηκαν στα δείγματα εδάφους από την περιοχή της Πρέβεζας

3.3.2 Λασιθί

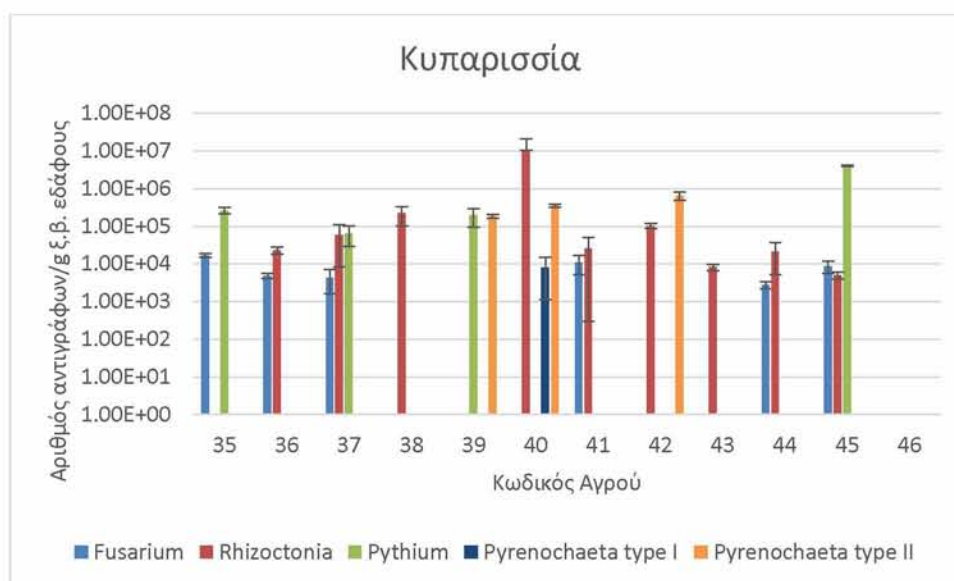
Η περιοχή του Λασιθίου, από όπου και αναλύθηκαν 21 εδαφικά δείγματα, εμφανίζει την μεγαλύτερη ποικιλότητα φυτοπαθογόνων εδαφογενών μυκήτων. Το *Rhizoctonia solani* ανιχνεύθηκε με την μεγαλύτερη συχνότητα (15/21 δείγματα) και ακολούθησε το *Fusarium oxysporum* (6/21 δείγματα) ενώ οι υπόλοιποι φυτοπαθογόνοι μύκητες εντοπίστηκαν μόνο σποραδικά (Γράφημα 25). Στα περισσότερα από τα εδάφη της περιοχής του Λασιθίου εντοπίστηκαν από 1-2 παθογόνα με εξαίρεση τα εδάφη No. 15 και 17 όπου εντοπίστηκαν 3 και 4 διαφορετικά παθογόνα αντίστοιχα. Σε 4 από τα εδάφη της περιοχής τα επίπεδα των εδαφογενών φυτοπαθογόνων μυκήτων ήταν κάτω από το όριο ανίχνευσης (εδάφη με αρίθμηση 14, 25, 28 και 30).



Γράφημα 25. Συγκεντρωτικά τα επίπεδα των πληθυσμών των μυκήτων που ανιχνεύθηκαν στα δείγματα εδάφους από την περιοχή του Λασιθίου.

3.3.3 Κυπαρισσία

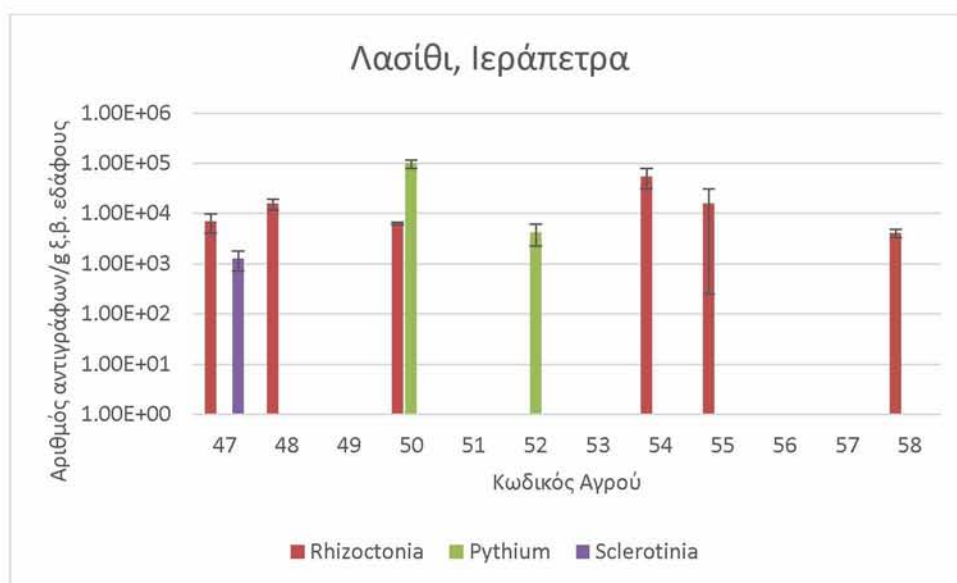
Στην περιοχή της Κυπαρισσίας και πάλι ο μύκητας *Rhizoctonia solani* ανιχνεύτηκε με την μεγαλύτερη συχνότητα (9/12 δείγματα) με το *Fusarium oxysporum* να ακολουθεί καθώς ανιχνεύτηκε σε 6/12 δείγματα. Τέλος σε 3 και 4 δείγματα αντίστοιχα ανιχνεύθηκαν υψηλοί πληθυσμοί *Pyrenochaeta lycopersici* (κυρίως τύπος II) και *Pythium ultimum* αντίστοιχα (Γράφημα 26). Στα περισσότερα από τα εδάφη της συγκεκριμένης περιοχής εντοπίστηκαν από 1-2 παθογόνα με εξαίρεση τα εδάφη Νο. 37, 40 και 45 όπου εντοπίστηκαν 3 διαφορετικά παθογόνα. Σε ένα από τα εδάφη της περιοχής (έδαφος με αρίθμηση 46) τα επίπεδα των εδαφογενών φυτοπαθογόνων μυκήτων ήταν κάτω από το όριο ανίχνευσης.



Γράφημα 26. Συγκεντρωτικά τα επίπεδα των πληθυσμών των μυκήτων που ανιχνεύθηκαν στα δείγματα εδάφους από την περιοχή της Κυπαρισσίας.

3.3.4 Ιεράπετρα

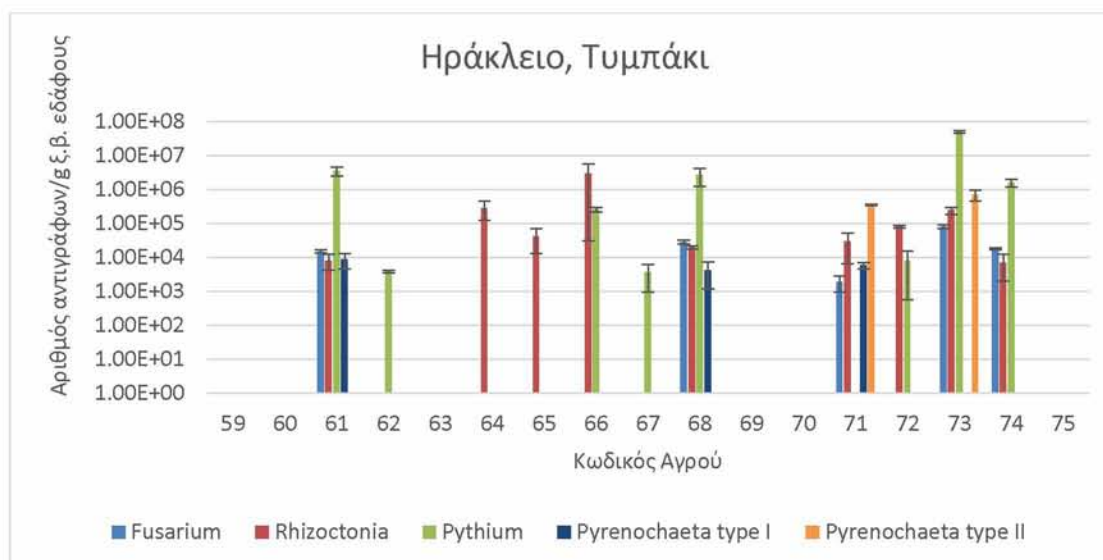
Στην περιοχή της Ιεράπετρας παρατηρήθηκε η χαμηλότερη ποικιλότητα εδαφογενών φυτοπαθογόνων μυκήτων καθώς δεν ανιχνεύθηκαν τα είδη *Fusarium oxysporum* και *Pyrenochaeta lycopersici* (Γράφημα 27). Μύκητες του είδους *Rhizoctonia solani* ανιχνεύθηκαν και πάλι με την μεγαλύτερη συχνότητα (6/12 δείγματα) ενώ σε 3 δείγματα ανιχνεύθηκαν πληθυσμοί των μυκήτων *Pythium ultimum* και *Sclerotinia sclerotiorum*. Στα περισσότερα εδάφη της περιοχής εντοπίστηκε ένα μόνο εδαφογενές φυτοπαθογόνο με εξαίρεση τα εδάφη με αρίθμηση 47 και 50 όπου ανιχνεύθηκαν 2 παθογόνοι μύκητες. Στα μισά περίπου (5 από τα 12) εδάφη της περιοχής (εδάφη με αρίθμηση 49, 51, 53, 56 και 57) τα επίπεδα πληθυσμού των εδαφογενών φυτοπαθογόνων μυκήτων που μελετήθηκαν βρίσκονταν κάτω από το όριο ανίχνευσης της μεθόδου.



Γράφημα 27. Συγκεντρωτικά τα επίπεδα των πληθυσμών των μυκήτων που ανιχνεύθηκαν στα δείγματα εδάφους από την περιοχή της Ιεράπετρας.

3.3.5 Τυμπάκι

Τέλος στην περιοχή του Τυμπακίου από όπου αναλύθηκαν 17 δείγματα καταγράφηκε συχνή ανίχνευση των μυκήτων *R. solani* (9/17), *P. ultimum* (8/17) και *Fusarium oxysporum* (5/17) ενώ σε 4 δείγματα εντοπίστηκαν πληθυσμοί *Pyrenochaeta lycopersici* με τα τρία εξ αυτών να εμφανίζουν πληθυσμούς του τύπου I σε αντίθεση με όλες τις άλλες περιοχές όπου ήταν κυρίαρχος ο τύπος II (Γράφημα 28). Στα περισσότερα εδάφη της περιοχής εντοπίστηκαν κυρίως 1-2 φυτοπαθογόνα ενώ σε 5 εδάφη (με αρίθμηση 61, 68, 71, 73 και 74) ανιχνεύθηκαν ταυτόχρονα πληθυσμοί περισσότερων των 3 διαφορετικών εδαφογενών φυτοπαθογόνων μυκήτων. Τέλος θα πρέπει να τονιστεί ότι στο 1/3 περίπου των δειγμάτων από την συγκεκριμένη περιοχή δεν ανιχνεύθηκαν πληθυσμοί κανενός από τα φυτοπαθογόνα που μελετήθηκαν.



Γράφημα 28. Συγκεντρωτικά τα επίπεδα των πληθυσμών των μυκήτων που ανιχνεύθηκαν στα δείγματα εδάφους από την περιοχή του Τυμπακίου.

Συνολικά σε όλες τις περιοχές οι πληθυσμοί του μύκητα *R. solani* εντοπίστηκαν με την μεγαλύτερη συχνότητα ενώ ακολούθησαν οι μύκητες *P. ultimum* (Πρέβεζα και Τυμπάκι κυρίως) και *F. oxysporum* (Πρέβεζα, Λασιθί, Κυπαρισσία και λιγότερο Τυμπάκι). Πληθυσμοί του μύκητα *Pyrenochaeta lycopersici* εντοπίστηκαν με υψηλή συχνότητα μόνο στην Πρέβεζα (αποκλειστικά τύπου II) και μόνο σποραδικά στις υπόλοιπες περιοχές με τον τύπο II να κυριαρχεί σε όλες τις περιοχές εκτός του Τυμπακίου, όπου επικρατεί ο τύπος I (Πίνακας 30). Συγκρίνοντας τις διάφορες περιοχές που μελετήθηκαν οι περιοχές της Πρέβεζας, Κυπαρισσίας και λιγότερο του Λασιθίου εμφανίζουν την υψηλότερη πίεση με πληθυσμούς εδαφογενών φυτοπαθογόνων μυκήτων ενώ οι λιγότερο επιβαρυνμένες περιοχές είναι η Ιεράπετρα και το Τυμπάκι (Πίνακας 30).

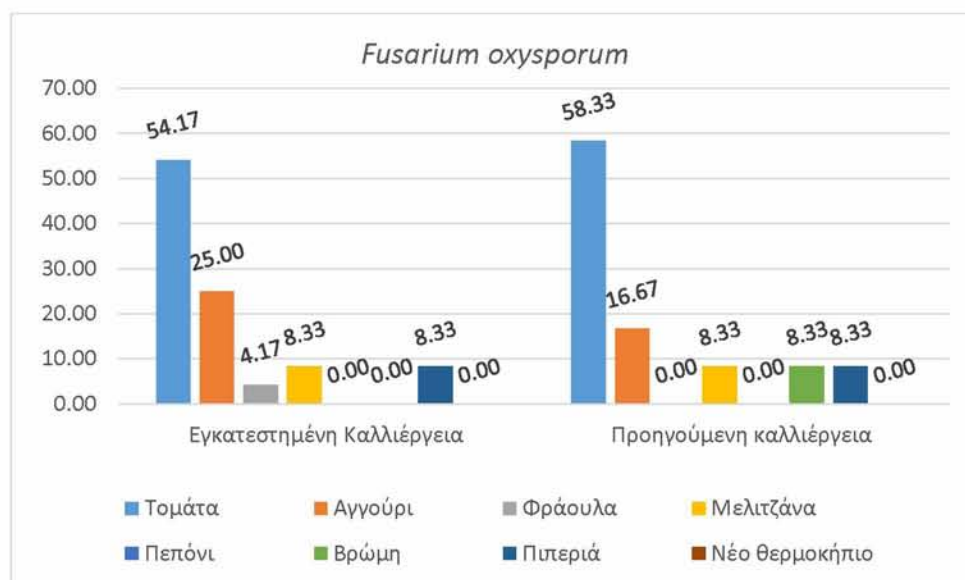
Πίνακας 30 Συχνότητες εμφάνισης (% των δειγμάτων που εξετάστηκαν) του κάθε φυτοπαθογόνου μύκητα σε κάθε περιοχή.

Μύκητες	Πρέβεζα	Λασιθί	Κυπαρισσία	Ιεράπετρα	Τυμπάκι
<i>Fusarium oxysporum</i>	53.8	28.6	50.0	0.0	29.4
<i>Rhizoctonia solani</i>	92.3	71.4	75.0	50.0	52.9
<i>Pythium ultimum</i>	53.8	9.5	33.3	16.7	47.1
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	0.0	9.5	0.0	8.3	0.0
<i>Pyrenochaeta lycopersici I</i>	0.0	4.8	8.3	0.0	17.6
<i>Pyrenochaeta lycopersici II</i>	38.5	9.5	25.0	0.0	11.8

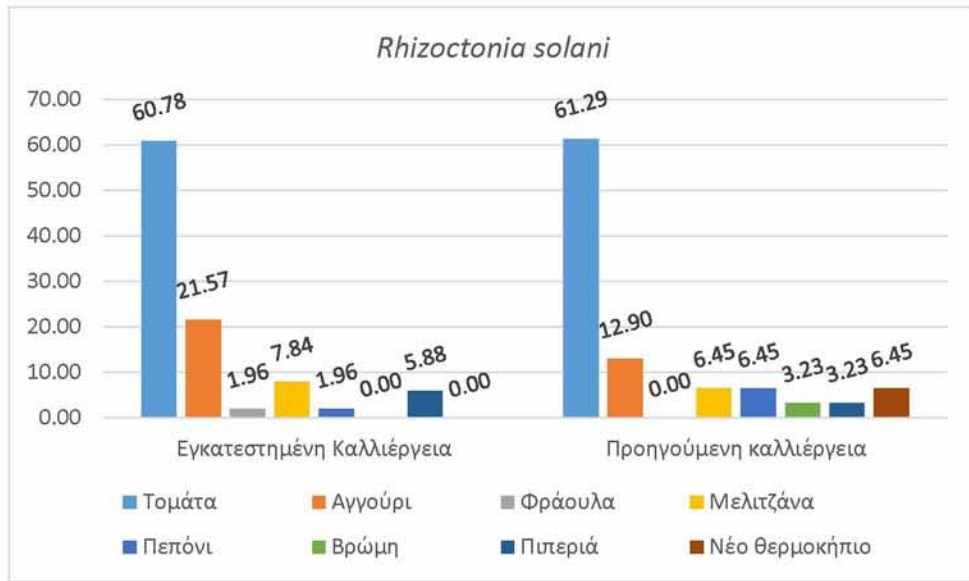
3.4 Συσχέτιση της ποικιλότητας των εδαφογενών φυτοπαθογόνων μυκήτων και της καλλιέργειας του αγρού.

Για την περαιτέρω ερμηνεία των αποτελεσμάτων μελετήθηκαν και πιθανές συσχετίσεις μεταξύ μυκήτων και καλλιεργειών, προηγούμενης και τρέχουσας ήταν εγκατεστημένη στο θερμοκήπιο τη στιγμή της δειγματοληψίας. Σύμφωνα με τα γραφήματα 29 έως 34 η πλειοψηφία των θερμοκηπίων όπου παρατηρήθηκαν υψηλοί πληθυσμοί φυτοπαθογόνων μυκήτων είχαν ως προηγούμενη ή εγκατεστημένη καλλιέργεια τομάτας. Αναλυτικότερα, το 54.2% των εδαφών στα οποία παρατηρήθηκε υψηλή αφθονία του φυτοπαθογόνου μύκητα

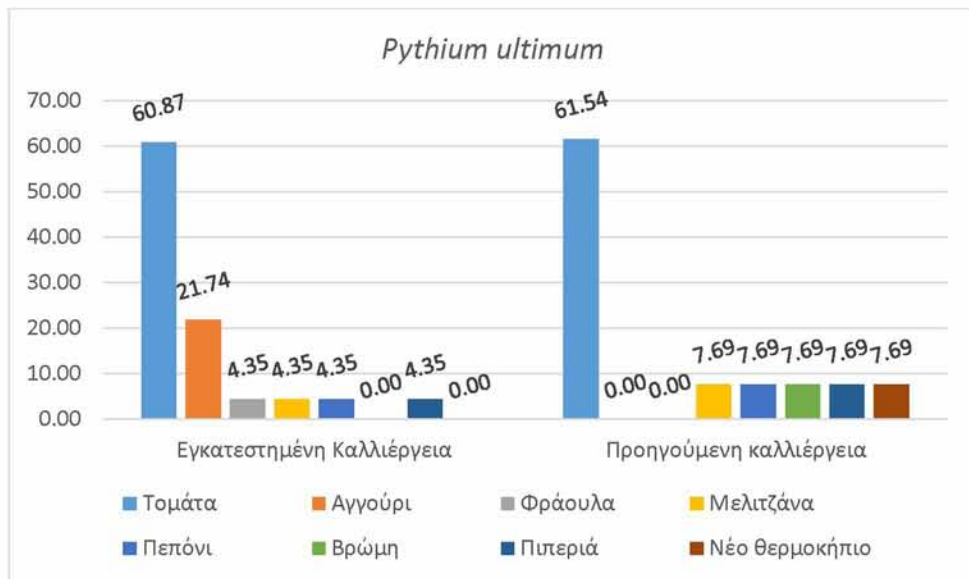
Fusarium oxysporum είχαν εγκατεστημένη καλλιέργεια τομάτας. Αντίστοιχα, το 25% είχε εγκατεστημένη καλλιέργεια αγγουριού ενώ ακολουθούν οι καλλιέργειες φράουλας, μελιτζάνας και πιπεριάς με ποσοστά 4.2%, 8.3% και 8.3% αντίστοιχα (Γράφημα 29). Παρόμοια αποτελέσματα εμφανίζονται και για τον μύκητα *Rhizoctonia solani*, όπου το 60.8% των εδαφών όπου καταγράφηκε υψηλή αφθονία του μύκητα, είχαν εγκατεστημένη καλλιέργεια τομάτας, το 21.6% αγγουριού, το 7.8% μελιτζάνας, το 5.9% πιπεριάς και το 1.96% φράουλας και πεπονιού αντίστοιχα (Γράφημα 30). Όσον αφορά τα εδάφη όπου παρατηρήθηκε ο μύκητας *Rythium ultimum*, το 60.9% αντιστοιχεί σε καλλιέργειες τομάτας, το 21.7% αγγουριού και το 4.4% σε καλλιέργειες φράουλας, μελιτζάνας, πεπονιού και πιπεριάς αντίστοιχα (Γράφημα 31). Από τα εδάφη όπου ανιχνεύθηκαν οι μύκητες *P. lycopersici* τύποι I και II, το 80% και 83.33% αντιστοιχεί σε καλλιέργειες τομάτας, το 20% σε καλλιέργεια πιπεριάς στην περίπτωση του τύπου I και το 16.7% σε καλλιέργειες αγγουριού στην περίπτωση του τύπου II (Γράφημα 33Γράφημα 34). Ο μύκητας *Sclerotinia sclerotiorum* είναι ο μοναδικός που διαφέρει από το παραπάνω πρότυπο καθώς από τα 3 εδάφη στα οποία ανιχνεύθηκε τα 2 είχαν εγκατεστημένη καλλιέργεια πιπεριάς και το 1 ντομάτας (Γράφημα 32). Παρόλα αυτά οι παραπάνω συσχετίσεις για μύκητα *S. sclerotiorum* θα πρέπει να αξιολογηθούν με προσοχή λόγω του μικρού αριθμού των δειγμάτων που βρέθηκαν θετικά ως προς την παρουσία του συγκεκριμένου μύκητα.



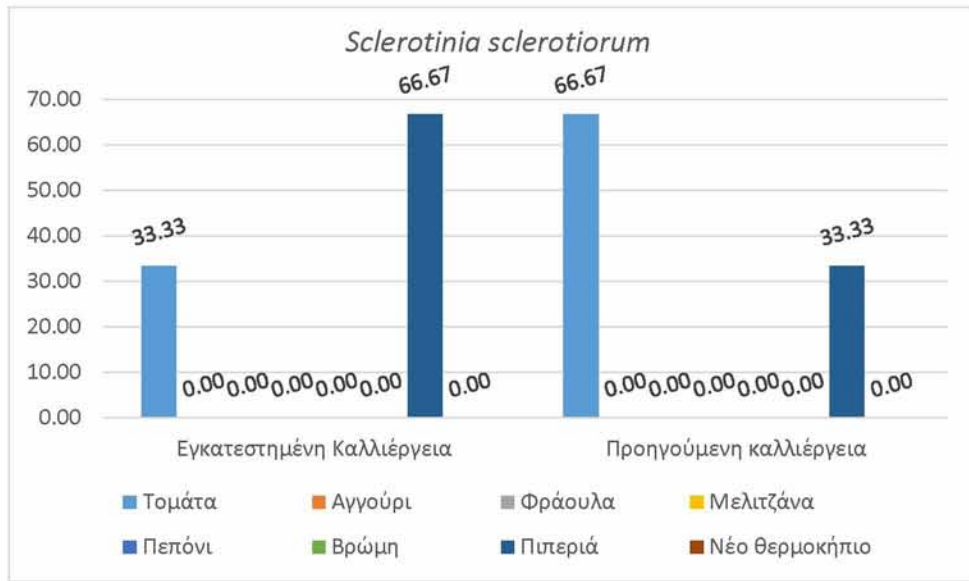
Γράφημα 29. Εκατοστιαία ποσοστά των οπωροκηπευτικών της εγκατεστημένης και προηγούμενης καλλιέργειας των εδαφών όπου ανιχνεύθηκε ο μύκητας *F. oxysporum*.



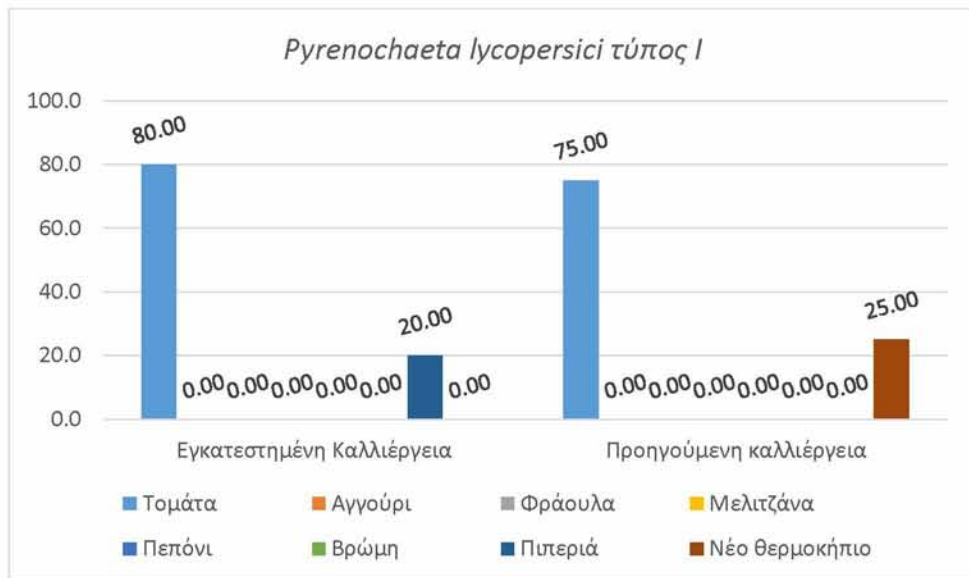
Γράφημα 30. Εκατοστιαία ποσοστά των οπωροκηπευτικών της εγκατεστημένης και προηγούμενης καλλιέργειας των εδαφών όπου ανιχνεύθηκε ο μύκητας *R. solani*.



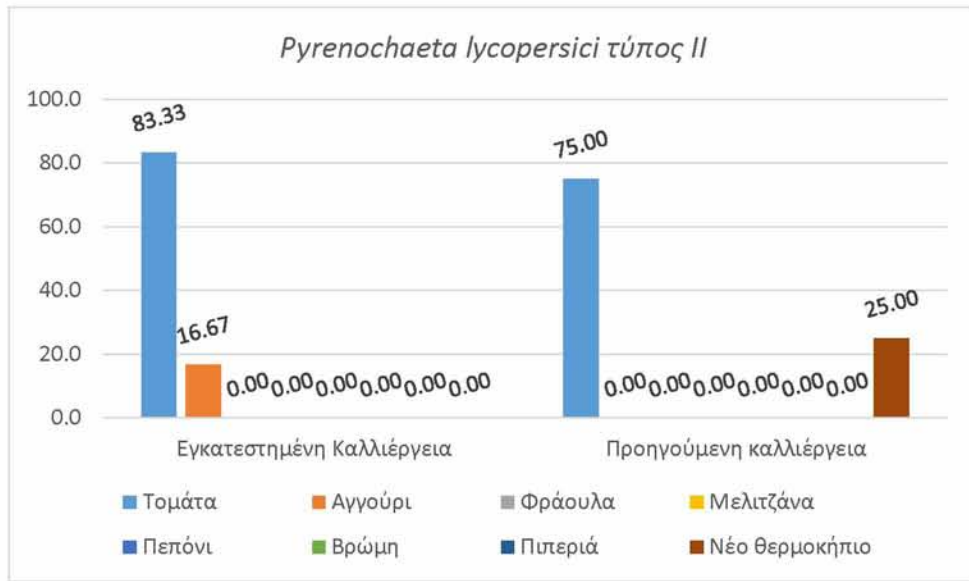
Γράφημα 31. Εκατοστιαία ποσοστά των οπωροκηπευτικών της εγκατεστημένης και προηγούμενης καλλιέργειας των εδαφών όπου ανιχνεύθηκε ο μύκητας *P. ultimum*.



Γράφημα 32. Εκατοστιαία ποσοστά των οπωροκηπευτικών της εγκατεστημένης και προηγούμενης καλλιέργειας των εδαφών όπου ανιχνεύθηκε ο μύκητας *S. sclerotiorum*.



Γράφημα 33. Εκατοστιαία ποσοστά των οπωροκηπευτικών της εγκατεστημένης και προηγούμενης καλλιέργειας των εδαφών όπου ανιχνεύθηκε ο μύκητας *P. lycopersici* τύπος I.



Γράφημα 34. Εκατοστιαία ποσοστά των οπωροκηπευτικών της εγκατεστημένης και προηγούμενης καλλιέργειας των εδαφών όπου ανιχνεύθηκε ο μύκητας *P. lycopersici* τύπος II.

4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι ασθένειες των φυτών είναι τεράστιας σημασίας για τον άνθρωπο καθώς προσβάλλουν φυτά και προϊόντα φυτών στα οποία ο άνθρωπος βασίζεται για διατροφή, ένδυση, επίπλωση και πολλά άλλα. Οι ασθένειες των φυτών καταλήγουν είτε σε απώλεια ποσότητας είτε σε απώλεια ποιότητας και μπορούν να έχουν επιπτώσεις στα είδη των φυτών που αναπτύσσονται σε μια περιοχή, στην υγεία των καταναλωτών, στην βιομηχανία και στην οικονομία. (Agrios 2005b). Στην παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή εξετάστηκε η αφθονία των *Verticillium dahliae*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani*, *Pythium ultimum*, *Sclerotinia sclerotiorum* και *Pyrenochaeta lycopersici* τύποι I και II. Οι *V. dahliae*, *F. oxysporum*, *P. lycopersici* και *S. Sclerotiorum* προκαλούν σημαντικά προβλήματα στον αγρό καθώς μπορούν να προσβάλλουν φυτά στα ύστερα στάδια της ανάπτυξης τους. Σε αντίθεση μύκητες των ειδών *R. solani* και *P. ultimum* προσβάλλουν κυρίως σπόρους και νεαρές ρίζες και βλαστούς με αποτέλεσμα να αποτελούν σημαντικά προβλήματα σε φυτώρια κυρίως.

Οι αδρομυκώσεις που προκαλεί ο *V. dahliae* αποτελούν μια από τις πιο σημαντικές ασθένειες των φυτών παγκοσμίως, διότι το μεγάλο εύρος ξενιστών και η καταστροφικότητά της ασθένειας καταλήγουν σε απώλειες πιθανότατα δισεκατομμυρίων σε ολόκληρο τον κόσμο (Lazarovits et al. 2010). Για την αντιμετώπισή του οι καλλιεργητές βασίζονται στην πρόληψη και φροντίζουν να φυτεύουν υγιή φυτά σε υγιείς αγρούς και να ακολουθούν ορθές καλλιεργητικές πρακτικές. Στην παρούσα μεταπτυχιακή εργασία, αποδείχτηκε πως αυτές οι πρακτικές έχουν αποτέλεσμα καθώς ο *V. dahliae* δεν εντοπίστηκε σε κανένα έδαφος σε ποσότητα μεγαλύτερη του ορίου ανίχνευσης (10^1 αντίγραφα του γονιδίου της β-τουμπουλίνης).

Παρόμοιας φύσης ήταν και η παρουσία του *S. sclerotiorum* στα εδάφη ο οποίος εντοπίστηκε μόνο σε 3 από το σύνολο των 75 εδαφικών δειγμάτων, τα οποία μάλιστα προέρχονται από την ίδια περιοχή, αυτή του Λασιθίου. Ο *S. sclerotiorum* προκαλεί την σκληρωτινίαση, καταστροφική ασθένεια των φυτών η οποία μπορεί να προσβάλλει ποικιλία καλλιεργούμενων φυτών σε όλα τα στάδια της ανάπτυξής του. Για την αντιμετώπισή του επιστρατεύονται κυρίως καλλιεργητικές πρακτικές (Saharan et al. 2008; Agrios 2005b). Θα πρέπει να τονιστεί ότι ένα πιθανό λόγο για την χαμηλή συχνότητα ανίχνευσης του συγκεκριμένου μύκητα είναι η ανθεκτικότητα των σποριών του (σκληροτίων) στην λύση με αποτέλεσμα να μην καθίσταται δυνατή εξαγωγή DNA από αυτά και άρα και η ανίχνευση τους με μοριακές μεθόδους.

Από την άλλη οι φυτοπαθογόνοι μύκητες *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani* και *Pythium ultimum* ανιχνεύθηκαν στα περισσότερα εδαφικά δείγματα και μάλιστα με αρκετά υψηλή αφθονία. Αυτό οφείλεται στην φύση και βιολογία του κάθε μύκητα.

Ο *R. solani* έχει την ικανότητα να δημιουργεί σκληρώτια, με τα οποία μπορεί να επιβιώσει στο έδαφος για χρόνια (Sneh et al. 1996). Οπότε εάν ο *R. solani* αποικήσει ένα έδαφος, δυνητικά, μπορεί να παραμείνει εκεί επ' αορίστων (Agrios 2005c). Γι' αυτό και εντοπίζεται στην πλειοψηφία των εδαφών όλων των περιοχών που μελετήθηκαν. Εκτός αυτού οι μύκητες του συγκεκριμένου είδους είναι σαπρότροφοι που μπορούν να μεγαλώνουν σε νεκρή οργανική ύλη χωρίς απαραίτητα να εκφέρουν φυτοπαθογόνο δράση.

Ο *P. ultimum* παράγει επίσης ανθεκτικές μορφές με τις οποίες επιβιώνει για μεγάλα χρονικά διαστήματα. Σε αυτή τη περίπτωση είναι τα ανθεκτικά ωσπόρια που παράγονται κατά την αυτογονιμοποίηση του μύκητα τα οποία έχουν την δυνατότητα να επιβιώνουν ακόμη και σε δυσμενείς συνθήκες θερμοκρασίας και υγρασίας (Martin et al. 1999).

Οι ανθεκτικές μορφές του *F. oxysporum* είναι τα χλαμυδοσπόρια, με τα οποία μπορεί να επιβιώσει αρκετά χρόνια στο έδαφος, απουσία ξενιστή (Kang et al. 2014). Ακόμη, ο εν λόγω μύκητας παράγει μικρο- και μακρο- κονίδια, μορφές σπορίων οι οποίες συμβάλλουν στη διασπορά του μύκητα (Nelson 1981). Αυτό σημαίνει ότι εφόσον σχηματιστούν τα σπόρια, οποιαδήποτε επιφάνεια στο εσωτερικό του θερμοκηπίου μπορεί να θεωρηθεί μολυσμένη. Το είδος *F. oxysporum* περιλαμβάνει φυλές οι οποίες εξειδικεύονται στην προσβολή συγκεκριμένων ξενιστών. Επομένως, η μονοκαλλιέργεια ενός συγκεκριμένου οπωροκηπευτικού στα θερμοκήπια υποβοηθά την εγκαθίδρυση του μύκητα. Παρόλα αυτά, στην παρούσα εργασία δεν ήταν δυνατόν να εντοπίσουμε ποια συγκεκριμένη φυλή έδρευε σε κάθε έδαφος. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την αντίδραση της PCR πραγματικού χρόνου στοχεύουν στο γονίδιο FOW1, μια μιτοχονδριακή πρωτεΐνη-μεταφορέα που παίζει σημαντικό ρόλο στην έκφραση παθογένειας των μυκήτων του είδους *F. oxysporum* (Li et al. 2014a). Με βάση αυτό η αφθονία του *F. oxysporum* που ανιχνεύθηκε στα εδάφη που εξετάστηκαν αντιστοιχεί σε στελέχη με φυτοπαθογόνο δράση χωρίς όμως με την PCR πραγματικού χρόνου να είναι δυνατό να εντοπίσουμε τις φυλές του μύκητα που εντοπίζονται σε κάθε έδαφος. Ο Inoue και η ομάδα του το 2002 μελέτησαν τη δράση του γονιδίου FOW1 και τη διατήρησή του μεταξύ των φυλών *f.sp. cucumerinum*, *lycopersici*, και *raphani*. Μετά την πραγματοποίηση αντίδρασης PCR και αλληλούχισης κατέληξαν στο ότι, παρόλο που σε όλα τα υπο εξέταση φύλα τα προϊόντα της αντίδρασης PCR είχαν το ίδιο μέγεθος η αλληλουχία των νουκλεοτιδίων άλλαζε κατά 1-3 νουκλεοτίδια. Παρόλα αυτά, τη δεδομένη στιγμή, δεν υπάρχει κάποια μελέτη η οποία να συσχετίζει την νουκλεοτιδική αλληλουχία του FOW1 γονιδίου με κάποια συγκεκριμένη φυλή του *F. oxysporum*.

Όσον αφορά τον *Pyrenochaeta lycopersici*, μετά από μελέτη των αποτελεσμάτων, φάνηκε ότι ο τύπος II κυριάρχησε έναντι του τύπου I στην συντριπτική πλειοψηφία των εδαφών των αγρών που εξετάστηκαν. Αυτά τα αποτελέσματα έρχονται σε συμφωνία με τα ευρήματα των Infantino και Rucci (2005), οι οποίοι εντόπισαν μόνο τον τύπο II στα εδάφη αγρών τομάτας από την Ιταλία. Παρόμοια αποτελέσματα αναφέρθηκαν και σε προηγούμενες μελέτες που πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο "Βιοτεχνολογίας Φυτών και Περιβάλλοντος" (Κατσούλα et al. 2015, Παπαδημητρίου 2015).

Στην περιοχή της Πρέβεζας ανιχνεύτηκαν, στην πλειοψηφία των εδαφικών δειγμάτων, τρία παθογόνα ταυτόχρονα (και σε μια περίπτωση 4) καταδεικνύοντας την υψηλή πίεση των εδαφών με παθογόνα στην περιοχή αυτή. Οι καλλιέργειες του νομού Πρέβεζας πολύ συχνά προσβάλλονται από φυτοπαθογόνους μύκητες για αυτό και διάφορες τεχνικές έχουν χρησιμοποιηθεί για την αντιμετώπισή τους (Tjamos et al 2000). Πιο συγκεκριμένα, η μεθοδος της ηλιοαπολύμανσης εδάφους χρησιμοποιείται τις τελευταίες δεκαετίες για την καταπολέμηση των μυκητών *V. dahliae*, *F. oxysporum*, *Pyrenochaeta lycopersici*, *S. sclerotiorum* και του βακτηρίου *Clavibacter michiganensis subsp. Michiganensis* (Tjamos et al, 2008) με πολύ μεγάλη αποτελεσματικότητα αν και στην παρούσα εργασία η αφθονία του μύκητα *F. oxysporum* είναι αρκετά υψηλή και εντοπίζεται σε μεγάλο αριθμό αγρών.

Η περιοχή της Κυπαρισσίας ήταν λιγότερο επιβαρυνόμενη από αυτή της Πρέβεζας και σε κάθε αγρό εντοπίζονταν κατά μέσο όρο 2 φυτοπαθογόνοι μύκητες, σε υψηλά επίπεδα αφθονίας. Στην Κυπαρισσία λαμβάνουν χώρα εντατικές καλλιέργειες οπωροκηπευτικών όπως η ντομάτα, το αγγούρι και η πιπεριά. Αυτό έχει προκαλέσει την εμφάνιση φυτοπαθογόνων μυκήτων όπως *V. dahliae*, *F. oxysporum* και *S. sclerotiorum*. Οι καλλιεργητές αντιμετωπίζουν τους συγκεκριμένους μύκητες κυρίως με εφαρμογή της ηλιοαπολύμανσης (Tjamos et al. 2002) και χημικών σκευασμάτων.

Η Κρήτη, και πιο συγκεκριμένα η περιοχή της Ιεράπετρας, ήταν από τις πρώτες περιοχές της Ελλάδας όπου εγκαταστάθηκε η καλλιέργεια θερμοκηπίου (“DEVELOPMENTS IN THE GREEK HORTICULTURAL SECTOR” 2012). Η συγκεκριμένη περιοχή έχει μεγάλη ιστορία καλλιέργειας οπωροκηπευτικών και αντιμετώπισης των εχθρών τους (Ydraiouet al. 2008). Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης έδειξαν ότι στην περιοχή της Ιεράπετρας παρά την συνεχή καλλιέργεια οπωροκηπευτικών υπό κάλυψη παρατηρήθηκε η μικρότερη ποικιλότητα εδαφογενών φυτοπαθογόνων μυκήτων. Αναλυτικότερα δεν ανιχνεύθηκαν καθόλου τα είδη *V. dahliae*, *Fusarium oxysporum* και *Pyrenochaeta lycopersici*. Επιπλέον, η αφθονία των μυκήτων που ανιχνεύτηκαν (*R. solani*, *P. ultimum* και *S. sclerotiorum*) ήταν η χαμηλότερη σε σύγκριση με τα εδάφη από τις υπόλοιπες περιοχές. Επιπλέον, τα εδαφικά δείγματα και από τις υπόλοιπες περιοχές της Κρήτης εμφάνισαν παρόμοια μοτίβα και σε 15 εδάφη δεν ανιχνεύθηκε κανένας μύκητας πάνω από το όριο ανίχνευσης της μεθόδου. Παρόλα αυτά, μερικά εδαφικά δείγματα ήταν επιβαρυσμένα με παθογόνα, και μάλιστα με ποικιλία αυτών. Πιο συγκεκριμένα, στην περιοχή του Τυμπακίου, σε 4 από τα 17 δείγματα εδάφους εντοπίστηκαν 4 διαφορετικοί φυτοπαθογόνοι μύκητες κάτι που υποδηλώνει ότι η τρέχουσες εφαρμογές αντιμετώπισης των φυτοπαθογόνων μυκήτων δεν είναι αποτελεσματικές.

Τέλος, στην παρούσα μεταπτυχιακή εργασία, παρατηρήθηκε πως στις καλλιέργειες τομάτας εντοπίστηκαν, λίγο έως πολύ, όλοι οι φυτοπαθογόνοι μύκητες που μελετήθηκαν. Σε αντίθεση έρχονται οι καλλιέργειες των υπολοίπων οπωροκηπευτικών, όπως για παράδειγμα η καλλιέργεια φράουλας, στην οποία εντοπίστηκαν οι *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani*, *Pythium ultimum* σε χαμηλή αφθονία ενώ οι *Sclerotinia sclerotiorum* δεν εντοπίστηκαν καθόλου (Γραφήματα 29 έως 34). Γενικά, τα φυτά τομάτας μπορούν να επιμολυνθούν από μια πληθώρα ασθενειών γι’ αυτό και χρησιμοποιούνται ως μοντέλα για την μελέτη αλληλεπιδράσεων μεταξύ φυτών και παθογόνων (Piquerez et al. 2014).

4.1 Μελλοντικές μελέτες

Παρόλο που στην Ελλάδα οι θερμοκηπιακές καλλιέργειες αποτελούν σημαντικό τομέα της πρωτογενούς παραγωγής δεν έχει πραγματοποιηθεί ακόμη λεπτομερής καταγραφή και μελέτη των φυτοπαθογόνων μυκήτων που προσβάλλουν τα διάφορα κηπευτικά υπο κάλυψη. Η παρούσα μελέτη στόχευσε στην ανίχνευση σημαντικών φυτοπαθογόνων μυκήτων σε βασικές περιοχές καλλιέργειας κηπευτικών υπο κάλυψη. Μελλοντικές μελέτες θα εστιάσουν στην ανάπτυξη μεθόδων και τεχνικών για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση εδαφογενών μυκήτων που προκαλούν την ασθένεια Φυτόφθορα στα κηπευτικά και αποτελούν σημαντικό πρόβλημα στις θερμοκηπιακές καλλιέργειες στην Ελλάδα. Επιπλέον θα γίνουν προσπάθειες ώστε να διευρυνθεί ο αριθμός των αγρών που θα μελετηθούν για το φορτίο των εδαφών τους σε εδαφογενή φυτοπαθογόνα ώστε να καταστεί δυνατή η συσχέτιση μεταξύ αφθονίας μυκήτων στο έδαφος, όπως αυτή προσδιορίζεται με q-PCR και εμφάνιση προσβολής στα καλλιεργούμενα φυτά. Η ανάπτυξη τέτοιων συσχετίσεων θα καταστήσει δυνατή την πρόβλεψη εμφάνισης προσβολής των καλλιεργούμενων φυτών από φυτοπαθογόνους εδαφογενείς μύκητες με στόχο την στοχευμένη και έγκαιρη καταπολέμηση τους.

5 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Έκθεση Εργασιών Μπενακείου Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου 2015. 2016. Αθήνα: ΜΠΕΝΑΚΙΟ ΦΥΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΚΟ ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ. <http://www.bpi.gr/files/pdf/ektheseis-ergasiwn2015.pdf>.
- “3α. Λαχανικά. Εκτάσεις Και Παραγωγή Κατά Περιφέρεια Και Περιφερειακή Ενότητα, 2014.” 2014. 3. Λαχανικά Και Κηπευτική Γη. ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΡΧΗ.
- Aaij, C., and P. Borst. 1972. “The Gel Electrophoresis of DNA.” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Nucleic Acids and Protein Synthesis* 269 (2): 192–200. doi:10.1016/0005-2787(72)90426-1.
- Agrios, George N. 2005a. “Diseases Caused by Oomycetes.” In *Plant Pathology*, 5th ed. Academic Press.
- . 2005b. *Plant Pathology*. Academic Press.
- . 2005c. “ROOT AND STEM ROT DISEASES CAUSED BY THE ‘STERILE FUNGI’ RHIZOCTONIA AND SCLEROTIUM.” In *PLANT PATHOLOGY*, 5th ed. Academic Press.
- . 2005d. “Vascular Wilts Caused by Ascomycetes and Deuteromycetes (Mitosporic Fungi).” In *Plant Pathology*, 5th ed. Academic Press.
- Antonopoulos, D. F., K. Elena, and E. C. Tjamos. 2003. “First Report of Fusarium Wilt of Alfalfa in Greece.” *Plant Disease* 87 (6): 751–751. doi:10.1094/PDIS.2003.87.6.751B.
- Basu, Srijoni, Chandra Bose, Nupur Ojha, Nabajit Das, Jagaree Das, Mrinmoy Pal, and Sukant Khurana. 2015. “Evolution of Bacterial and Fungal Growth Media.” *Bioinformation* 11 (4): 182–84. doi:10.6026/97320630011182.
- Bateman, D. F. 1970. “Pathogenesis and Disease.” In *Rhizoctonia Solani, Biology and Pathology*, 161–71. University of California Press. https://books.google.gr/books?id=KNktsuZMtboC&pg=PA118&lpg=PA118&dq=colonization+and+growth+of+rhizoctonia+solani+in+soil+papavizas&source=bl&ots=RXN4q2UPSE&sig=SXkNgl7ScJ_Auqxx_v7pRLCi0ec&hl=el&sa=X&ved=0ahUKEwie-v2P2ajUAhXLAMAKHeLvAP0Q6AEILjAB#v=onepage&q&f=false.
- Becker, Sven, Peter Böger, Ralf Oehlmann, and Anneliese Ernst. 2000. “PCR Bias in Ecological Analysis: A Case Study for Quantitative Taq Nuclease Assays in Analyses of Microbial Communities.” *Applied and Environmental Microbiology* 66 (11): 4945–53. doi:10.1128/AEM.66.11.4945-4953.2000.
- Beckerman, Janna. 2011. “Disease Management Strategies for Horticultural Crops: Pythium Root Rot of Herbaceous Plants.” Department of Botany and Plant Pathology, Purdue University. <https://www.extension.purdue.edu/extmedia/bp/bp-181-w.pdf>.
- Berlanger, I., and M. L. Powelson. 2000. “Verticillium Wilt.” *The Plant Health Instructor*. doi:10.1094/PHI-I-2000-0801-01.
- Biris, D., D. J. Vakalounakis, and E. Klironomou. 2004. “Fusarium Wilt of Basil in Greece: Foliar Infection and Cultivar Evaluation for Resistance.” *Phytoparasitica* 32 (2): 160–66. doi:10.1007/BF02979782.
- Bishop, C. D., and R. M. Cooper. 1983. “An Ultrastructural Study of Root Invasion in Three Vascular Wilt Diseases.” *Physiological Plant Pathology* 22 (1): 15–IN13. doi:10.1016/S0048-4059(83)81034-0.
- Brasier, C. M. 1995. “Episodic Selection as a Force in Fungal Microevolution, with Special Reference to Clonal Speciation and Hybrid Introgression.” *Canadian Journal of Botany* 73 (S1): 1213–21. doi:10.1139/b95-381.
- Brody, Jonathan R., and Scott E. Kern. 2004. “History and Principles of Conductive Media for Standard DNA Electrophoresis.” *Analytical Biochemistry* 333 (1): 1–13. doi:10.1016/j.ab.2004.05.054.
- Brunk, Clifford F., and Larry Simpson. 1977. “Comparison of Various Ultraviolet Sources for Fluorescent Detection of Ethidium Bromide–DNA Complexes in Polyacrylamide Gels.” *Analytical Biochemistry* 82 (2): 455–62. doi:10.1016/0003-2697(77)90183-X.

- Cahill, David M. 1999. "Detection, Identification and Disease Diagnosis of Soilborne Pathogens." *Australasian Plant Pathology* 28 (1): 34–44. doi:10.1071/AP99005.
- Capote, Nieves, Ana María Pastrana, Ana Aguado, and Paloma Sánchez-Torres. 2012. "Molecular Tools for Detection of Plant Pathogenic Fungi and Fungicide Resistance." In *Plant Pathology*, 374. <http://www.intechopen.com/books/plant-pathology/molecular-tools-for-detection-of-plant-pathogenic-fungi-and-fungicide-resistance>.
- Carling, D. E., R. E. Baird, R. D. Gitaitis, K. A. Brainard, and S. Kuninaga. 2002. "Characterization of AG-13, a Newly Reported Anastomosis Group of *Rhizoctonia Solani*." *Phytopathology*. 92 (8): 893–99. doi:10.1094/PHYTO.2002.92.8.893.
- Carris, Lori M., Christopher R. Little, and Carol M. Stiles. 2012. "Introduction to Fungi." *The Plant Health Instructor*. doi:DOI:10.1094/PHI-I-2012-0426-01.
- Clergeot, Pierre-Henri, Herwig Schuler, Ejvind Mørtz, Maja Brus, Simina Vintila, and Sophia Ekengren. 2012. "The Corky Root Rot Pathogen *Pyrenochaeta Lycopersici* Secretes a Proteinaceous Inducer of Cell Death Affecting Host Plants Differentially." *Phytopathology* 102 (9): 878–91. doi:10.1094/PHYTO-01-12-0004.
- Collado-Romero, M., J. Mercado-Blanco, C. Olivares-García, and R. M. Jiménez-Díaz. 2008. "Phylogenetic Analysis of *Verticillium Dahliae* Vegetative Compatibility Groups." *Phytopathology* 98 (9): 1019–28. doi:10.1094/PHYTO-98-9-1019.
- Connell, L., R. Redman, S. Craig, and R. Rodriguez. 2006. "Distribution and Abundance of Fungi in the Soils of Taylor Valley, Antarctica." *Soil Biology and Biochemistry, Antarctic Victoria Land Soil Ecology*, 38 (10): 3083–94. doi:10.1016/j.soilbio.2006.02.016.
- "Crop Profile for Greenhouse Tomato in Canada." 2006. Pesticide Risk Reduction Program Pest Management Centre Agriculture and Agri-Food Canada. http://publications.gc.ca/collections/collection_2009/agr/A118-10-24-2006E.pdf.
- Dance, Amber. 2008. "Soil Ecology: What Lies beneath." *Nature News* 455 (7214): 724–25. doi:10.1038/455724a.
- Debode, J., K. Van Poucke, S. C. França, M. Maes, M. Höfte, and K. Heungens. 2011. "Detection of Multiple *Verticillium* Species in Soil Using Density Flotation and Real-Time Polymerase Chain Reaction." *Plant Disease* 95 (12): 1571–80. doi:10.1094/PDIS-04-11-0267.
- "DEVELOPMENTS IN THE GREEK HORTICULTURAL SECTOR." 2012. <http://greece.nlembassy.org/binaries/content/assets/postenweb/g/griekenland/nerderlandse-ambassade-in-athene/ea/report-developments-in-the-greek-horticultural-sector.pdf>.
- Dodman, R. L., and N. T. Flentje. 1970. "The Mechanism and Physiology of Plant Penetration by *Rhizoctonia Solani*." In *Rhizoctonia Solani, Biology and Pathology*, 149–60. University of California Press. https://books.google.gr/books?id=KNktsuZMtboC&pg=PA118&lpg=PA118&dq=colonization+and+growth+of+rhizoctonia+solani+in+soil+papavizas&source=bl&ots=RXN4q2UPSE&sig=SXkNgl7ScJ_Auqxx_v7pRLCi0ec&hl=el&sa=X&ved=0ahUKEwie-v2P2ajUAhXLAMAKHeLvAP0Q6AEILjAB#v=onepage&q&f=false.
- Duniway, J. M. 2002. "Status of Chemical Alternatives to Methyl Bromide for Pre-Plant Fumigation of Soil." *Phytopathology* 92 (12): 1337–43. doi:10.1094/PHYTO.2002.92.12.1337.
- EFSA Panel on Plant Health (PLH). 2014. "Scientific Opinion on the Pest Categorisation of *Verticillium Dahliae* Kleb." *EFSA Journal* 12 (12): n/a-n/a. doi:10.2903/j.efsa.2014.3928.
- Ekengren, S.K. 2008. "Cutting the Gordian Knot: Taking a Stab at Corky Root Rot of Tomato." *Plant Biotechnology* 25 (3): 265–69.

- Elena, K., and A. C. Pappas. 2002. "Pathogenicity and Vegetative Compatibility of *Fusarium Oxysporum* F. Sp. Phaseoli in Greece." *Journal of Phytopathology* 150 (8–9): 495–99. doi:10.1046/j.1439-0434.2002.00786.x.
- Elena, Kalomoira, A.S. Alivizatos, and C. Varveri. 2008. "New Plant Pathogens Reported in Greece, 1990-2007." *Hellenic Plant Protection Journal* 1: 1–25.
- Emmerling, Christoph, Michael Schloter, Anton Hartmann, and Ellen Kandeler. 2002. "Functional Diversity of Soil Organisms — a Review of Recent Research Activities in Germany." *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 165 (4): 408–20. doi:10.1002/1522-2624(200208)165:4<408::AID-JPLN408>3.0.CO;2-3.
- Fakruddin, Md., and Khanjada Shahnewaj Bin Mannan. 2013. "Methods for Analyzing Diversity of Microbial Communities in Natural Environments." *Ceylon Journal of Science* 42 (1): 19–33. doi:http://dx.doi.org/10.4038/cjsbs.v42i1.5896.
- Fradin, Emilie F., and Bart P. H. J. Thomma. 2006. "Physiology and Molecular Aspects of Verticillium Wilt Diseases Caused by *V. Dahliae* and *V. Albo-Atrum*." *Molecular Plant Pathology* 7 (2): 71–86. doi:10.1111/j.1364-3703.2006.00323.x.
- "Gaiapedia - Φυτά Που Ευδοκμούν Στην Περιοχή - Νομός Μεσσηνίας." 2017. Accessed March 14. http://www.gaiapedia.gr/gaiapedia/index.php?title=%CE%95%CE%B9%CE%B4%CE%B9%CE%BA%CF%8C:%CE%95%CF%81%CF%8E%CF%84%CE%B7%CE%BC%CE%B1&offset=0&limit=50&q=%5B%5BCategory%3A%CE%A6%CF%85%CF%84%CF%8C_%CE%9C%5D%5D%5B%5B%CE%B5%CF%85%CE%B4%CE%BF%CE%BA%CE%B9%CE%BC%CE%B5%CE%AF+%CF%83%CF%84%CE%B7%CE%BD+%CF%80%CE%B5%CF%81%CE%B9%CE%BF%CF%87%CE%AE%3A%3A%CE%9D%CE%BF%CE%BC%CF%8C%CF%82+%CE%9C%CE%B5%CF%83%CF%83%CE%B7%CE%BD%CE%AF%CE%B1%CF%82%5D%5D&p=format%3Dul.
- Goodenough, P. W., and G. A. Maw. 1973. "Effects of *Pyrenochaeta Lycopersici* Infection on Nutrient Uptake by Tomato Plants." *Annals of Applied Biology* 73 (3): 339–47. doi:10.1111/j.1744-7348.1973.tb00942.x.
- Goud, J. C., and A. J. Termorshuizen. 2003. "Quality of Methods to Quantify Microsclerotia of *Verticillium Dahliae* in Soil." *European Journal of Plant Pathology* 109 (6): 523–34. doi:10.1023/A:1024745006876.
- Grove, G. G., and R.N. Campbell. 1987. "Host Range and Survival in Soil of *Pyrenochaeta Lycopersici*." *Plant Disease* 71 (9): 806. doi:10.1094/PD-71-0806.
- Holland, P. M., R. D. Abramson, R. Watson, and D. H. Gelfand. 1991. "Detection of Specific Polymerase Chain Reaction Product by Utilizing the 5'----3' Exonuclease Activity of *Thermus Aquaticus* DNA Polymerase." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 88 (16): 7276–80. doi:10.1073/pnas.88.16.7276.
- Hu, Xiaoping, Yinwen Bai, Ting Chen, Dongfang Hu, Jiarong Yang, and Xiangming Xu. 2013. "An Optimized Method for in Vitro Production of *Verticillium Dahliae* Microsclerotia." *European Journal of Plant Pathology* 136 (2): 225–29. doi:10.1007/s10658-013-0170-2.
- Inderbitzin, Patrik, Bart P. H. J. Thomma, Steve J. Klosterman, and Krishna V. Subbarao. 2014. "Verticillium Alfalfae and *V. Dahliae*, Agents of Verticillium Wilt Diseases." In *Genomics of Plant-Associated Fungi and Oomycetes: Dicot Pathogens*, edited by Ralph A. Dean, Ann Lichens-Park, and Chittaranjan Kole, 65–97. Springer Berlin Heidelberg. http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-662-44056-8_4.
- Infantino, A., and N. Pucci. 2005. "A PCR-Based Assay for the Detection and Identification of *Pyrenochaeta Lycopersici*." *European Journal of Plant Pathology* 112 (4): 337–47.
- Infantino, Alessandro, and Nicoletta Pucci. 2005. "A PCR-Based Assay for the Detection and Identification of *Pyrenochaeta Lycopersici*." *European Journal of Plant Pathology* 112 (4): 337–47. doi:10.1007/s10658-005-6605-7.
- Ingold, C. T., and H. J. Hudson. 1993. "Fungi as Plant Pathogens." In *The Biology of Fungi*, 159–82. Springer Netherlands. doi:10.1007/978-94-011-1496-7_10.

- Inoue, Iori, Fumio Namiki, and Takashi Tsuge. 2002. "Plant Colonization by the Vascular Wilt Fungus *Fusarium Oxysporum* Requires *FOW1*, a Gene Encoding a Mitochondrial Protein." *The Plant Cell Online* 14 (8): 1869–83. doi:10.1105/tpc.002576.
- Jendoubi, Warda, Mariem Bouhadida, Amal Boukteb, Mohamed Béji, and Mohamed Kharrat. 2017. "Fusarium Wilt Affecting Chickpea Crop." *Agriculture* 7 (3): 23. doi:10.3390/agriculture7030023.
- Jimenez-Diaz, R.M., M. Cirulli, G. Bubici, Mar Jimenez-Gasco del, P.P. Antoniou, and E.C. Tjamos. 2012. "Verticillium Wilt, a Major Threat to Olive Production: Current Status and Future Prospects for Its Management." *Plant Disease* 96 (3): 304–29. doi:10.1094/PDIS-06-11-0496.
- Johnson, Paul H., and Lawrence I. Grossman. 1977. "Electrophoresis of DNA in Agarose Gels. Optimizing Separations of Conformational Isomers of Double- and Single-Stranded DNAs." *Biochemistry* 16 (19): 4217–25. doi:10.1021/bi00638a014.
- Kalomoira, Elena. 2004. "Fusarium Wilt of Phoenix Canariensis: First Report in Greece." *New Disease Reports* 10 (December): 31–31.
- Kang, Seogchan, Jill Demers, Maria del Mar Jimenez-Gasco, and Martijn Rep. 2014. "Fusarium Oxysporum." In *Genomics of Plant-Associated Fungi and Oomycetes: Dicot Pathogens*, 99–119. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Katan, Jaacov. 2000. "Physical and Cultural Methods for the Management of Soil-Borne Pathogens." *Crop Protection*, XIVth International Plant Protection Congress, 19 (8–10): 725–31. doi:10.1016/S0261-2194(00)00096-X.
- Kim, Jong Tae, In Hee Park, Kyoung Yul Ryu, Jeong Uk Cheon, and Seung Hun Yu. 2003. "Corky Root of Tomato Caused by *Pyrenochaeta Lycopersici* in Korea." *Plant Pathology Journal* 19 (3): 181–83. doi:10.5423/PPJ.2003.19.3.181.
- Kirk, Jennifer L, Lee A Beaudette, Miranda Hart, Peter Moutoglis, John N Klironomos, Hung Lee, and Jack T Trevors. 2004. "Methods of Studying Soil Microbial Diversity." *Journal of Microbiological Methods* 58 (2): 169–88. doi:10.1016/j.mimet.2004.04.006.
- Klappenbach, Joel A., John M. Dunbar, and Thomas M. Schmidt. 2000. "rRNA Operon Copy Number Reflects Ecological Strategies of Bacteria." *Applied and Environmental Microbiology* 66 (4): 1328–33. doi:10.1128/AEM.66.4.1328-1333.2000.
- Klosterman, Steven J., Zahi K. Atallah, Gary E. Vallad, and Krishna V. Subbarao. 2009. "Diversity, Pathogenicity, and Management of Verticillium Species." *Annual Review of Phytopathology* 47 (1): 39–62. doi:10.1146/annurev-phyto-080508-081748.
- Last, F. T., and Marion H. Ebben. 1966. "The Epidemiology of Tomato Brown Root Rot." *Annals of Applied Biology* 57 (1): 95–112. doi:10.1111/j.1744-7348.1966.tb06870.x.
- Lazarovits, George, and Krishnamurthy Subbarao. 2010. "Challenges in Controlling Verticillium Wilt by the Use of Nonchemical Methods." In *Recent Developments in Management of Plant Diseases*, edited by Ulrich Gisi, I. Chet, and Maria Lodovica Gullino, 247–64. Plant Pathology in the 21st Century 1. Springer Netherlands. doi:10.1007/978-1-4020-8804-9_18.
- Lecomte, Charline, Claude Alabouvette, Véronique Edel-Hermann, Fabien Robert, and Christian Steinberg. 2016. "Biological Control of Ornamental Plant Diseases Caused by *Fusarium Oxysporum*: A Review." *Biological Control* 101 (October): 17–30. doi:10.1016/j.biocontrol.2016.06.004.
- Leininger, S., T. Urich, M. Schloter, L. Schwark, J. Qi, G. W. Nicol, J. I. Prosser, S. C. Schuster, and C. Schleper. 2006. "Archaea Predominate among Ammonia-Oxidizing Prokaryotes in Soils." *Nature* 442 (7104): 806–9. doi:10.1038/nature04983.
- Li, Yuan, Liangang Mao, Dongdong Yan, Taotao Ma, Jin Shen, Meixia Guo, Qiuxia Wang, Canbin Ouyang, and Aocheng Cao. 2014a. "Quantification of *Fusarium Oxysporum* in Fumigated Soils by a Newly Developed Real-Time PCR Assay to Assess the Efficacy of Fumigants for Fusarium Wilt Disease in Strawberry Plants." *Pest Management Science* 70 (11): 1669–75. doi:10.1002/ps.3700.

- . 2014b. “Quantification of *Fusarium Oxysporum* in Fumigated Soils by a Newly Developed Real-Time PCR Assay to Assess the Efficacy of Fumigants for *Fusarium* Wilt Disease in Strawberry Plants.” *Pest Management Science* 70 (11): 1669–75. doi:10.1002/ps.3700.
- Lievens, Bart, Margreet Brouwer, Alfons C. R. C. Vanachter, C. André Lévesque, Bruno P. A. Cammue, and Bart P. H. J. Thomma. 2005. “Quantitative Assessment of Phytopathogenic Fungi in Various Substrates Using a DNA Macroarray.” *Environmental Microbiology* 7 (11): 1698–1710. doi:10.1111/j.1462-2920.2005.00816.x.
- Ligoxigakis, E. K. 2000. “Hosts of *Verticillium Dahliae* in Kriti (Greece)*.” *European and Mediterranean Plant Protection Organization Bulletin* 30: 235–38.
- Mahbuba Kaniz, Hasna. 2007. “Corky Root Disease Management in Organic Tomato Production.” PhD Thesis, Uppsala: Faculty of Natural Resources and Agricultural Sciences, Department of Crop Production Ecology. http://www.vaxteko.nu/html/sll/slu/acta_universitatis_agriculturae_sueciae/AUAS07-114/AUAS07-114.PDF.
- Malathrakis, N. E. 1985. “Tomato Crown and Root Rot Caused by *Fusarium Oxysporum* F. Sp. *Radicis-Lycopersici* in Greece.” *Plant Pathology* 34 (3): 438–39. doi:10.1111/j.1365-3059.1985.tb01385.x.
- Martin, Frank N., and Joyce E. Loper. 1999. “Soilborne Plant Diseases Caused by *Pythium* Spp.: Ecology, Epidemiology, and Prospects for Biological Control.” *Critical Reviews in Plant Sciences* 18 (2): 111–81. doi:10.1080/07352689991309216.
- Moore, David, and LilyAnn Novak Frazer. 2002. *Essential Fungal Genetics*. Springer Verlag New York. <http://www.springer.com/in/book/9780387953670>.
- Nelson, Paul E. 1981. “Life Cycle and Epidemiology of *Fusarium Oxysporum*.” In *Fungal Wilt Diseases of Plants*, 655. ACADEMIC PRESS.
- O’Donovan, Anthonia, Vijai Kumar Gupta, and Maria G. Tuohy. 2012. “Fungal Specimen Collection and Processing.” In *Laboratory Protocols in Fungal Biology: Current Methods in Fungal Biology*. Springer Science & Business Media. <https://books.google.gr/books?id=IQOwjVXwEQIC&pg=PA204&lpg=PA204&dq=fungal+media&source=bl&ots=arElmdYMc-&sig=6eWnyYW2nqXUr4Cfkm-C0IbxUxE&hl=el&sa=X&ved=0ahUKewjKwqnJ1cnUAhXJ0xQKHxrwAUUs4ChDoAQhIMAk#v=onepage&q=fungal%20media&f=false>.
- Ogram, Andrew, Gary S. Saylor, and Tamar Barkay. 1987. “The Extraction and Purification of Microbial DNA from Sediments.” *Journal of Microbiological Methods* 7 (2–3): 57–66. doi:10.1016/0167-7012(87)90025-X.
- Okano, Yutaka, Krassimira R. Hristova, Christian M. Leutenegger, Louise E. Jackson, R. Ford Denison, Binyam Gebreyesus, David Lebauer, and Kate M. Scow. 2004. “Application of Real-Time PCR To Study Effects of Ammonium on Population Size of Ammonia-Oxidizing Bacteria in Soil.” *Applied and Environmental Microbiology* 70 (2): 1008–16. doi:10.1128/AEM.70.2.1008-1016.2004.
- Omirou, Michalis, Constantina Rousidou, Fotios Bekris, Kalliope K. Papadopoulou, Urania Menkissoglou-Spirodi, Constantinos Ehaliotis, and Dimitrios G. Karpouzas. 2011. “The Impact of Biofumigation and Chemical Fumigation Methods on the Structure and Function of the Soil Microbial Community.” *Microbial Ecology* 61 (1): 201–13. doi:10.1007/s00248-010-9740-4.
- Oumouloud, A., and J.M. Álvarez. 2016. “Breeding and Genetics of Resistance to *Fusarium* Wilt in Melon.” In *Advances in Plant Breeding Strategies: Agronomic, Abiotic and Biotic Stress Traits*, 2:601–26. doi:10.1007/978-3-319-22518-0_16.
- Ozone Secretariat. 2017. *Handbook for the Montreal Protocol on Substances That Deplete the Ozone Layer*. Eleventh Edition. UNEP - United Nations Environment Programme.

- Pappas, A. C., and K. Elena. 1997. "Occurrence of *Fusarium Oxysporum* F. Sp. Cumini in the Island of Chios, Greece." *Journal of Phytopathology* 145 (5–6): 271–72. doi:10.1111/j.1439-0434.1997.tb00399.x.
- Parveen, Tahira, and Kanika Sharma. 2014. "PYTHIUM DISEASES, CONTROL AND MANAGEMENT STRATEGIES: A REVIEW." *International Journal of Plant, Animal and Environmental Sciences* 5 (1): 244–57.
- Pegg, G.F., and B.L. Brady. 2002. *VERTICILLIUM WILTS*. CABI Publishing.
- Piquerez, Sophie J. M., Sarah E. Harvey, Jim L. Beynon, and Vardis Ntoukakis. 2014. "Improving Crop Disease Resistance: Lessons from Research on Arabidopsis and Tomato." *Frontiers in Plant Science* 5. doi:10.3389/fpls.2014.00671.
- Prosser, James I. 2002. "Molecular and Functional Diversity in Soil Micro-Organisms." *Plant and Soil* 244 (1–2): 9–17. doi:10.1023/A:1020208100281.
- Pucci, N., M. Ferrante, and A. Infantino. 2011. "Study of Genetic Structure of Italian Populations of *Pyrenochaeta Lycopersici* by AFLP Analysis." *Acta Horticulturae* 914: 121–24.
- Qin, Qing-Ming, Gary E. Vallad, Bo Ming Wu, and Krishna V. Subbarao. 2006. "Phylogenetic Analyses of Phytopathogenic Isolates of *Verticillium* Spp." *Phytopathology* 96 (6): 582–92. doi:10.1094/PHYTO-96-0582.
- Raaijmakers, Jos M., Timothy C. Paulitz, Christian Steinberg, Claude Alabouvette, and Yvan Moënne-Loccoz. 2008. "The Rhizosphere: A Playground and Battlefield for Soilborne Pathogens and Beneficial Microorganisms." *Plant and Soil* 321 (1–2): 341–61. doi:10.1007/s11104-008-9568-6.
- Raudales, Rosa E., Jennifer L. Parke, Charles L. Guy, and Paul R. Fisher. 2014. "Control of Waterborne Microbes in Irrigation: A Review." *Agricultural Water Management* 143 (September): 9–28. doi:10.1016/j.agwat.2014.06.007.
- Reeleder, R. D. 2003. "Fungal Plant Pathogens and Soil Biodiversity." *Canadian Journal of Soil Science*. <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201400167936>.
- Riaz, Tariq, Salik Nawaz Khan, and Arshad Javaid. 2009. "Effect of Co-Cultivation and Crop Rotation on Corm Rot Disease of *Gladiolus*." *Scientia Horticulturae* 121 (2): 218–22. doi:10.1016/j.scienta.2009.01.041.
- Rogers, S. L., S. D. Atkins, and J. S. West. 2009. "Detection and Quantification of Airborne Inoculum of *Sclerotinia Sclerotiorum* Using Quantitative PCR." *Plant Pathology* 58 (2): 324–31. doi:10.1111/j.1365-3059.2008.01945.x.
- Rollins, Jeffrey A., Christina A. Cuomo, Martin B. Dickman, and Linda M. Kohn. 2014. "Genomics of *Sclerotinia Sclerotiorum*." In *Genomics of Plant-Associated Fungi and Oomycetes: Dicot Pathogens*, 1–17. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Roose-Amsaleg, C. L, E Garnier-Sillam, and M Harry. 2001. "Extraction and Purification of Microbial DNA from Soil and Sediment Samples." *Applied Soil Ecology* 18 (1): 47–60. doi:10.1016/S0929-1393(01)00149-4.
- Rusagara Nzungize, John, François Lyumugabe, Jean-Pierre Busogoro, and Jean-Pierre Baudoin. 2013. "Pythium root rot of common bean: biology and control methods. A review." *BASE*, September. <http://popups.ulg.ac.be/1780-4507/index.php?id=9019>.
- Saharan, G. S., and Naresh Mehta. 2008. *Sclerotinia Diseases of Crop Plants: Biology, Ecology and Disease Management*. Springer Science & Business Media.
- Schneider, R., and W. Gerlach. 1966. "Pyrenochaeta Lycopersici Nov. Spec., Der Erreger Der Korkwurzelkrankheit Der Tomate." *Journal of Phytopathology* 56 (2): 117–22. doi:10.1111/j.1439-0434.1966.tb02251.x.
- "Scope and Importance of Soil Microbiology." 2017. [Www.agriinfo.in](http://www.agriinfo.in). *My Agriculture Information Bank*. Accessed March 3. <http://www.agriinfo.in/?page=topic&superid=5&topicid=136>.
- Shang, WJ, T Chen, YW Bai, JR Yang, and XP Hu. 2013. "Germination Condition and Lethal Temperature for *Microsclerotia* of *Verticillium Dahliae*." *Mycosystema* 32 (6): 986–95.

- Shetty, K. G., K. V. Subbarao, O. C. Huisman, and J. C. Hubbard. 2000. "Mechanism of Broccoli-Mediated Verticillium Wilt Reduction in Cauliflower." *Phytopathology* 90 (3): 305–10. doi:10.1094/PHYTO.2000.90.3.305.
- Sigrmis, Nick. 2009. "Data-Collection of Existing Data on Protected Crop Systems (Greenhouses and Crops Grown under Cover) in Southern European EU Member States." EFSA-PPR project Contract CFT/EFSA/PPR/2008/06. Technical Reports Submitted to European Food Safety Authority Largo N. Palli 5/A, I - 43100 Parma. Athens, Greece: Agricultural University Of Athens. <http://focalpointbg.com/images/stories/efsa/contents/pdfdocs/031e.pdf>.
- Smith, Cindy J., David B. Nedwell, Liang F. Dong, and A. Mark Osborn. 2007. "Diversity and Abundance of Nitrate Reductase Genes (*narG* and *napA*), Nitrite Reductase Genes (*nirS* and *nrfA*), and Their Transcripts in Estuarine Sediments." *Applied and Environmental Microbiology* 73 (11): 3612–22. doi:10.1128/AEM.02894-06.
- Smith, Duncan R. 1996. "Agarose Gel Electrophoresis." In *Basic DNA and RNA Protocols*, edited by Adrian J. Harwood, 17–21. Methods in Molecular Biology™ 58. Humana Press. <http://link.springer.com/protocol/10.1385/0-89603-402-X%3A17>.
- Sneh, Baruch, Suha Jabaji-Hare, Stephen Neate, and Gerda Dijst. 1996. *Rhizoctonia Species: Taxonomy, Molecular Biology, Ecology, Pathology and Disease Control*. Springer Science & Business Media.
- Spies, Christoffel Frederik Jakobus, Mark Mazzola, and Adèle McLeod. 2011. "Characterisation and Detection of Pythium and Phytophthora Species Associated with Grapevines in South Africa." *ResearchGate* 131 (1): 103–19. doi:10.1007/s10658-011-9791-5.
- Stellwagen, Nancy C. 2009. "Electrophoresis of DNA in Agarose Gels, Polyacrylamide Gels and in Free Solution." *Electrophoresis* 30 (Suppl 1): S188–95. doi:10.1002/elps.200900052.
- "Sustainable Use of Chemical Fumigants for the Control of Soil-Borne Pathogens (SustUse Fumigants) LIFE08 ENV/IT/000432 - DELIVERABLE 3." 2010. Deliverable 3. SOIL-BORNE PATHOGEN CONSTRAINTS AND MANAGEMENT PRACTICES WITHIN SUSTUSE PROJECT AREAS. http://ec.europa.eu/environment/life/project/Projects/index.cfm?fuseaction=home.showFile&rep=file&fil=SustUse_Fumigants_Pest_Constraints.pdf.
- Suzuki, Marcelino T., Lance T. Taylor, and Edward F. DeLong. 2000. "Quantitative Analysis of Small-Subunit rRNA Genes in Mixed Microbial Populations via 5'-Nuclease Assays." *Applied and Environmental Microbiology* 66 (11): 4605–14.
- Tabacchioni, S., L. Chiarini, A. Bevivino, C. Cantale, and C. Dalmastrì. 2000. "Bias Caused by Using Different Isolation Media for Assessing the Genetic Diversity of a Natural Microbial Population." *Microbial Ecology* 40 (3): 169–76.
- Takai, Ken, and Koki Horikoshi. 2000. "Rapid Detection and Quantification of Members of the Archaeal Community by Quantitative PCR Using Fluorogenic Probes." *Applied and Environmental Microbiology* 66 (11): 5066–72. doi:10.1128/AEM.66.11.5066-5072.2000.
- Tjamos, E. C., Polymnia P. Antoniou, and S. E. Tjamos. 2000. "Implementation of Soil Solarization in Greece: Conclusions and Suggestions." *Crop Protection*, XIVth International Plant Protection Congress, 19 (8–10): 843–46. doi:10.1016/S0261-2194(00)00132-0.
- Tjamos, E. C., P.P. Antoniou, S. E. Tjamos, N. P. Fatouros, J. Giannakou, A. Paraskeuopoulos, and K. Papachristos. 2002. "Three Weeks of Soil Solarization with Impermeable Plastics Singly or Together with Soil Fumigants or Nematocides Is Effective against Soilborne Pathogens." In . Preveza, Greece. <file:///C:/Users/%CE%A7%CF%81%CE%B9%CF%83%CF%84%CE%AF%CE%BD%CE%B1/Downloads/1810-1828-1-PB.pdf>.

- Tjamos, E.C., P.P. Antoniou, and S. E. Tjamos. 2008. "Current Applications of Soil Solarization for the Control of Soilborne Pathogens in Plastic Houses or in Open Field Cultivations." In . Dalamanara Argolidas, Greece. http://efe.aua.gr/congress/congress14_english_abstracts_2008.pdf.
- Tjamos, S. E., E. A. Markakis, P. Antoniou, and E. J. Paplomatas. 2006. "First Record of Fusarium Wilt of Tobacco in Greece Imported as Seedborne Inoculum." *Journal of Phytopathology*. <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201301061791>.
- Torsvik, Vigdis Lid. 1980. "Isolation of Bacterial DNA from Soil." *Soil Biology and Biochemistry* 12 (1): 15–21. doi:10.1016/0038-0717(80)90097-8.
- Treusch, Alexander H., Sven Leininger, Arnulf Kletzin, Stephan C. Schuster, Hans-Peter Klenk, and Christa Schleper. 2005. "Novel Genes for Nitrite Reductase and Amo-Related Proteins Indicate a Role of Uncultivated Mesophilic Crenarchaeota in Nitrogen Cycling." *Environmental Microbiology* 7 (12): 1985–95. doi:10.1111/j.1462-2920.2005.00906.x.
- Tziros, G. T., G. A. Bardas, J. T. Tsialtas, and G. S. Karaoglanidis. 2008. "First Report of Oilseed Rape Stem Rot Caused by Sclerotinia Sclerotiorum in Greece." *Plant Disease* 92 (10): 1473–1473. doi:10.1094/PDIS-92-10-1473C.
- UNEP. 1995. "The Montreal Protocol on Substances That Deplete the Ozone Layer - Article 2H: Methyl Bromide." Ozone Secretariat.
- V. Wintzingerode, Friedrich, Ulf B Göbel, and Erko Stackebrandt. 1997. "Determination of Microbial Diversity in Environmental Samples: Pitfalls of PCR-Based rRNA Analysis." *FEMS Microbiology Reviews* 21 (3): 213–29. doi:10.1111/j.1574-6976.1997.tb00351.x.
- Vagelas, Ioannis. 2014. "Diagnosis and Management of Sclerotinia Stem Rot (White Mould) of Lentils in Greece." *Archives of Phytopathology and Plant Protection* 47 (10): 1209–17. doi:10.1080/03235408.2013.835986.
- Vakalounakis, Demetrios J. 1996. "Root and Stem Rot of Cucumber Caused by Fusarium Oxysporum F.sp. Radicis-Cucumerinum F.sp.nov." *Plant Disease* 80 (3): 313–16.
- Vitale, A., I. Castello, G. Cascone, A. D'Emilio, R. Mazzarella, and G. Polizzi. 2010. "Reduction of Corky Root Infections on Greenhouse Tomato Crops by Soil Solarization in South Italy." *Plant Disease* 95 (2): 195–201. doi:10.1094/PDIS-06-10-0418.
- Waring, M. J. 1965. "Complex Formation between Ethidium Bromide and Nucleic Acids." *Journal of Molecular Biology* 13 (1): 269–82. doi:10.1016/S0022-2836(65)80096-1.
- Whelan, Joseph A, Nick B Russell, and Michael A Whelan. 2003. "A Method for the Absolute Quantification of cDNA Using Real-Time PCR." *Journal of Immunological Methods* 278 (1–2): 261–69. doi:10.1016/S0022-1759(03)00223-0.
- White, J. G., and A. C. Scott. 1973. "Formation and Ultrastructure of Microsclerotia of Pyrenochaeta Lycopersici." *Annals of Applied Biology* 73 (2): 163–66. doi:10.1111/j.1744-7348.1973.tb01321.x.
- White, Tj, T Bruns, S Lee, and J Taylor. 1990. "Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics." In *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, edited by Ma Innis, Dh Gelfand, Jj Shinsky, and Tj White, 315–22. Academic Press.
- Wittwer, Carl T., Mark G. Herrmann, Alan A. Moss, and Randy P. Rasmussen. 1997. "Continuous Fluorescence Monitoring of Rapid Cycle DNA Amplification." *BioTechniques* 22 (January): 130–38.
- Yang, Genhua, and Chengyun Li. 2012. "General Description of Rhizoctonia Species Complex." In *Plant Pathology*, edited by Christian Joseph Cumagun. InTech. <http://www.intechopen.com/books/howtoreference/plant-pathology/general-description-of-rhizocotonia-species-complex>.
- YDRAIOU, F., K. VISSARITI, M. ILIOPOULOU, and H. FELBER. 2008. "Safe Use Initiative for the Use of Plant Protection Products: Farmers' Education and Communication." In .

- Dalamanara Argolidas, Greece.
http://efe.aua.gr/congress/congress14_english_abstracts_2008.pdf.
- Zhang, Tong, and Herbert H. P. Fang. 2006. "Applications of Real-Time Polymerase Chain Reaction for Quantification of Microorganisms in Environmental Samples." *Applied Microbiology and Biotechnology* 70 (3): 281–89. doi:10.1007/s00253-006-0333-6.
- Zhang, Wen-Wei, Teng-Fei Jiang, Xiao Cui, Fang-Jun Qi, and Gui-Liang Jian. 2013. "Colonization in Cotton Plants by a Green Fluorescent Protein Labelled Strain of *Verticillium Dahliae*." *European Journal of Plant Pathology* 135 (4): 867–76. doi:10.1007/s10658-012-0131-1.
- "ΑΝΘΡΩΠΙΝΟ ΔΥΝΑΜΙΚΟ ΣΤΟΝ ΠΡΩΤΟΓΕΝΗ ΤΟΜΕΑ, ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ ΚΑΙ ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ ΚΑΤΑΡΤΙΣΗ." 2000. ΓΕΝΙΚΗ ΓΡΑΜΜΑΤΕΙΑ ΠΕΡΙΦΕΡΕΙΑΣ ΗΠΕΙΡΟΥ, ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΕΡΓΑΣΙΑΣ /ΓΣΕΕ ΠΕΡΙΦΕΡΕΙΑΣ ΗΠΕΙΡΟΥ.
- "Ασθένεια Ντομάτας Ριζοκτόνια - ΓΑΙΑpedia." 2017. Accessed March 27.
http://www.gaiapedia.gr/gaiapedia/index.php/%CE%91%CF%83%CE%B8%CE%AD%CE%BD%CE%B5%CE%B9%CE%B1_%CE%BD%CF%84%CE%BF%CE%BC%CE%AC%CF%84%CE%B1%CF%82_%CE%A1%CE%B9%CE%B6%CE%BF%CE%BA%CF%84%CF%8C%CE%BD%CE%B9%CE%B1.
- Γαλαζούλα, Σοφία. 2015. "Κηπευτικά Κρήτης: Από Τον Αγρό Στο Τραπέζι Σας." *ΕΠΙ ΓΗΣ* 5: 40.
- Γκοτσοπούλου, Ελένη. 2014. "ΟΛΟΚΛΗΡΩΜΕΝΗ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΕΧΘΡΩΝ ΚΑΙ ΑΣΘΕΝΕΙΩΝ ΤΗΣ ΠΑΤΑΤΑΣ." Πτυχιακή Μελέτη, ΚΑΛΑΜΑΤΑ: ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΚΑΛΑΜΑΤΑΣ, ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ, ΤΜΗΜΑ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ.
http://nestor.teipel.gr/xmlui/bitstream/handle/123456789/17737/STEG_FP_00815_Medium.pdf?sequence=1.
- "ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΔΗΜΟΥ ΙΕΡΑΠΕΤΡΑΣ 2014-2019 Α' ΣΤΑΔΙΟ: ΣΤΡΑΤΗΓΙΚΟΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ." 2015. ΔΗΜΟΣ ΙΕΡΑΠΕΤΡΑΣ. <http://www.ierapetra.gov.gr/wp-content/uploads/2015/04/epixeirisiako-dimoy-ierapetras-2014-2019.pdf>.
- "ΕΤΗΣΙΑ ΓΕΩΡΓΙΚΗ ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΕΡΕΥΝΑ, ΕΤΟΥΣ 2014." 2014. ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΡΧΗ.
http://www.statistics.gr/el/statistics?p_p_id=documents_WAR_publicationsportlet_INSTANCE_qDQ8fBKKo4IN&p_p_lifecycle=2&p_p_state=normal&p_p_mode=view&p_p_cacheability=cacheLevelPage&p_p_col_id=column-2&p_p_col_count=4&p_p_col_pos=1&_documents_WAR_publicationsportlet_INSTANCE_qDQ8fBKKo4IN_javax.faces.resource=document&_documents_WAR_publicationsportlet_INSTANCE_qDQ8fBKKo4IN_in=downloadResources&_documents_WAR_publicationsportlet_INSTANCE_qDQ8fBKKo4IN_documentID=233344&_documents_WAR_publicationsportlet_INSTANCE_qDQ8fBKKo4IN_locale=el.
- ΖΕΜΠΕΚΗ, ΑΝΑΣΤΑΣΙΑ. 2013. "Μυκητολογικές Ασθένειες Στα Σολανώδη (Τομάτα, Πατάτα, Μελιτζάνα, Πιπεριά)." Πτυχιακή Μελέτη, ΚΑΛΑΜΑΤΑ: ΤΕΙ ΚΑΛΑΜΑΤΑΣ, ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ, ΤΜΗΜΑ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ.
http://nestor.teipel.gr/xmlui/bitstream/handle/123456789/17754/STEG_FP_00832_Medium.pdf?sequence=1.
- "Η Καλλιέργεια Του Καρότου." 2017. *Ecotimes.gr*. Accessed March 27.
<http://www.ecotimes.gr/6362/%ce%b7-%ce%ba%ce%b1%ce%bb%ce%bb%ce%b9%ce%ad%cf%81%ce%b3%ce%b5%ce%b9%ce%b1-%cf%84%ce%bf%cf%85-%ce%ba%ce%b1%cf%81%cf%8c%cf%84%ce%bf%cf%85-2/>.
- Κατσούλα, Α., Χ. Παπαζατάνη, Α. Παπαδημητρίου, Κ. Ρουσίδου, Κ.Κ. Παπαδοπούλου, and Δ. Γ. Καρπούζας. 2015. "Εκτίμηση Του Πληθυσμού Των Κυριότερων Εδαφογενών Φυτοπαθογόνων Μυκήτων Σε Αγροτικά Εδάφη Με Μοριακές Τεχνικές." In , 393. Αθήνα, Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών.
- Λάμπρου, Στέλλα. 2009. *Εχθροί Και Ασθένειες Ψυχανθών*. Vol. 19. Λευκωσία - Κύπρος: Υπουργείο Γεωργίας, Φυσικών Πόρων και Περιβάλλοντος, Τμήμα Γεωργίας.

- [http://www.moa.gov.cy/moa/da/da.nsf/All/3702E04F2D890C3AC2257A22003F29D0/\\$file/PSYXANTHE.pdf?OpenElement](http://www.moa.gov.cy/moa/da/da.nsf/All/3702E04F2D890C3AC2257A22003F29D0/$file/PSYXANTHE.pdf?OpenElement).
- “ΟΔΗΓΙΕΣ ΟΛΟΚΛΗΡΩΜΕΝΗΣ ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΣΙΑΣ ΣΤΗΝ ΠΑΤΑΤΑ.” n.d. ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΑΓΡΟΤΙΚΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΚΑΙ ΤΡΟΦΙΜΩΝ,. <http://www.opengov.gr/yfaat/wp-content/uploads/downloads/2013/05/patata.pdf>.
- “ΟΔΗΓΙΕΣ ΟΛΟΚΛΗΡΩΜΕΝΗΣ ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΣΙΑΣ ΣΤΟ ΑΓΓΟΥΡΙ ΘΕΡΜΟΚΗΠΙΟΥ.” n.d. ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΑΓΡΟΤΙΚΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΚΑΙ ΤΡΟΦΙΜΩΝ,. <http://www.opengov.gr/yfaat/wp-content/uploads/downloads/2013/11/aggouri.pdf>.
- Παντελίδης, Ιάκωβος. 2009. “Φυτοπαθολογική Και Μοριακή Διερεύνηση Των Μηχανισμών Που Εμπλέκονται Στην Άμυνα Των Φυτών Κατά Των Παθογόνων Των Αδρομυκώσεων.” ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ, Αθήνα: Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών. <http://dspace.aua.gr/xmlui/bitstream/handle/10329/29/Pantelides%20Iakovos%20PhD.pdf?sequence=1>.
- Παπαδημητρίου, Αλέξανδρου. 2015. “Εκτίμηση του πληθυσμού εδαφογενών φυτοπαθογόνων μυκήτων σε εδάφη από κηπευτικές καλλιέργειες με τη χρήση PCR πραγματικού χρόνου.” Bachelor Thesis, Λάρισα: Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Φυτών και Περιβάλλοντος.
- “Πύθιο - Ασθένειες Φυτών - Plant Protection.” 2017. Accessed March 26. <https://plantpro.gr/disease/F62>.
- Σάββας, Δ. 2009. “ΠΡΟΣΦΑΤΕΣ ΕΞΕΛΙΞΕΙΣ ΚΑΙ ΔΙΑΦΑΙΝΟΜΕΝΕΣ ΤΑΣΕΙΣ ΣΤΙΣ ΘΕΡΜΟΚΗΠΙΑΚΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΚΗΠΕΥΤΙΚΩΝ.” Πρακτικά 23ου Συνεδρίου της Ελληνικής Εταιρείας της Επιστήμης των Οπωροκηπευτικών. Ιερά Οδός 75, 11855 Αθήνα: Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής, Εργαστήριο Κηπευτικών Καλλιεργειών. <http://web.cut.ac.cy/eeee/wp-content/uploads/sites/14/2013/07/savvas.pdf>.
- “Σκληρωτινίαση Στα Ψυχανθή | Agronews.gr.” 2017. Accessed March 26. <http://www.agronews.gr/tehnikes/arthro/93638/sklirotiniasi-sta-psuhanthi/>.
- Τσιβελίκας, Αθανάσιος Λ. 2010. “ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΟΥ ΠΑΡΑΓΩΓΙΚΟΥ ΔΥΝΑΜΙΚΟΥ ΤΗΣ ΣΥΛΛΟΓΗΣ Cucurbita Species ΤΗΣ ΤΡΑΠΕΖΑΣ ΓΕΝΕΤΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ.” ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ, ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ: ΑΡΙΣΤΟΤΕΛΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ, ΓΕΩΠΟΝΙΚΗ ΣΧΟΛΗ. <http://ikee.lib.auth.gr/record/114880/files/Tsivelikas.pdf>.
- ΦΟΥΣΙΑ, ΣΩΤΗΡΙΑ Σ. 2016. “Μοριακή Διερεύνηση Του Ρόλου Των Αυξινών Στην Βιολογική Αντιμετώπιση Και Ανθεκτικότητα Των Φυτών Arabidopsis Thaliana Εναντίον Του Φυτοπαθογόνου Μύκητα Verticillium Dahliae.” ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ, Αθήνα: ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ, ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1

Τα στοιχεία των παραγωγών, η τοποθεσία, η προηγούμενη και η εγκατεστημένη καλλιέργεια που υπήρχε στο θερμοκήπιο κατά τη διάρκεια της δειγματοληψίας.

Αρίθμηση δειγμάτων	Όνοματεπώνυμο Παραγωγού	Περιοχή	Προηγούμενη Καλλιέργεια	Εγκατεστημένη Καλλιέργεια
1	Βοντίσος Γιάννης	Πρέβεζα		Τομάτα
2	Στύλος Γεώργιος	Πρέβεζα		Τομάτα
3	Κακοσίμος Βασίλειος	Πρέβεζα		Αγγούρι
4	Δευτεραίος Παναγιώτης	Πρέβεζα		Τομάτα
5	Φατούρος Νικόλαος	Πρέβεζα		Αγγούρι
6	Ζαβιτσάνος Γεώργιος	Πρέβεζα		Τομάτα
7	Καββαδίας Χριστόφορος	Πρέβεζα		Τομάτα
8	Βοντίσος Βαγγέλης	Πρέβεζα		Τομάτα
9	Παππάς Νικόλαος	Πρέβεζα		Τομάτα
10	Γκόπης Χρήστος	Πρέβεζα		Τομάτα
11	Κακοσίμου Έλλη	Πρέβεζα		Αγγούρι
12	Σκαμνέλος Απόστολος	Πρέβεζα		Τομάτα
13	Στουρνάρας		Βρώμη	Τομάτα
14	Λαντζανάκης Μιχάλης	Λασιθι	Μελιτζάνα	Μελιτζάνα
15	Τσαμανδούρα Μαρία	Λασιθι	Νέο Θερμοκήπιο	Τομάτα
16	Κουτσελάκης Γιώργος	Λασιθι	Τομάτα	Τομάτα
17	Αντωνάκης Μάνθος	Λασιθι	Τομάτα	Τομάτα
18	Αντωνάκης Μάνθος	Λασιθι	Τομάτα	Τομάτα
19	Γιαννηκάκης Γιώργος	Λασιθι	Πιπεριά	Πιπεριά
20	Προιστάκης Παύλος	Λασιθι	Αγγούρι	Αγγούρι
21	Πιτρολάκης Μιχαήλ	Λασιθι	Τομάτα	Τομάτα
22	Παπαδάκης Στέλιος	Λασιθι	Τομάτα	Αγγούρι
23	Αγγελάκης Γιώργης	Λασιθι	Τομάτα	Τομάτα
24	Ζουράρης Κων/νος	Λασιθι	Τομάτα	Τομάτα
25	Σκαρλαούδη Ευαγγελία	Λασιθι	Πιπεριά	Πιπεριά
26	Σκαρλαούδη Ευαγγελία	Λασιθι	Πιπεριά	Πιπεριά
27	Τσομπανάκης Μιχάλης	Λασιθι	Μελιτζάνα	Μελιτζάνα
28	Μαλιωτάκης Ανδρέας	Λασιθι	Τομάτα	Τομάτα
29	Αγγελακάκης Παναγιώτης	Λασιθι	Αγγούρι	Τομάτα
30	Αχλάτης Γιώργος	Λασιθι	Τομάτα	Αγγούρι
31	Αχλάτης Γιώργος	Λασιθι	Τομάτα	Τομάτα
32	Βιανυτάκης Γιάννης	Λασιθι	Τομάτα	Πιπεριά
33	Flora Terra (Χρήστος)	Λασιθι	Τομάτα	Τομάτα
34	Λιαπάκης Εμμανουήλ	Λασιθι	Αγγούρι	Αγγούρι
35	Λατάνης Κυριάκος	Απρίλης		Αγγούρι
36	Μακρυγιάννης Χαράλαμπος	Αγ. Κυριακή		Μελιτζάνα
37	Πανταζόπουλος	Αγ. Κυριακή		Αγγούρι

	Αναστάσιος			
38	Κωστάκης Σταύρος	Λιμενάρι		Τομάτα
39	Κατσικαρώνης Γεώργιος	Γιαννιτσοχώρι		Τομάτα
40	Γιαννακόπουλος Παναγιώτης	Τερψιθέα		Τομάτα
41	Πολίτης Δημήτρης	Τερψιθέα		Τομάτα
42	Μιχαλακόπουλος Γεώργιος	Λαγκουβάρδος		Αγγούρι
43	Γιαννακόπουλος Γεώργιος	Τερψιθέα		Μελιτζάνα
44	Πλακονούρης Δημήτρης	Φιλιατρά		Τομάτα
45	Ψιλόπουλος Αθανάσιος	Αγ. Κυριακή		Αγγούρι
46	Γριβοκωστόπουλος Ιωάννης	Φιλιατρά		Τομάτα
47	Χρηστάκης Κωστής	Λασίθι, Ιεράπετρα	Τομάτα (BELLADONA)	Τομάτα
48	Χρηστάκης Κωστής	Λασίθι, Ιεράπετρα	Τομάτα (EKSTASI)	Τομάτα
49	Ροβυθάκης Μανώλης	Λασίθι, Ιεράπετρα	Αγγούρι	Αγγούρι
50	Ροβυθάκης Μανώλης	Λασίθι, Ιεράπετρα	Νέο θερμοκήπιο	Τομάτα
51	Γαλανάκης Αντώνης	Λασίθι, Ιεράπετρα	Τομάτα (Βελανίδι)	Τομάτα
52	Κοντογιωργάκης Μιχάλης	Λασίθι, Ιεράπετρα	Πιπεριά	Αγγούρι
53	Κοντογιωργάκης Μιχάλης	Λασίθι, Ιεράπετρα	Τομάτα	Πιπεριά
54	Γαιτανάκης Κων/νος	Λασίθι, Ιεράπετρα	Μελιτζάνα	Μελιτζάνα
55	Σαβροβαλάκης Γιώργος	Λασίθι, Ιεράπετρα, Χωστό	Αγγούρι	Αγγούρι
56	Σαβρολάκης Γιώργος	Λασίθι, Ιεράπετρα, Γαβρίλης	Αγγούρι	Αγγούρι
57	Τζιρβελάκης Γιάννης	Λασίθι, Ιεράπετρα, Γούδουρας	Αγγούρι	Αγγούρι
58	Τζιρβελάκης Γιάννης	Λασίθι, Ιεράπετρα, Γούδουρας	Αγγούρι	Αγγούρι
59	Γερονυμάκης Κώστας	Ηράκλειο, Τυμπάκι	Τομάτα	Πεπόνι
60	Παπαματθαιάκης Λευτέρης	Ηράκλειο, Τυμπάκι	Αγγούρι	Πεπόνι
61	Παπαματθαιάκης Ματθαίος	Ηράκλειο, Τυμπάκι	Τομάτα	Πιπεριά
62	Ανδρουλιδάκης	Ηράκλειο,	Τομάτα	Τομάτα

	Γιάννης	Τυμπάκι		
63	Ανδρουλιδάκης Γιάννης	Ηράκλειο, Τυμπάκι	Μελιτζάνα	Μελιτζάνα
64	Ανδρουλιδάκης Τίτος	Ηράκλειο, Τυμπάκι	Τομάτα	Τομάτα
65	Μαυρογιαννάκης Γεώργιος	Ηράκλειο, Τυμπάκι	Πεπόνι	Αγγούρι
66	Μαυρογιαννάκης Γεώργιος	Ηράκλειο, Τυμπάκι	Πεπόνι	Πεπόνι
67	Κυδωνάκης Φίλιππος	Ηράκλειο, Τυμπάκι	Μελιτζάνα	Μελιτζάνα
68	Ανυφαντάκης Γιάννης	Ηράκλειο, Τυμπάκι	Τομάτα	Τομάτα
69	Καλογεράκης Στέλιος	Ηράκλειο, Τυμπάκι	Τομάτα	Τομάτα
70	Παπαδομανωλάκης	Ηράκλειο, Τυμπάκι	Τομάτα	Τομάτα
71	Σβυρινάκης Γιώργος	Ηράκλειο, Τυμπάκι	Τομάτα	Τομάτα
72	Σβυρινάκης Γιώργος	Ηράκλειο, Τυμπάκι	Τομάτα	Τομάτα
73	Πατεράκης Γιάννης	Ηράκλειο, Τυμπάκι	Τομάτα	Τομάτα
74	Πατεράκης Γιάννης	Ηράκλειο, Τυμπάκι	Τομάτα	Φράουλα
75	Γκελβέρης Γιώργος	Ηράκλειο, Τυμπάκι	Τομάτα	Τομάτα

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 2

Οι συγκεντρώσεις (ng/μl) των εκχυλισμένων DNAs και οι φυσικές υγρασίες των εδαφών. Η συγκέντρωση του εκχυλισμένου DNA κάθε δείγματος χώματος μετρήθηκε με φωτομέτρηση στα 260nm. Με κόκκινο έχουν σημειωθεί τα δείγματα των οποίων οι συγκεντρώσεις είναι μικρότερες ή ίσες των 5ng/μl.

Δείγμα	Συγκέντρωση (ng/μl)	Φυσική Υγρασία (%)	Δείγμα	Συγκέντρωση (ng/μl)	Φυσική Υγρασία (%)
1a	14.6	12.53	39a	4.54	27.47
1b	18.4		39b	2.44	
1c	16.5		39c	3.49	
2a	18.5	22.57	40a	13.6	18.19
2b	26.4		40b	10.4	
2c	22.45		40c	12	
3a	17.8	15.12	41a	10	19.82
3b	18.3		41b	17.3	
3c	18.05		41c	13.65	
4a	24.4	13.72	42a	8.9	10.35
4b	19.8		42b	11.5	
4c	22.1		42c	10.2	
5a	11.1	4.17	43a	10.7	19.13
5b	10.3		43b	13.8	
5c	10.7		43c	12.25	
6a	29.2	7.93	44a	10.5	20.42
6b	22.4		44b	7.52	
6c	25.8		44c	9.01	
7a	25	18.72	45a	14.8	7.01
7b	23		45b	16.9	
7c	24		45c	15.85	
8a	9.88	14.37	46a	16.9	17.68
8b	10.8		46b	11.4	
8c	10.34		46c	14.15	
9a	11.1	7.03	47a	19.9	11.19
9b	12.1		47b	12.8	
9c	11.6		47c	16.35	
10a	15	20.16	48a	26.8	24.07
10b	18.1		48b	29.8	
10c	16.55		48c	28.3	
11a	17.2	12.50	49a	7.7	15.73
11b	18.3		49b	7.62	
11c	17.75		49c	7.66	
12a	10.2	14.06	50a	13.8	15.00
12b	18		50b	10.6	
12c	14.1		50c	12.2	
13a	25.2	9.55	51a	2.77	6.89
13b	15.2		51b	2.99	
13c	20.2		51c	2.88	
14a	7.74	21.22	52a	6.06	13.13
14b	10.1		52b	4.86	
14c	8.92		52c	5.46	

15a	3.9	6.58	53a	4.12	12.13
15b	3.6		53b	5.62	
15c	3.75		53c	4.87	
16a	4.92	10.85	54a	20.4	18.30
16b	7.06		54b	18.4	
16c	5.99		54c	19.4	
17a	5.82	5.11	55a	12.4	16.38
17b	7.18		55b	9.12	
17c	6.5		55c	10.76	
18a	3.02	4.64	56a	3.18	17.36
18b	2.9		56b	5.72	
18c	2.96		56c	4.45	
19a	6.48	8.48	57a	8.4	13.42
19b	7.58		57b	5.9	
19c	7.03		57c	7.15	
20a	4.44	6.07	58a	4.1	14.33
20b	6.16		58b	5.04	
20c	5.3		58c	4.57	
21a	6.54	13.87	59a	5.14	14.96
21b	6.26		59b	4.44	
21c	6.4		59c	4.79	
22a	1.68	15.64	60a	2.65	21.14
22b	4.2		60b	2.33	
22c	2.94		60c		
23a	7.44	9.62	61a	13	22.34
23b	6.8		61b	14.2	
23c	7.12		61c	13.6	
24a	3.54	12.41	62a	6.7	10.40
24b	5.06		62b	5.66	
24c	4.3		62c	6.18	
25a	13.8	11.33	63a	2.1	13.95
25b	13.5		63b	2.64	
25c	13.65		63c	2.37	
26a	17.6	12.35	64a	10.1	10.03
26b	21.2		64b	14.7	
26c	19.4		64c	12.4	
27a	11.2	17.19	65a	21.6	13.38
27b	9.02		65b	17.2	
27c	10.11		65c	19.4	
28a	3.48	16.77	66a	15.8	11.62
28b	6.12		66b	20.2	
28c	4.8		66c	18	
29a	7.94	10.12	67a	8.08	8.38
29b	4.86		67b	6.86	
29c	6.4		67c	7.47	
30a	4.02	13.74	68a	31.2	16.09
30b	4.26		68b	27.4	
30c	4.14		68c	29.3	
31a	6.7	8.61	69a	23	22.65
31b	7.3		69b	26.4	
31c	7		69c	24.7	

32a	7.84	7.81	70a	2.77	13.76
32b	7.76		70b	7.92	
32c	7.8		70c	5.345	
33a	6.64	12.59	71a	8.78	6.89
33b	7.88		71b	7.92	
33c	7.26		71c	8.35	
34a	10.8	14.08	72a	4.3	8.11
34b	5.62		72b	3.84	
34c	8.21		72c	4.07	
35a	16.5	20.52	73a	26.8	14.85
35b	19.8		73b	34.6	
35c	18.15		73c	30.7	
36a	11.7	17.68	74a	13.1	17.04
36b	10.4		74b	13.8	
36c	11.05		74c	13.45	
37a	9.64	15.65	75a	20.6	9.10
37b	6.66		75b	24.2	
37c	8.15		75c	22.4	
38a	11.1	18.52			
38b	13				
38c	12.05				