

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ:

**Εκτίμηση του πληθυσμού επιλεγμένων εδαφογενών
φυτοπαθογόνων μυκήτων σε γεωργικά εδάφη
Estimation of the population of selected soilborne plant
pathogenic fungi in agricultural soils.**

ΓΡΗΓΟΡΟΠΟΥΛΟΥ ΙΩΑΝΝΑ

ΛΑΡΙΣΑ 2013

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

1.Καρπούζας Δημήτριος, Επίκουρος Καθηγητής Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας, του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

2.Παπαδοπούλου Καλλιόπη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Φυτών, του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

3.Κωνσταντίνος Οιχαλιώτης, Επίκουρος Καθηγητής Γονιμότητας και Βιολογίας Εδάφους, του Τμήματος Αξιοποίησης Φυσικών Πόρων και Γεωργικής Μηχανικής, Εργαστήριο Γεωργικής Χημείας και Εδαφολογίας.

Ευχαριστίες

Πρώτα από όλα θέλω να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στον καθηγητή μου κ. Δημήτριο Καρπούζα, Επίκουρο Καθηγητή Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας υπό την επίβλεψη του οποίου πραγματοποιήθηκε η παρούσα εργασία, για τη συνεχή καθοδήγηση, την αμέριστη υποστήριξη, τις ουσιώδεις συμβουλές, καθώς και την αδιάκοπη συμπαράσταση και ενθάρρυνση που μου παρείχε σε όλο αυτό το διάστημα της πειραματικής διαδικασίας καθώς και της συγγραφής της. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα άλλα δύο μέλη της τριμελούς επιτροπής την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας κ. Καλλιόπη Παπαδοπούλου και τον κ. Κωνσταντίνο Οιχαλιώτη, Επίκουρο Καθηγητή του τμήματος Αξιοποίησης Φυσικών Πόρων και Γεωργικής Μηχανικής του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών ,για την βοήθεια τους και για την πολύτιμη παροχή επιστημονικής γνώσης που μου παρείχαν στην εκπόνηση της παρούσας εργασίας. Ακόμα ευχαριστώ τον υποψήφιο διδάκτορα Καραά Παναγιώτη για την αμέριστη βοήθεια του καθώς και όλα τα μέλη του εργαστηρίου για την πολύ καλή συνεργασία που είχαμε, την βοήθεια που μου προσέφεραν καθώς και για το ευχάριστο κλίμα που επικρατούσε στο εργαστήριο.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

- ΠΕΡΙΛΗΨΗσελ.5
- 1.ΕΙΣΑΓΩΓΗσελ.7
- ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....σελ.23
- 2.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....σελ.24
- 3.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....σελ. 31
- 4.ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....σελ.48
- ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....σελ.53

Περίληψη

Οι εδαφογενείς φυτοπαθογόνοι μύκητες που ανήκουν στα γένη *Fusarium*, *Verticillium*, *Rhizoctonia*, και *Sclerotinia* αποτελούν ιδιαίτερα σημαντικό πρόβλημα για τις κηπευτικές καλλιέργειες και οδηγούν σε σημαντικές απώλειες τις φυτικής παραγωγής. Εκτίμηση του πληθυσμού των συγκεκριμένων μυκήτων στο έδαφος θα μπορούσε να βοηθήσει σημαντικά στον σχεδιασμό φυτοπροστατευτικών προγραμμάτων για την πρόληψη εμφάνισης των ασθενειών στον αγρό. Έτσι στην παρούσα εργασία έγινε εκτίμηση του πληθυσμού μυκήτων που ανήκουν στα παραπάνω γένη μυκήτων σε δείγματα εδάφους που συλλέχθηκαν από επιλεγμένους αγρούς που καλλιεργούνταν με κηπευτικά. Η εκτίμηση του πληθυσμού των μυκήτων στο έδαφος πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων σε μερικώς εκλεκτικά θρεπτικά μέσα για τα συγκεκριμένα γένη μυκήτων. Για την αποφυγή υπερεκτίμησης του μολυσματικού δυναμικού των εδαφών, καθώς τα θρεπτικά μέσα που χρησιμοποιήθηκαν για την καταμέτρηση ήταν μερικώς εκλεκτικά, πραγματοποιήθηκε προκαταρκτική ανάλυση σε σημαντικό αριθμό δειγμάτων ώστε να ταυτοποιηθούν με μοριακές τεχνικές (αλληλούχιση της ITS περιοχής) οι μύκητες που αναπτύσσονται στα θρεπτικά μέσα που επιλέχθηκαν. Από την ταυτοποίηση των μυκήτων επιβεβαιώθηκε ότι τα θρεπτικά μέσα ήταν μερικώς εκλεκτικά και επέτρεπαν και την ανάπτυξη άλλων μυκήτων που ανήκαν στα γένη *Fusarium*, *Aspergillus*, *Scedosporium*. Με βάση την προκαταρκτική αυτή εξέταση πραγματοποιήθηκε ανάλυση των 256 εδαφικών δειγμάτων που έδειξε ότι τα εδάφη και των τεσσάρων καλλιεργειών (τομάτα, πιπεριά, αγγούρι και φράουλα) εμφάνιζαν υψηλούς πληθυσμούς μυκήτων του γένους *Fusarium* (10^3 - 10^5 cfu/g εδάφους) μεταξύ αυτών και στελέχη που ανήκουν σε είδη που έχουν χαρακτηριστεί ως φυτοπαθογόνα (*F. oxysporum*, *F. solani*). Εκτός του *Fusarium* υψηλούς πληθυσμούς μυκήτων του γένους *Aspergillus* καταγράφηκαν στα περισσότερα εδάφη. Τα παραπάνω αποτελέσματα αποτελούν μια απλή προσέγγιση για την εκτίμηση του δυναμικού ενός εδάφους στους κύριους φυτοπαθογόνους μύκητες και επιβεβαιώνουν ότι το κύριο μυκητολογικό πρόβλημα στις κηπευτικές καλλιέργειες αποτελούν οι μύκητες του γένους *Fusarium*. Περαιτέρω μελέτες θα εστιάσουν στην ανάπτυξη περισσότερων αξιόπιστων και ακριβέστερων μεθόδων (πχ. PCR πραγματικού χρόνου) για την καταμέτρηση του μυκητιακού φορτίου των εδαφών.

Abstract

The soilborne phytopathogenic fungi belonging to the genera *Fusarium*, *Verticillium*, *Rhizoctonia* and *Sclerotinia* are a major problem for crops, leading to significant losses in crop production. The estimation of the fungal population in the soil could significantly help in the design of plant protection programs to prevent the occurrence of diseases in the field. In this study we estimated the fungal population, belonging to the above genera, in soil samples which were collected from selected fields cultivated with vegetables. Thus, we used the method of successive dilutions in partially selective culture media. To prevent overestimation of the infective soil potential, due to the partially selective culture media, we performed a preliminary analysis in a significant number of samples aimed to identify the fungi with molecular methods (sequencing of the ITS region). The identification of fungi confirmed that the culture media was partially selective and permitted the development of other fungi, belonging to the genera *Fusarium*, *Aspergillus*, *Scedosporium*. For this reason, we conducted analysis of 256 soil samples which revealed that all of the four soil crops (tomato, pepper, cucumber and strawberry) contained large populations from the *Fusarium* genus (10^3 - 10^5 cfu/g soil), including phytopathogen strains (*F. oxysporum*, *F. solani*). Apart from *Fusarium*, most soils were recorded with large populations of the *Aspergillus* genus. This is a simple approach to estimate the soil potential to the main plant pathogenic fungi and confirm that the major mycological problem in horticultural crops are *Fusarium* fungi. Further studies will focus on the development of more reliable and accurate methods (eg real time PCR) for the measurement of fungal soil burden.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Βασίλειο των Μυκήτων

Οι μύκητες αποτελούν πολυπληθή ομάδα μικροοργανισμών. Παλαιότερα αποτελούσαν φύλο του φυτικού βασιλείου, αλλά σήμερα εξετάζονται ως ξεχωριστό βασίλειο. Έχουν περιγραφεί 100.000 περίπου είδη, που κατατάσσονται σε 2.500 περίπου γένη (Ηλιόπουλος, 2004). Πρόκειται για τις πλέον παράξενες μορφές ζωής στον πλανήτη (Εικόνα 1), με τα εξής γενικά χαρακτηριστικά:

- Είναι ετερότροφοι μικροοργανισμοί με εξωκυτταρική πέψη.
- Τα σώματά τους ονομάζονται μυκήλια και αποτελούνται από μια μάζα διακλαδισμένων νηματίων.
- Τα κυτταρικά τους τοιχώματα αποτελούνται από χιτίνη.
- Η μίτωση, σε αντίθεση με όλους τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, συμβαίνει μέσα στον πυρήνα, ο πυρηνικός φάκελος δεν καταστρέφεται κατά τη μιτωτική διαίρεση και η άτρακτος σχηματίζεται μέσα στον πυρήνα.



Οι μύκητες δεν έχουν χλωροφύλλη και συνεπώς δεν μπορούν να φωτοσυνθέσουν. Έτσι προσλαμβάνουν θρεπτικά είτε από νεκρή οργανική ουσία (σαπροφυτικοί μύκητες) είτε από ζωντανούς οργανισμούς (παρασιτικοί μύκητες), εκκρίνοντας πεπτικά ένζυμα στο περιβάλλον τους και απορροφώντας τα προϊόντα της εξωκυτταρικής αυτής πέψης (Ζίφα Α., Μαμούρης Ζ., Μούτου Κ., Βιολογία). Οι περισσότεροι ζουν σαπροφυτικά στο έδαφος, στις λίμνες και αλλού, ενώ άλλοι είναι παράσιτα κυρίως των φυτών και μερικά των ανθρώπων και των ζώων. Μερικά είδη μυκήτων δημιουργούν συμβιωτικές σχέσεις με ανώτερα φυτά, σχηματίζοντας ειδικές κατασκευές στο ριζικό τους σύστημα, τις

μυκόρριζες, μέσω των οποίων επωφελούνται και οι δύο οργανισμοί (Ηλιόπουλος, 2004).

Εικόνα 1: Η μορφολογία των μυκήτων και η ποικιλομορφία της (Olsen *et al.*, 2011).

1.2. Φυτοπαθογόνοι Μύκητες

Από φυτοπαθολογικής απόψεως οι μύκητες αποτελούν το σημαντικότερο άθροισμα φυτοπαθογόνων οργανισμών και είναι υπεύθυνοι για πολλές σοβαρές ασθένειες των φυτών. Περίπου 10.000 είδη μυκήτων έχουν προσδιοριστεί ως φυτοπαθογόνα. Όλα σχεδόν τα φυτά προσβάλλονται από μερικά είδη μυκήτων. Άλλοι φυτοπαθογόνοι μύκητες μπορούν να προσβάλλουν πολλά είδη φυτών, ενώ άλλοι μόνο λίγα είδη. Μερικοί προσβάλλουν μόνο ένα είδος φυτού (Ηλιόπουλος, 2004).

Το κριτήριο ταξινόμησης των φυτοπαθογόνων μυκήτων είναι ο τρόπος πρόσληψης θρεπτικών από το φυτό-ξενιστή. Οι βιοτροφικοί μύκητες εκμεταλλεύονται τα ζωντανά φυτά, προσβάλλοντάς τα και προκαλώντας ελάχιστη φυσική καταστροφή, καθώς διαχέονται αργά μέσα στους φυτικούς ιστούς. Απορροφούν τα θρεπτικά από το φυτό-ξενιστή, αλλά οι κυτταρικές μεμβράνες δεν καταστρέφονται και τα φυτικά κύτταρα δεν πεθαίνουν. Οι νεκροτροφικοί μύκητες από την άλλη είναι πολύ καταστροφικοί για το φυτό και τα φυτικά κύτταρα συνήθως πεθαίνουν αμέσως μετά την εισβολή του μύκητα στους ιστούς. Η διάχυση του νεκροτροφικού μύκητα είναι συχνά ταχύτατη. Σε αυτές τις περιπτώσεις, η επαφή με τους ζωντανούς φυτικούς ιστούς είναι ελάχιστη, αφού τα φυτικά κύτταρα σκοτώνονται στην αρχή της εισβολής του μύκητα, από ένζυμα που αποικοδομούν το κυτταρικό τοίχωμα και διαταράσσουν την ακεραιότητα των ιστών. Οι νεκροτροφικοί μύκητες αναπαράγονται μόνο όταν τα φυτικά κύτταρα-ξενιστές πεθαίνουν (Isaak, 1998). Ωστόσο, υπάρχει και συνδυασμός αυτών των τρόπων ζωής και στρατηγικών θρέψης. Σε αυτήν την περίπτωση, οι μύκητες ονομάζονται ημιβιοτροφικοί καθώς παρουσιάζουν αρχικά μια φάση ως βιοτροφικοί και στη συνέχεια ακολουθούν τον νεκροτροφικό τρόπο ζωής (Horbach *et al.*, 2011).

Μερικά φυτοπαθογόνα είδη μυκήτων ζουν και αναπαράγονται εντός του εδάφους, προσβάλλοντας κυρίως υπόγεια τμήματα των φυτών. Οι μύκητες αυτοί ονομάζονται γενικά *μύκητες εδάφους* και επιβιώνουν υπό μορφή ανθεκτικών σπορίων, μυκηλίου ή μυκηλιακών κατασκευών στο έδαφος ή σε υπολείμματα φυτών (Ηλιόπουλος, 2004).

1.3. Μόλυνση του φυτού από φυτοπαθογόνο μύκητα

Οι φυτοπαθογόνοι μύκητες έχουν αναπτύξει μια τεράστια ποικιλία στρατηγικών για να προσβάλουν τα φυτά-ξενιστές. Ανάλογα με το αν ο μύκητας είναι βιοτροφικός ή νεκροτροφικός, διαφορετικές δομές προσβολής σχηματίζονται στο μύκητα και χρησιμοποιούνται διαφορετικοί τρόποι θανάτου του φυτού-ξενιστή (Horbach *et al.*, 2011). Για να εισέλθουν στο φυτό-ξενιστή και να ξεκινήσει η προσβολή, οι μύκητες αρχικά πρέπει να ξεπεράσουν το φραγμό της επιδερμίδας των φυτών. Ενώ μερικοί μύκητες αναζητούν διάφορα ανοίγματα,

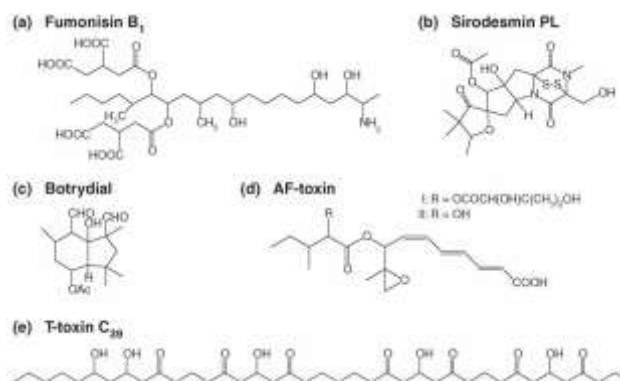
όπως τα στομάτια, πολλές από τις πιο σοβαρές καταστροφές αγροτικής παραγωγής παγκοσμίως έχουν προκληθεί από μύκητες οι οποίοι προσβάλουν με μηχανικό τρόπο το κυτταρικό περίβλημα χρησιμοποιώντας εξειδικευμένα οργάνια προσβολής που ονομάζονται απρεσόρια.

Για να αποικίσουν επιτυχώς το φυτικό ιστό, αφού έχουν εισέλθει σε αυτόν, οι φυτοπαθογόνοι μύκητες πρέπει να ξεπεράσουν τους μηχανισμούς άμυνας του φυτού, καθώς αποτελούν εμπόδιο για την εδραίωση της εισβολής τους (Egan, Talbot, 2008). Οι φυτικοί μηχανισμοί άμυνας περιλαμβάνουν την αντίδραση υπερευαισθησίας (HR, hypersensitive response), κατά την οποία μια οξειδωτική ενεργοποίηση στο φυτό οδηγεί στην παραγωγή ενεργών ριζών οξυγόνου (ROS, reactive oxygen species), που συνδέονται με τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο των φυτών-ξενιστών (Howlett, 2006). Η παραγωγή εξωκυττάρων ROS γύρω από τις θέσεις προσβολής, αποτελεί μια πρόωμη απόκριση στην επίθεση που δέχεται το φυτό και σηματοδοτεί την αναγνώριση του παθογόνου από το φυτό-ξενιστή. Οι ROS είναι τοξικά μόρια και ως αποτέλεσμα, οι φυτοπαθογόνοι μύκητες έχουν αναπτύξει αποτελεσματικούς τρόπους για τη γρήγορη αποτοξίνωσή τους (Egan, Talbot, 2008). Ωστόσο, αυτοί οι μηχανισμοί άμυνας του φυτού εμποδίζουν την ανάπτυξη των μυκήτων, κυρίως των βιοτροφικών. Αντίθετα, οι νεκροτροφικοί μύκητες μπορούν να ανατρέψουν τη φυτική άμυνα για να προσλάβουν θρεπτικά από το νεκρό φυτικό ιστό του ξενιστή (Howlett, 2006).

1.4. Μυκοτοξίνες

Οι φυτοπαθογόνοι μύκητες παράγουν μια μεγάλη ποικιλία τοξικών προϊόντων, τις φυτοτοξίνες ή μυκοτοξίνες, που επηρεάζουν τις φυσιολογικές λειτουργίες των ανώτερων φυτών. Οι μυκοτοξίνες συνήθως προκαλούν μαρασμό, χλώρωση και νέκρωση στα φυτά-ξενιστές (Isaak, 1998). Σε αντίθεση με τους νεκροτροφικούς, οι οποίοι παράγουν μυκοτοξίνες, οι βιοτροφικοί μύκητες δεν αναφέρεται να παράγουν. Το γεγονός αυτό δεν προκαλεί έκπληξη αφού αυτή η κατηγορία φυτοπαθογόνων μυκήτων έχει ανάγκη να κρατήσει τους ξενιστές της ζωντανούς (Howlett, 2006).

Γενικά, οι τοξίνες είναι ουσίες χαμηλού μοριακού βάρους και είναι ενεργές σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις (Isaak, 1998). Οι μυκοτοξίνες θεωρούνται δευτερογενείς μεταβολίτες επειδή δεν είναι απαραίτητες για την ανάπτυξη των μυκήτων και αποτελούν προϊόντα του πρωτογενούς μεταβολισμού (Brase *et al.*, 2009). Είναι περιττοί για τους μύκητες αλλά συνήθως τους προσδίδουν κάποιο επιλεκτικό πλεονέκτημα, όπως η επαγωγή προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου στους ξενιστές τους (Howlett, 2006) ή γενικά τους βοηθούν να προσβάλλουν τα ανώτερα φυτά (Brase *et al.*, 2009).



Εικόνα 2: Δομές τοξινών από φυτοπαθογόνους μύκητες (Howlett, 2006).

Οι μυκοτοξίνες αποτελούν ομάδα διαφόρων μορίων συμπεριλαμβανομένου πολυπεπτιδίων, γλυκοπρωτεϊνών, φαινολών, τερπενοειδών, στερολών και κινονών (Isaak, 1998) με διαφορετικές δομές (Εικόνα 2, Howlett, 2006). Ταξινομούνται σε δύο ομάδες: τις ειδικές για κάποιον ξενιστή και τις μη-ειδικές. Οι πρώτες ενεργούν συνήθως πολύ γρήγορα, προκαλώντας τα συμπτώματα της ασθένειας στα προσβεβλημένα φυτά. Αποτελούν συνήθως την απαραίτητη προϋπόθεση για την πρόκληση της ασθένειας στον ξενιστή. Αντίθετα, η τοξικότητα των μη-ειδικών τοξινών δε σχετίζεται με τον ξενιστή του μύκητα. Συνεπώς, οι τοξίνες αυτές μπορεί να είναι τοξικές με διαφορετικό τρόπο στα ανώτερα φυτά (Isaak, 1998).

1.5. Ασθένειες φυτών από φυτοπαθογόνους μύκητες

Όπως έχει αναφερθεί, πολλές καταστροφικές ασθένειες μπορούν να προκληθούν στα φυτά από τους φυτοπαθογόνους μύκητες (Medina *et al.*, 2011). Οι μυκητολογικές ασθένειες των φυτών έχουν μεταβάλλει σημαντικά την ποικιλότητα του φυτικού πληθυσμού, τη δυναμική του δασικού οικοσυστήματος και έχουν οδηγήσει σε εκτεταμένες καταστροφές στην αγροτική παραγωγή με τεράστιες οικονομικές επιπτώσεις (Olsen *et al.*, 2011, Εικόνα 3).



Εικόνα 3: Τυπικά συμπτώματα ασθένειας αγλαδιάς μετά από προσβολή από τον μύκητα *Phytophthora alni* σε σύγκριση με υγιή δέντρα (Desprez-Loustau M.L. *et al.*, 2007).

Παράλληλα, τα φρούτα είναι ευάλωτα σε προσβολές παθογόνων μυκήτων (Εικόνα 4) εξαιτίας της υψηλής περιεκτικότητάς τους σε θρεπτικά, νερό και του χαμηλού pH τους. Επιπλέον, μετά τη συγκομιδή τους, χάνουν την περισσότερη από την ανθεκτικότητα που έχουν στους παθογόνους μύκητες. Για το λόγο αυτό, οι μυκητολογικές ασθένειες των φρούτων μπορούν να προκαλέσουν τρομερές απώλειες και



Εικόνα 4: Προσβολή του φυτού του βατόμουρου από το μύκητα *Phragmidium violaceum* (Desprez-Loustau M.L. *et al.*, 2007).

στη βιομηχανία των τροφίμων (Pan *et al.*, 2012).

Τα συμπτώματα με τα οποία εκδηλώνονται οι μυκητολογικές ασθένειες είναι ποικίλα τόσο ως προς τη μορφή όσο και ως προς την ένταση και έκταση τους. Τα πιο συχνά παρατηρούμενα συμπτώματα φυτικών ασθενειών από μύκητες είναι:

- Κηλιδώσεις: τοπικές χλωρώσεις ή νεκρώσεις κυρίως στα φύλλα, λόγω καταστροφής των χλωροπλαστών ή των κυττάρων από τους παρασιτικούς μύκητες.
- Εσχαρώσεις: επιφανειακές τοπικές αλλοιώσεις στους υδαρείς κυρίως φυτικούς ιστούς.
- Σήψεις: βαθύτερες υγρής ή ξηρής μορφής αλλοιώσεις των υδαρών συνήθως φυτικών ιστών.
- Μαρασμός: διαταραχή του ισοζυγίου της απορρόφησης νερού και της διαπνοής με αποτέλεσμα την απώλεια σπαργής των φυτικών κυττάρων.
- Έλκη: ανοιχτές πληγές σε βραχίονες και κορμούς δένδρων.
- Καρκινώματα: τυπικά παραδείγματα μυκητολογικών ασθενειών που προκαλούν καρκινώματα είναι η καρκίνωση της πατάτας και του λαχάνου.
- Νεκρώσεις βλαστών και κλάδων: προκαλούνται από ασθένειες που προσβάλλουν το ξύλο πολυετών φυτών.

Αντιπροσωπευτικά είδη φυτικών ασθενειών που προκαλούνται από μύκητες εδάφους είναι:

- ❖ Τήξεις φυταρίων: είναι ασθένειες ευρύτατα διαδεδομένες τόσο σε υπαίθριες όσο και σε θερμοκηπιακές καλλιέργειες, κατά τις οποίες προκαλείται σήψη των σπόρων (προφυτρωτική τήξη) ή των ριζών (μεταφυτρωτική τήξη).
- ❖ Σηπιριζίες και σήψεις λαιμού: αποτελούν καστανές σήψεις φλοιώδους ιστού όσον αφορά το λαιμό των αναπτυγμένων φυτών και κατά θέσεις στην αρχή αλλά γενικευμένες αργότερα καστανές σήψεις όσον αφορά τη ρίζα των φυτών.
- ❖ Αδρομυκώσεις: πρόκειται για ασθένειες καταστροφικές για τα φυτά, που εμφανίζουν πολύ μεγάλη εξάπλωση. Τα συμπτώματα αφορούν χλωρώσεις, νεκρώσεις, μαράνσεις των φύλλων, και συνήθως καταλήγουν στο θάνατο του φυτού-ξενιστή. Ο θάνατος μπορεί να επέλθει μέσα σε λίγες εβδομάδες, μπορεί να συμβεί κα μετά από χρόνια, σε δενδρώδεις ξενιστές. Τα παθογόνα των αδρομυκώσεων, όπως οι μύκητες του γένους *Fusarium* και *Verticillium*, αναπτύσσονται και αναπαράγονται μέσα στα αγγεία του ξύλου και ίσως σε κάποια γειτονικά κύτταρα. Στην επιφάνεια των φυτών εμφανίζονται και αρχίζουν να πολλαπλασιάζονται μόνο όταν νεκρωθεί το φυτό (Agrios, 2005). Χαρακτηριστικό σύμπτωμά τους είναι ο εσωτερικός καστανός μεταχρωματισμός των ξυλωδών αγγείων του φυτού (Ηλιόπουλος, 2004).

1.6. Το γένος *Fusarium*

Το γένος *Fusarium* είναι ένα από τα πιο σημαντικά από οικονομικής άποψης γένη μυκήτων, εξαιτίας της ικανότητάς του να προκαλεί ασθένειες στα φυτά, αλλά και της πιθανής παραγωγής τοξινών, που επηρεάζουν τα ζώα και τον άνθρωπο και θεωρούνται καρκινογόνες. Επιπλέον, ορισμένα είδη είναι ικανά μα

προσβάλλουν απευθείας και τον άνθρωπο, ιδιαίτερα ασθενείς που είναι σε ανοσοκαταστολή. Είδη του γένους συναντώνται σε όλο τον κόσμο, αφού ορισμένα κυριαρχούν σε ψυχρότερες περιοχές και άλλα σε τροπικές και υποτροπικές.

Στα φυτά, τα είδη του γένους *Fusarium* μπορούν να προκαλέσουν μεγάλο εύρος ασθενειών. Θεωρείται πως όλα σχεδόν τα καλλιεργούμενα φυτά προσβάλλονται από ένα τουλάχιστον είδος του γένους. Μάλιστα είναι πολλές οι περιπτώσεις που οι επιδημίες που έχουν προκαλέσει αυτοί οι μύκητες αποδείχθηκαν καταστροφικές για συγκεκριμένες καλλιέργειες ολόκληρων περιοχών (Wollenweber and Reinking, 1935). Συγκεκριμένα, μπορεί να προκαλέσουν σήψεις φλοιού, ριζών, καρπών, ακραίο μαρασμό, κηλίδωση φύλλων, καθοδική νέκρωση, έλκος και αδρομύκωση. Η τελευταία ασθένεια είναι από τις πιο σημαντικές και προκαλείται από διαφορετικές φυλές του μύκητα *Fusarium oxysporum*. Οι αδρομυκώσεις που προκαλούνται από μύκητες του γένους *Fusarium* λέγονται αδροφουζαριώσεις και αποτελούν μερικές από τις πιο καταστρεπτικές φυτικές ασθένειες (Παναγόπουλος, 1993).

1.6.1. Το είδος *Fusarium oxysporum*

Το πιο κοινό είδος του γένους *Fusarium*, ο μύκητας *Fusarium oxysporum*, είναι κυρίαρχο της μυκοχλωρίδας του εδάφους σε όλο τον κόσμο και θεωρείται σύννηθες μέλος της μικροβιακής κοινότητας της ριζόσφαιρας των φυτών (Fravel *et al.*, 2003). Είναι αναμφίβολα το πιο σημαντικό από οικονομικής άποψης είδος του γένους, δεδομένου των πολλών ξενιστών του και των απωλειών που προκαλεί όταν προσβάλλει ένα φυτό. Περιλαμβάνει μη παθογόνα στελέχη, παθογόνα φυτών και παθογόνα στελέχη του ανθρώπου. Προκαλεί σοβαρές απώλειες στα περισσότερα λαχανικά, όπως σολανώδη, κολοκυνθοειδή και καλλωπιστικά, όπως γαρίφαλλα, χρυσάνθεμα, τουλίπες, σε ορισμένες καλλιέργειες αγρού, όπως το βαμβάκι και τον καπνό, σε φυτείες όπως μπανάνας, καφέ και σε λίγα σκιδόδενδρα. Οι αδροφουζαριώσεις είναι πιο σοβαρές υπό θερμές εδαφικές συνθήκες και στα θερμοκήπια.

1.6.2. Ο βιολογικός κύκλος του παθογόνου *Fusarium oxysporum*

Το *Fusarium oxysporum*, όπως ειπώθηκε και παραπάνω, είναι εδαφογενής μύκητας και έτσι έχει την ικανότητα να επιβιώνει στο έδαφος απουσία ξενιστή για μεγάλα χρονικά διαστήματα, μέσω των χλαμυδοσπορίων. Τα χλαμυδοσπόρια είναι αγενή σπόρια, ανθεκτικά, μέσω των οποίων επιβιώνει ο μύκητας σε δυσμενείς συνθήκες. Οι περισσότερες φυλές του μύκητα παραμένουν σε λήθαργο μέχρι να υπάρξουν οι κατάλληλες συνθήκες βλάστησης (Bishop and Cooper, 1983). Στην πραγματικότητα, αν ένα έδαφος μολυνθεί από το μύκητα μια φορά, τότε θα παραμείνει για πάντα μολυσμένο. Η επιτυχής προσβολή των φυτών από το συγκεκριμένο μύκητα είναι ένα πολύ σύνθετο φαινόμενο, το οποίο απαιτεί:

1. την αναγνώριση των ριζών μέσω άγνωστων ουσιών σημάτων,
2. την προσκόλληση στις ρίζες και τη διαφοροποίηση σε υφή διεισδύσεως,
3. τη διάτρηση του φλοιού της ρίζας και υποβάθμιση των φυσιολογικών φραγμών του ξενιστή, όπως η ενδοδερμίδα, ώστε να φτάσει στα αγγεία του ξυλώματος,
4. την προσαρμογή στο περιβάλλον του ξενιστή, που συμπεριλαμβάνει και την ανθεκτικότητα στις όποιες αντιμικροβιακές ουσίες,

5. τον πολλαπλασιασμό των υφών και παραγωγή μικροκονιδίων μέσα στα αγγεία του ξυλώματος και
6. την έκκριση των καθοριστικών για την παθογένεια παραγόντων, όπως μικρά πεπτίδια και τοξίνες (Agris, 1997).

1.7. Το γένος *Verticillium*

Οι μύκητες του γένους *Verticillium* είναι επίσης εδαφογενείς και περιλαμβάνουν έξι φυτοπαθόγona είδη. Είναι υπεύθυνοι για πολλές φυτικές ασθένειες, κυρίως για τις αδρομυκώσεις (Dez and Clewes, 2003, Pegg and Braddy, 2002). Οι αδρομυκώσεις που προκαλούνται από τους μύκητες του γένους *Verticillium* ονομάζονται βερτισιλλιώσεις και εμφανίζονται σε πολυετείς αλλά και ετήσιες καλλιέργειες (Παναγόπουλος, 1997). Δεν υπάρχουν μηκυτοκτόνα με θεραπευτική δράση για την αντιμετώπιση ήδη εδραιωμένων βερτισιλλιώσεων σε φυτά. Παρόλη την οικονομική σημασία αυτών των παθογόνων μυκήτων, λίγα δεδομένα υπάρχουν για τη μοριακή βάση των ασθενειών που προκαλούν και τους μοριακούς μηχανισμούς που χρησιμοποιούν για την πρόκλησή τους. Έχει αναφερθεί ότι αυτά τα φυτοπαθόγona παράγουν ένζυμα που αποδομούν το κυτταρικό τοίχωμα του φυτού-ξενιστή καθώς και φυτοτοξίνες, που συμβάλλουν στην εκδήλωση των συμπτωμάτων των ασθενειών. Τα μικροσκληρώτια και το μυκήλιο παίζουν σημαντικό ρόλο στο βιολογικό κύκλο των ασθενειών, καθώς αποτελούν δομές για τη μακροπρόθεσμη επιβίωση των μυκήτων (Fradin and Thomma, 2006).

Επειδή τα συμπτώματα των ασθενειών που προκαλούν οι μύκητες αυτού του γένους ποικίλλουν μεταξύ των φυτών-ξενιστών, δεν υπάρχουν χαρακτηριστικά συμπτώματα που να προκαλούνται σε όλα τα φυτά που προσβάλλονται από αυτούς τους μύκητες. Παρότι οι βερτισιλλιώσεις είναι ευρύτατα διαδεδομένες, πραγματικές αδρομυκώσεις δεν προκαλούνται πάντα μετά από μόλυνση με μύκητα του γένους *Verticillium*. Τα συμπτώματα των αδρομυκώσεων ξεκινούν από τη μισή επιφάνεια του προσβεβλημένου φύλλου, στον πιο γηρασμένο βλαστό συνήθως, καθώς η προσβολή είναι βασιπεταλική (από τη βάση προς την κορυφή). Τελικά, η αδρομύκωση εξαπλώνεται σε ολόκληρο το φύλο οπότε νεκρώνεται. Εναλλακτικά, τα φύλλα μπορεί πρώτα να αποκτήσουν κίτρινες κηλίδες, οι οποίες μετατρέπονται σε καφέ και τα αγγεία φαίνονται με καφέ ή μωβ χρώμα (Fradin and Thomma, 2006). Οι βερτισιλλιώσεις είναι δύσκολο να διαγνωστούν με βάση την έκφραση των συμπτωμάτων, κυρίως λόγω της ομοιότητάς τους με τις αδροφουζαριώσεις που προκαλούνται από τους μύκητες του γένους *Fusarium* (Back et al., 2002, Harrison, 1971, Johnson and Santo, 2001).

1.7.1. Οι μύκητες *Verticillium dahlia* Klebahn και *Verticillium albo-atrum*

Δύο από τα είδη του γένους *Verticillium*, το *V. dahlia* Klebahn και το *V. albo-atrum* είναι τα πιο σημαντικά φυτοπαθόγona, τα οποία μπορούν να προσβάλουν μια μεγάλη ποικιλία δικοτυλίδων φυτών-ξενιστών (Agris, 1997). Διαχέονται μέσα στο φυτικό ξύλωμα και προκαλούν βερτισιλλιώσεις. Μετά την προσβολή των φυτών από τους μύκητες αυτών των ειδών, προκαλείται ο θάνατος του φυτού και οι μύκητες επιστρέφουν στο έδαφος, σταματάει η σαπροφυτική ανάπτυξή τους και θεωρούνται πλέον ως υποχρεωτικά παθόγona (Dez and

Clewes, 2003). Οι μύκητες του είδους *V. dahlia* προκαλούν αδρομυκώσεις σε ένα μεγάλο εύρος φυτών-ξενιστών, όπως σε λαχανικά, φρούτα, λουλούδια, ελαιούχων σπόρων καθώς και πολυετών ξυλώδων (Pegg and Braddy, 2002, Schnathorst, 1981). Οι μύκητες του είδους *V. albo-atrum* θεωρείται πως έχουν πιο στενό φάσμα ξενιστών, και αναφέρονται συνήθως ως παθογόνα του λυκίσκου, της σόγιας, της τομάτας και της πατάτας (Ligoixigakis *et al.*, 2002, Vallad *et al.*, 2005).

1.7.2. Ο βιολογικός κύκλος των παθογόνων *V. dahlia* και *V. albo-atrum*

Το είδος *V. dahlia* προκαλεί μονοκυκλική ασθένεια, δηλαδή ο κύκλος της ασθένειας ολοκληρώνεται σε μία καλλιεργητική περίοδο. Αντίθετα, το είδος *V. albo-atrum* μπορεί να παράγει κονίδια στους προσβεβλημένους φυτικούς ιστούς που μεταφέρονται μέσω του αέρα και συνεπώς συμβάλλουν στη διασπορά της ασθένειας (Jiménez-Díaz and Millar, 1988). Για το λόγο αυτό, οι ασθένειες που προκαλούνται από το είδος αυτό είναι μερικές φορές πολυκυκλικές. Γενικά, ο κύκλος ζωής και των δύο ειδών είναι παρόμοιος και μπορεί να διαχωριστεί σε τρεις φάσεις: τη ληθαργική, την παρασιτική και τη σαπροφυτική φάση

Κατά τη ληθαργική φάση ο μύκητας επιβιώνει με τη μορφή μικροσκληρωτίων στο έδαφος ή σε φυτικά υπολείμματα. Απουσία ξενιστή, τα μικροσκληρώτια μπορούν να επιβιώσουν για σειρά ετών. Η μυκοστατική αυτή δράση διακόπτεται με την έκκριση ουσιών από τις ρίζες στη ριζόσφαιρα. Κάθε κύτταρο των μικροσκληρωτίων βλαστάνει μία φορά με αποτέλεσμα κάθε μικροσκληρώτιο να μπορεί να βλαστήσει πολλές φορές και να αυξάνει την πιθανότητα μόλυνσης. Οι υφές του μύκητα οδηγούνται στις ρίζες του ξενιστή από τις εκκρίσεις των ριζών (Huisman, 1982).

Τυπικά, το παθογόνο μπαίνει στην παρασιτική φάση μολύνοντας ευπαθή φυτά είτε από το ακρορίζιο είτε από τις πλευρικές ρίζες (Bishop and Cooper, 1983). Το παθογόνο διαπερνά την ενδοδερμίδα, που δρα σα φυσικό εμπόδιο των φυτών στη μόλυνση, είτε όταν η ενδοδερμίδα δεν έχει αναπτυχθεί, είτε όταν έχει τραυματιστεί από φυσικές πληγές ή νηματώδεις (Bowers *et al.*, 1996, Huisman, 1982, Pegg, 1974). Μετά τη διάτρηση της ενδοδερμίδας, ο μύκητας εισέρχεται στους αγγειακούς ιστούς όπου σχηματίζονται κονίδια, με μια διαδικασία που ονομάζεται διάσχιση. Τα κονίδια αυτά βλαστάνουν και διαπερνούν τα γειτονικά αγγεία, ετσι ώστε να συνεχίζεται ο αποικισμός του μύκητα και να ξεκινάει ένας νέος κύκλος μόλυνσης (Bishop and Cooper, 1983). Ο μύκητας εισέρχεται στη σαπροφυτική φάση κατά τη νέκρωση των φυτικών ιστών ή τη γήρανση των φυτών, αποικίζοντας εκτός από τους ξυλώδεις ιστούς και άλλα φυτικά μέρη. Σε αυτή τη φάση, ο μύκητας *V. albo-atrum* παράγει τα κονίδιά του, που μεταφέρονται με τον αέρα και ξεκινούν ένα νέο κύκλο ασθένειας (Jiménez-Díaz, Millar R. L., 1988). Όσον αφορά το μύκητα *V. dahlia*, παράγεται μεγάλος αριθμός μικροσκληρωτίων, τα οποία απελευθερώνονται στο έδαφος με την αποσύνθεση των φυτών και επιβιώνουν για 10-15 χρόνια (Wilhelm, 1955).

1.8. Το γένος *Rhizoctonia*

Οι μύκητες του γένους *Rhizoctonia* αποτελούν μια ετερογενή ομάδα που δεν παράγει αγενή σπόρια, και μοιράζεται πολλά κοινά μορφολογικά χαρακτηριστικά. Οι οργανισμοί του γένους αυτού είναι γενικά μύκητες εδάφους,

κυρίως των ριζών, και συνήθως παθογόνοι. Υπάρχουν ωστόσο αρκετές αναφορές για μεγάλο αριθμό σαπροφυτικών και συμβιωτικών μυκήτων του γένους *Rhizoctonia*. Οι μύκητες αυτοί απαντώνται σε όλο τον κόσμο τόσο σε καλλιεργούμενα εδάφη, αλλά και σε δασικές εκτάσεις και αποτελούν μερικά από τα πιο σημαντικά από οικονομικής άποψης φυτοπαθογόνα, δεδομένου των ασθενειών που προκαλούν στις καλλιέργειες (González García *et al.*, 2006).

1.8.1. Ο μύκητας *Rhizoctonia solani*

Ο μύκητας *Rhizoctonia solani* αποτελεί το πιο καλά μελετημένο είδος του γένους *Rhizoctonia*. Ο συγκεκριμένος μύκητας συναντάται σε εδάφη σε όλο τον κόσμο και θεωρείται το πιο καταστρεπτικό φυτοπαθογόνο, με ένα μεγάλο εύρος ξενιστών, συμπεριλαμβανομένου της τομάτας, της πιπεριάς, της πατάτας, καθώς και άλλων κηπευτικών αλλά και μεγαλύτερων φυτών (Anderson, 1982, Sneh *et al.*, 1991). Τα διάφορα στελέχη του *Rhizoctonia solani* μπορεί να διαφέρουν σε πολλές παραμέτρους, όπως:

- το είδος των ξενιστών που προσβάλλουν,
- την τοξικότητα,
- την ικανότητα να είναι φυτοπαθογόνα ή όχι
- τη θερμοκρασία που προκαλείται η προσβολή
- την ικανότητα να σχηματίζουν σκληρώτια,
- το ρυθμό ανάπτυξης και
- την ικανότητα επιβίωσης σε δεδομένη περιοχή (Cubeta and Vilgalys, 1997).

Τα φυτοπαθογόνα αυτά προκαλούν σάπισμα στα φυτά, μαύρες κηλίδες στις ρίζες και τα σπόρια, όπως και σήψεις του στελέχους και των φυτικών τμημάτων που έρχονται σε επαφή με το έδαφος, όπως στην περίπτωση των φύλλων του μαρουλιού και του πεπονιού για παράδειγμα. Τα συμπτώματα αυτά αναφέρονται συνολικά με τον όρο ριζοκτονία. Στελέχη του είδους *R. solani* μπορούν να προσβάλλουν σπόρους πριν αρχίσουν να βλαστάνουν, οπότε προκαλούν πρόωρο σάπισμα ή μπορούν να σκοτώσουν τα πολύ νεαρά φυτά, αμέσως αφού αναδυθούν από το έδαφος (Parmeter, 1970). Επιπλέον, ενοχοποιούνται και για ασθένειες του φυλλώματος λόγω της παραγωγής των σπόρων τους στην επιφάνεια των φύλλων των φυτών-ξενιστών (Kucharek, 2000).

1.8.2. Ο βιολογικός κύκλος του παθογόνου *R. solani*

Τα γεγονότα που πραγματοποιούνται κατά τη διάρκεια της προσβολής του φυτού από το μύκητα *R. solani* περιλαμβάνουν την προσκόλληση, τη διείσδυση, τον αποικισμό και την αντίδραση του φυτικού ξενιστή. Τα αρχικά βήματα της προσβολής χαρακτηρίζονται τόσο από μια αλλαγή στο πρότυπο ανάπτυξης του μύκητα, αλλά και από το σχηματισμό των υφών του και την προσκόλλησή τους στο φυτό. Αυτές οι 'δομές προσβολής' που σχηματίζονται επιτρέπουν στο μύκητα να διεισδύσει στο φυτικό ιστό. Έχει δειχθεί πως, κατά τα αρχικά στάδια της προσβολής, ο μύκητας *R. solani* παράγει πηκτινολυτικά και κυτταρολυτικά ένζυμα. Μετά τη διείσδυση, ο αποικισμός του φυτού-ξενιστή πραγματοποιείται από την παραγωγή υδρολυτικών ενζύμων, ικανών να αποικοδομήσουν το κυτταρικό τοίχωμα που βρίσκεται κάτω από τις σχηματισμένες μυκητιακές υφές.

Η παθογένεια του μύκητα αυτού χαρακτηρίζεται από την πολύ σοβαρή καταστροφή των φυτικών κυττάρων ή το θάνατό τους, πριν ή αμέσως μετά τη

διείσδυση και τον αποικισμό του. Για το λόγο αυτό, όπως και σε μοντέλα άλλων παθογόνων μυκήτων, η διείσδυση και ο αποικισμός του θεωρούνται πρωταρχικές διαδικασίες για την ανάπτυξη των μυκητιακών υφών, γεγονός που οδηγεί σε ένα υψηλά αποδομημένο ή ακόμα ετοιμοθάνατο φυτό, υποδεικνύοντας ένα συνδυασμό νεκροτροφικής και ημι-βιοτροφικής συμπεριφοράς του μύκητα στους συμβατούς ξενιστές του (González García *et al.*, 2006).

Το συγκεκριμένο φυτοπαθογόνο προσβάλλει τους ξενιστές του κατά τα αρχικά στάδια της ανάπτυξής τους, όπως τα σπόρια και τα νεαρά φυτά, τα οποία συναντώνται τυπικά στο έδαφος. Δεν είναι γνωστό ότι παράγει αγενή σπόρια (κονίδια), παρόλο που θεωρείται πως έχει έναν αγενή κύκλο ζωής. Ωστόσο, εγγενή σπόρια (βασιδιοσπόρια) παράγονται σε μολυσμένα φυτά (Parmeter, 1970).

1.9. Το γένος *Sclerotinia*

Οι μύκητες του γένους *Sclerotinia* αποτελούν σημαντικά φυτοπαθογόνα και σχετίζονται κυρίως με ασθένειες λαχανικών που ονομάζονται σκληρωτινιάσεις. Η προσβολή εμφανίζεται συχνά στην περιοχή του λαϊμού του φυτών, ως υδατώδης μετασηματισμός των ιστών που σύντομα εξαπλώνεται προς το στέλεχος πάνω από την επιφάνεια του εδάφους και τη ρίζα. Σχηματίζεται εκτεταμένο, μαλακό, υπόλευκο μέχρι σταχτόχρωο έλκος που όταν προσβάλλει το στέλεχος, το φύλλωμα του φυτού πάνω από την προσβολή γίνεται χλωρωτικό, μαραίνεται και ξηραίνεται. Στους καρπούς σχηματίζονται υδατώδεις εκτεταμένες κηλίδες που σύντομα αποκτούν καστανό ανοικτό χρώμα και εμφανίζουν μαλακή υγρή σήψη. Τα κυριότερα είδη που προκαλούν τις ασθένειες του γένους αυτού είναι τα *S. sclerotiorum* και *S. minor*.

1.9.1. Οι παθογόνοι μύκητες *S. sclerotiorum* και *S. minor*

Το φυτοπαθογόνο *S. minor* έχει ένα στενό φάσμα φυτών-ξενιστών, στα οποία συμπεριλαμβάνεται το μαρούλι, το σέλινο, η σόγια, το καρότο, το φυστίκι, το ηλιοτρόπιο και μερικά ακόμη φυτά. Από την άλλη πλευρά, το *S. sclerotiorum* έχει ένα ευρύ φάσμα ξενιστών, όπως το λάχανο, το πεπόνι, το κουνουπίδι, το καρότο, το σέλινο, το φασόλι, το μαρούλι, η τομάτα, η πιπεριά, η πατάτα, καθώς και πολλά ανθοκομικά φυτικά είδη. Τόσο το *S. sclerotiorum* όσο και το *S. minor* παράγουν ένα πλούσιο, πυκνό βαμβακώδες μυκήλιο στην επιφάνεια του φυτού-ξενιστή, καθώς και στις παρακείμενες εδαφικές επιφάνειες. Μέσα σε αυτό το πυκνό στρώμα, άσπρα σωματίδια μύκητα, τα σκληρώτια, αρχίζουν να σχηματίζονται και να μετατρέπονται σε μαύρα και σκληρά καθώς ωριμάζουν. Τα σκληρώτια αυτά επιτρέπουν στον μύκητα να επιβιώνει στο έδαφος για πολλά χρόνια.

1.9.2. Ο βιολογικός κύκλος των παθογόνων *S. sclerotiorum* και *S. minor*

Οι συγκεκριμένοι μύκητες προσβάλουν τους φυτικούς ιστούς και επιβιώνουν με το μυκήλιό τους σε προσβεβλημένα ή νεκρά φυτά μέσω των σκληρωτίων, όπως αναφέρθηκε παραπάνω. Τα σπόρια τους επίσης, είναι δυνατό να μεταδοθούν μέσω του αέρα στο φυτό-ξενιστή ή με το νερό ποτίσματος, τα καλλιεργητικά εργαλεία και τα ζώα.

Μόλις οι μύκητες αποικίσουν το φυτό-ξενιστή δημιουργούν μια ήπια καστανή-γκριζωπή βλάβη. Παράλληλα, δημιουργείται σοβαρή αποικοδόμηση των φυτικών ιστών που καταλήγει σε σάπισμα. Ο μύκητας *S. minor* συνήθως προσβάλλει τις ρίζες του φυτού και το στέλεχος, πάνω ή κοντά στη γραμμή του εδάφους. Δημιουργούνται καταστροφές στο στέλεχος και το παθογόνο σταδιακά καταστρέφει και το αγγειακό σύστημα, ενώ το φυτό σαπίζει και καταρρέει. Με παρόμοιο τρόπο και ο μύκητας *S. sclerotiorum* προσβάλλει τους ξενιστές του, ωστόσο συχνά παράγει σπόρια που μεταφέρονται με τον αέρα. Τα σπόρια, επειδή φυσιολογικά δε μπορούν να μολύνουν τα φύλλα και το στέλεχος άμεσα, πρέπει πρώτα να αναπτυχθούν σε νεκρά πέταλα ή σε οργανική ύλη προσκολλημένη στα φύλλα και το στέλεχος του φυτού. Τα πέταλα αποτελούν πηγή τροφής απαραίτητη έτσι ώστε να μπορέσουν τα σπόρια να βλαστάνουν και να παράγουν υφές που θα διεισδύσουν σταδιακά στο φυτό-ξενιστή. Γι' αυτό, δεν είναι ασυνήθιστο να συναντήσει κανείς μόλυνση από το μύκητα *S. sclerotiorum* σε φυλλώματα σέλινου, μαρουλιού, σε λοβούς φασολιού, αλλά και σε εναέρια τμήματα άλλων φυτών-ξενιστών. Τα γηρασμένα τμήματα του φυτού βέβαια, αποτελούν ιδανικά μέρη για αποικισμό από το παθογόνο. Από αυτούς τους ιστούς το παθογόνο μπορεί γρήγορα να προσβάλει υγιή φύλλα, στέλεχος και φρούτα. Για το λόγο αυτό, το *S. sclerotiorum* θεωρείται ιδιαίτερα σοβαρό παθογόνο των καλλιεργειών (Laemmlen, 2001).

1.10. Φυτικές καλλιέργειες

Γενικά, οι ασθένειες αποτελούν σημαντικό περιοριστικό παράγοντα αγροτικής παραγωγής και μπορούν να χωριστούν σε δύο ομάδες: α) ασθένειες που προκαλούνται από μη-μολυσματικούς φυσικούς ή χημικούς παράγοντες, όπως δυσμενείς περιβαλλοντικές συνθήκες, διατροφικές διαταραχές ή βλάβες από ζιζανιοκτόνα. Οι μη-μολυσματικές ασθένειες δε διαδίδονται από φυτό σε φυτό, ωστόσο η εξάπλωση της ασθένειας μπορεί να είναι αρκετά ομοιόμορφη και εκτενής, αν ολόκληρο το φυτό εκτεθεί στον υπεύθυνο παράγοντα, β) ασθένειες που προκαλούνται από παθογόνους μικροοργανισμούς, όπως βακτήρια, νηματώδεις, μύκητες (που αναφέρθηκαν παραπάνω) και ιούς. Οι ασθένειες αυτές είναι μεταδοτικές και διαδίδονται από φυτό σε φυτό πολύ γρήγορα, όταν οι περιβαλλοντικές συνθήκες είναι ευνοϊκές. (Damicone and Brandenburg 2010). Παρακάτω παρατίθενται τέσσερις διαφορετικές φυτικές καλλιέργειες (τομάτας, πιπεριάς, αγγουριού και φράουλας) που είναι ευάλωτες σε προσβολές από διαφορετικούς παθογόνους μύκητες.

1.10.1 Τομάτα

Αδρομυκώσεις

Τα φυτά της τομάτας μπορεί να προσβληθούν σε οποιαδήποτε ηλικία, από τους μύκητες που προκαλούν αδροφυζαριώσεις και βερτισιλλιώσεις. Οι οργανισμοί που προκαλούν αδρομυκώσεις, όπως οι παραπάνω δύο ασθένειες, εισέρχονται στο φυτό μέσω των νεαρών ριζών τους και του στελέχους, οπότε προσβάλλουν το αγγειακό σύστημα (ξύλωμα). Καθώς τα αγγεία καταρρέουν, η προμήθεια του νερού εμποδίζεται. Με μειωμένη προμήθεια νερού τα φύλλα αρχίζουν να σαπίζουν τις ηλιόλουστες μέρες και να 'αναρρώνουν' τις νύχτες. Το σάπισμα εμφανίζεται αρχικά στο πάνω μέρος του φυτού ή στα κατώτερα φύλλα. Η διαδικασία συνεχίζεται μέχρι να σαπίσει ολόκληρο το φυτό και να πεθάνει. Τα

φυτά της τομάτας μπορεί με κάποιον τρόπο να επανέλθουν, ωστόσο είναι συνήθως ασθενή και παράγουν φρούτα χαμηλής ποιότητας (Miller *et al.* 2004).

Αδροφουζαριώσεις

Προκαλείται από το μύκητα *Fusarium oxysporum* f. sp. *radici lycopersici*. Το πρώτο σύμπτωμα της ασθένειας είναι συνήθως το κιτρίνισμα των κατώτερων φύλλων, τα οποία σταδιακά σαπίζουν και πεθαίνουν. Τα συμπτώματα αρχικά μπορεί να αφορούν μόνο τη μια πλευρά του φυτού (Εικόνα 5). Αν το κύριο στέλεχος κοπεί, σκούρες καφέ ραβδώσεις διακρίνονται κατά μήκος της μιας πλευράς του στελέχους (Εικόνα 6). Η ασθένεια αναπτύσσεται κατά μήκος όλου του στελέχους μέχρι όλο το φύλλωμα να νεκρωθεί και το φυτό να πεθάνει πριν ωριμάσει (Damicone and Brandenburg 2010).



Εικόνα 5: Αδροφουζαρίωση τομάτας. Φαίνεται το κιτρίνισμα και η νέκρωση των φύλλων από τη μια πλευρά (Damicone and Brandenburg 2010).



Εικόνα 6: Σκούρος καφέ αποχρωματισμός των αγγείων τομάτας προκαλούμενος από αδροφουζαρίωση (Damicone and Brandenburg 2010).

Βερτισιλλιώσεις

Οι συγκεκριμένες αδρομυκώσεις προκαλούνται από τους μύκητες *Verticillium albo-atrum* και *Verticillium dahliae*. Τα συμπτώματα των βερτισιλλιώσεων στη τομάτα, στην πατάτα και στη μελιτζάνα είναι παρόμοια με αυτά της αδροφουζαρίωσης. Πολύ συχνά τα συμπτώματα δεν είναι εμφανή αν υπάρχει περίοδος ξηρασίας. Τα κατώτερα φύλλα εμφανίζονται ωχρά, στη συνέχεια οι άκρες τους νεκρώνονται με αποτέλεσμα τα φύλλα τελικά να νεκρώνονται και να πέφτουν. Χαρακτηριστικό της βερτισιλλιώσης της τομάτας είναι οι βλάβες με σχήμα V στις άκρες των φύλλων (Εικόνα 7). Τα προσβεβλημένα φυτά συνήθως επιβιώνουν μέχρι το τέλος της εποχής, αλλά μόνο τα ανώτερα φύλλα παραμένουν πράσινα. Τα φρούτα είναι μικρά, αναπτύσσουν κίτρινες επιφάνειες και μπορεί να μαραθούν από τον ήλιο εξαιτίας της απώλειας των φύλλων. Μια λεπτή γραμμή αποχρωματισμού στο στέλεχος όμοια με αυτή της αδροφουζαρίωσης μπορεί



Εικόνα 7: Χαρακτηριστικές βλάβες σε σχήμα V στα φύλλα τομάτας που σχετίζονται με βερτισιλλιώση (Miler *et al*2004.)

να παρατηρηθεί, αλλά συνήθως εντοπίζεται στα χαμηλότερα φυτικά τμήματα. Επιπλέον, ο αποχρωματισμός είναι χαρακτηριστικά πιο έντονος συγκριτικά με αυτόν που προκαλείται από την αδροφουζαρίωση (Miller *et al.* 2004).

▪ Σκληρωτινιάσεις

Οι σκληρωτινιάση είναι μια ιδιαίτερα καταστρεπτική ασθένεια για την τομάτα που προκαλείται από το μύκητα *Sclerotium rolfsii*. Το αρχικό σύμπτωμα της ασθένειας είναι ο γρήγορος μαρασμός ολόκληρου του φυτού. Υδαρές βλάβες στο στέλεχος αρχίζουν να εξαπλώνονται κοντά στη γραμμή εδάφους, δημιουργώντας καφέ περιοχές και οδηγώντας τελικά στη νέκρωσή του. Ένα παχύ λευκό στρώμα, το μυκήλιο, καλύπτει τις βλάβες αυτές, γύρω από το υγρό έδαφος. Στη συνέχεια δημιουργούνται μικρές ομοιόμορφες δομές, τα σκληρώτια, πάνω από τα μυκήλια. Τα σκληρώτια αρχικά έχουν λευκό χρώμα και στη συνέχεια αποκτούν καφέ, (Εικόνα 8). Η παρουσία των λευκών μυκηλίων και τα σκληρώτια στη βάση του στελέχους των προσβεβλημένων φυτών είναι συνήθη



χαρακτηριστικά για την ταυτοποίηση της σκληρωτινιάσης (Εικόνα 9).

Σάπισμα μπορεί να προκληθεί και στον καρπό της τομάτας από διάφορους μύκητες εδάφους, οι οποίοι προσβάλλουν τους καρπούς που βρίσκονται σε επαφή με το έδαφος.

Εικόνα 8: Σκληρώτια μέσα σε προσβεβλημένο στέλεχος τομάτας (Damicone and Brandenburg 2010).

Το θερμό και υγρό έδαφος, καθώς και η ανάπτυξη της τομάτας σε ξηρές περιοχές ευνοούν την εκδήλωση της ασθένειας. Οι καρποί που πέφτουν στο έδαφος είναι πιο ευάλωτοι από τέτοιου είδους σάπισμα, ωστόσο ακόμα και αυτοί που είναι άγουροι, πράσινου χρώματος μπορούν να προσβληθούν. Ειδικότερα, ο μύκητας *Sclerotium rolfsii* είναι υπεύθυνος για σκληρωτινιάση, προκαλώντας σάπισμα, σε καρπούς που έχουν πέσει στο έδαφος. Μόλις ο καρπός πέσει σε προσβεβλημένο, από το συγκεκριμένο μύκητα, έδαφος προκαλείται μια κιτρινωπή βλάβη που επεκτείνεται, αποκτά αστεροειδές σχήμα και υδαρή υφή. Ολόκληρο το φυτό καταρρέει μέσα σε 3-4 μέρες. Μια μάζα λευκών μυκηλίων και αναπτυγμένων σκληρωτίων γίνονται εμφανή στην κατώτερη πλευρά του προσβεβλημένου φυτού (Damicone and Brandenburg 2010).



Εικόνα 9: Σκληρωτινιάση τομάτας. Παρουσιάζονται τα λευκά πυκνά μυκήλια που αναπτύσσονται στη βάση των προσβεβλημένων φυτών (Damicone and Brandenburg 2010).

- **Ριζοκτονίες**



Η συγκεκριμένη ασθένεια προκαλείται από το μύκητα *Rhizoctonia solani* και προκαλεί σάπισμα, που εκδηλώνεται με την μορφή καφέ χρώματος και εναλλασσόμενες φωτεινές-σκοτεινές ζώνες στις περιοχές όπου το φρούτο έρχεται σε επαφή με το έδαφος (Εικόνα 10).

Εικόνα 10: Ριζοκτονία καρπού τομάτας (Miler *et al.* 2004).

1.10.2. Πιπεριά

- **Αδρομυκώσεις**

Όσα αναφέρθηκαν για τις αδρομυκώσεις της τομάτας ισχύουν και για την πιπεριά, με τη διαφορά ότι τα φυτά της πιπεριάς καταρρέουν ταχύτατα και πεθαίνουν. Η αδροφυζαρίωση της πιπεριάς προκαλείται από το μύκητα *Fusarium oxysporum* var. *vasinfectum* και ο μαρasmus συνήθως δεν ξεκινάει από το κατώτερα φύλλα αν οι ρίζες και η βάση του στελέχους δεν έχουν ήδη αρχίσει να αποσυντίθενται. Σύντομα ακολουθεί και η μάρανση ολόκληρου του φυτού. Σκούρα καφέ έλκη μπορεί να γίνουν εμφανή στη βάση του φυτού της πιπεριάς.

Όσον αφορά τη βερτισιλλίωση της πιπεριάς, προκαλείται από τα παθογόνα *Verticillium albo-atrum* και *V. dahlia*. Η μάρανση προκαλείται πρώτα στα κατώτερα φύλλα, στη συνέχεια στις άκρες των φύλλων, όπου γίνονται ξηρές και αποκτούν καφέ χρώμα. Τα καφέ στίγματα στους αγγειακούς ιστούς μπορούν να παρατηρηθούν καλά στο φυτό, το οποίο γρήγορα καταρρέει και πεθαίνει (Miler *et al.* 2004).

- **Σκληρωτινιάσεις**

Οι ασθένειες αυτές προκαλούνται από τον εδαφογενή μύκητα *Sclerotinia sclerotiorum*, ο οποίος είναι υπεύθυνος για προσβολές πολλών λαχανικών, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω. Το παθογόνο παράγει ανθεκτικά, μαύρα σκληρώτια, τα οποία αποτελούν για το μύκητα έναν τρόπο διαχείμανσης και εντοπίζονται μέσα στο στέλεχος του φυτού της πιπεριάς, στην επιφάνεια των προσβεβλημένων περιοχών (Zitter, 1989).

1.10.3. Αγγουριά

- **Φουζαρίωση λαιμού και ριζών**

Η συγκεκριμένη ασθένεια προκαλείται από το παθογόνο *Fusarium oxysporum* f.sp. *cucurbitae* το οποίο έχει εξειδίκευση σε όλα τα κολοκυνθοειδή (Zitter, 1998). Ο μύκητας προσβάλλει τις ρίζες του φυτού της αγγουριάς και στην συνέχεια μετακινείται στο στέλεχος. Τα φυτά και τα φρούτα οποιασδήποτε

ηλικίας μπορούν να μολυνθούν. Τα μεγαλύτερα φυτά που προσβάλλονται από το φυτοπαθογόνο αυτό παρουσιάζουν περιορισμένη ανάπτυξη, μαραίνονται και σταδιακά πεθαίνουν. Τα συμπτώματα της μάρανσης αναπτύσσονται σε μία ή περισσότερες πλευρές, ξεκινώντας συνήθως από τις άκρες. Τα προσβεβλημένα φυτά αγγουριάς σαπίζουν, οπότε ο μαρασμός εδραιώνεται με αποτέλεσμα να επέρχεται ο θάνατος του φυτού. Σε περιοχές δίπλα στο στέμμα του φυτού μπορεί να γίνουν εμφανή ραβδώσεις καφέ χρώματος. Οι ρίζες στο εσωτερικό μεταχρωματίζονται σε μελί-καφέ χρώμα (Doubrava *et al.*, 2007). Ωστόσο, τα ώριμα αγγούρια είναι λιγότερο ευάλωτα σε σχέση με άλλα κολοκυνθοειδή (Zitter, 1998).

▪ Σήψη κοιλιάς

Για αυτή την ασθένεια υπεύθυνος είναι ο εδαφογενής μύκητας *Rhizoctonia solani*, ο οποίος προκαλεί σάπισμα σε πολλές καλλιέργειες, συμπεριλαμβανομένου των κολοκυνθοειδών. Στην περίπτωση της σήψης κοιλιάς, τα συμπτώματα εμφανίζονται στην κάτω πλευρά και στο άκρο του ανθού του καρπού της αγγουριάς (Εικόνα 11) και μπορούν να εκδηλωθούν μέσα σε 24 ώρες από την προσβολή των καρπών που είναι σε επαφή με το έδαφος. Ολόκληρος ο καρπός μπορεί να σαπίσει μέσα σε 72 ώρες (Wehner and Barrett, 2010).



Εικόνα 11: Σήψη κοιλιάς σε αγγούρια προκαλούμενη από τον εδαφογενή μύκητα *Rhizoctonia solani* (Wehner and Barrett, 2010).

1.10.4. Φράουλα

▪ Αδρομυκώσεις

Αδροφουζαριώσεις

Η συγκεκριμένη ασθένεια προκαλείται από το παθογόνο *Fusarium oxysporum* το οποίο προσβάλλει πολλές ποικιλίες φράουλας. Τα μολυσμένα από το παθογόνο φυτά μαραίνονται και πεθαίνουν γρήγορα. Το στέλεχος εμφανίζει ένα διακριτό καφέ μεταχρωματισμό και, καθώς η ασθένεια εξελίσσεται, το κατώτερο τμήμα του στελέχους αρχίζει να φθείρεται (Εικόνα 12, Ullio, 2004).

Εικόνα 12: Αδροφουζαρίωση σε φυτό φράουλας (Ullio L., 2004).



Βερτισιλλιώσεις

Η ασθένεια αυτή, που προκαλείται από το μύκητα *Verticillium dahliae* εντοπίζεται στις εύκρατες περιοχές του κόσμου. Όπως και η τομάτα, η πατάτα και το βαμβάκι, έτσι και η φράουλα είναι ιδιαίτερα ευαίσθητη σε προσβολή από αυτό το φυτοπαθογόνο. Τα μολυσμένα φυτά τελικά εμφανίζουν μάρανση. Μερικά δε θα ανακάμψουν και θα πεθάνουν μέσα σε μία εβδομάδα. Ανάμεσα σε αυτά που θα επιβιώσουν, τα πιο ηλικιωμένα θα έχουν μορφή καμμένη, ενώ τα νεαρότερα εξακολουθούν να έχουν ωχρό χρώμα, μέχρι να νεκρωθούν εντελώς. Τα φρούτα των προσβεβλημένων φυτών φράουλας δεν ωριμάζουν, παραμένουν μικρά και έχουν επίσης ωχρή όψη (Εικόνα 13, Ullio, 2004).



Εικόνα 13: Βερτισιλλίωση σε φυτό φράουλας (Ullio L., 2004).

▪ **Σήψεις ριζών**

Το υπεύθυνο φυτοπαθογόνο για τις σήψεις ριζών σε φυτά φράουλας είναι το *Rhizoctonia solani*. Τα φυτά καταρρέουν ξαφνικά αμέσως πριν ή κατά τη διάρκεια της καρποφορίας. Το εσωτερικό των φύλλων αποκτά μωβ χρώμα και μια κάμψη στο πάνω τμήμα. Τα προσβεβλημένα στελέχη μπορεί να εμφανίσουν στο εσωτερικό τους καφέ μεταχρωματισμό. Οι νεαρές ρίζες αναπτύσσουν βλάβες με κόκκινο ή μαύρο χρώμα και σταδιακά νεκρώνονται

(Ullio,2004).

1.11. Σκοπός της εργασίας

Κύριος σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η εκτίμηση του πληθυσμού επιλεγμένων εδαφογενών μυκήτων που αποτελούν συχνά φυτοπαθογόνα των κηπευτικών όπως *Fusarium*, *Verticillium*, *Sclerotinia* και *Rhizoctonia* σε δείγματα εδαφών όπου καλλιεργείται τομάτα, πιπεριά, αγγούρι και φράουλα. Με τον τρόπο αυτό θα γίνει καταγραφή του φυτοπαθολογικού δυναμικού του κάθε εδάφους ώστε να καθοριστούν κατάλληλα φυτοπροστατευτικά μέτρα και να εκτιμηθεί η πιθανότητα/κίνδυνος εμφάνισης προσβολών στα καλλιεργούμενα φυτά.

Η εκτίμηση του δυναμικού των παραπάνω μυκήτων σε εδάφη από διάφορες κηπευτικές καλλιέργειες πραγματοποιήθηκε με την χρήση ημι-εκλεκτικών θρεπτικών μέσων για τους συγκεκριμένους μύκητες-στόχους. Λόγω της μερικής εκλεκτικότητας των θρεπτικών μέσων, η καταμέτρηση συνοδεύτηκε και από μοριακή ταυτοποίηση των μυκήτων που αναπτύσσονται στα επιλεγμένα θρεπτικά μέσα ώστε να επιβεβαιωθεί η ανάπτυξη των μυκήτων-στόχων και μόνο αυτών αλλά και να αποφύγουμε την λανθασμένη καταμέτρηση και υπερκετίμηση του φυτοπαθογόνου φορτίου των εδαφών.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Πειραματική Διαδικασία

Η πειραματική προσέγγιση που επιχειρήθηκε στο πλαίσιο της διπλωματικής αυτής εργασίας περιλάμβανε τα εξής στάδια:

- Λήψη δειγμάτων εδαφών από καλλιέργειες τεσσάρων κηπευτικών ειδών: πιπεριάς, τομάτας, αγγουριού και φράουλας.
- Προκαταρκτική εκτίμηση του πληθυσμού επιλεγμένων εδαφογενών φυτοπαθογόνων μυκήτων που ανήκουν στα γένη *Fusarium*, *Verticillium*, *Sclerotinia* και *Rhizoctonia*. σε εκλεκτικά θρεπτικά μέσα με την μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων.
- Επίστρωση αραιώσεων σε τρυβλία με τα αντίστοιχα θρεπτικά μέσα και επώαση σε θερμοκρασία 27C για διάστημα 4-7 ημερών.
- Απομόνωση μορφολογικά διακριτών αποικιών μυκήτων από τα τρυβλία και πραγματοποίηση υγρής καλλιέργειας για κάθε αποικία.
- Απομόνωση DNA από κάθε υγρή καλλιέργεια μυκήτων
- Έλεγχος της ποιότητας του DNA που εκχυλίστηκε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης
- PCR ενίσχυση της ITS περιοχής του γονιδιώματος των μυκήτων.
- Έλεγχος της ποιότητας των προϊόντων PCR με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης.
- Καθαρισμός των προϊόντων PCR
- Αλληλούχηση και ταυτοποίηση των διαφόρων γενών μυκήτων.
- Εκτίμηση του πληθυσμού των επιλεγμένων μυκήτων στα δείγματα εδάφους από τις κηπευτικές καλλιέργειες με την μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων και επίστρωση σε αντίστοιχα τρυβλία.

2.2. Δείγματα εδαφών από καλλιέργειες κηπευτικών

Σε πρώτο στάδιο συλλέχθηκαν δείγματα εδάφους από αγρούς που είχαν καλλιεργηθεί με τα κηπευτικά τομάτα, αγγούρι, πιπεριά και φράουλα. Συγκεκριμένα, για κάθε καλλιέργεια λήφθηκαν:

- Καλλιέργεια τομάτας: 31 δείγματα εδάφους
- Καλλιέργεια πιπεριάς: 32 δείγματα εδάφους
- Καλλιέργεια αγγουριού: 48 δείγματα εδάφους
- Καλλιέργεια φράουλας: 32 δείγματα εδάφους

Στη συνέχεια, για κάθε καλλιέργεια χωριστά πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές αραιώσεις των εδαφικών δειγμάτων (10^{-1} ως και 10^{-5}) σε αποστειρωμένο νερό και ακολούθησε επίστρωση (0.1 ml) των αραιώσεων 10^{-2} ως

10⁻⁴ σε τριβλία με τα αντίστοιχα θρεπτικά μέσα όπως περιγράφονται παρακάτω. Για κάθε έδαφος και παθογόνο επιστρώθηκαν δύο τριβλία.

2.3. Καλλιέργεια μυκήτων

2.3.1. Καλλιέργεια μυκήτων σε στερεά θρεπτικά μέσα

Τα τριβλία που επιστρώθηκαν περιείχαν εκλεκτικά ή μερικώς εκλεκτικά και θρεπτικά μέσα τα οποία επιτρέπουν την ανάπτυξη επιλεγμένων φυλογενετικά μυκήτων. Έτσι χρησιμοποιήθηκαν τεσσάρων ειδών θρεπτικά μέσα, ένα για κάθε ομάδα μυκήτων που εξετάστηκαν:

- Για την καταμέτρηση των μυκήτων που ανήκουν στο γένος *Fusarium* χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό μέσο Komada's (Dhingra and Sinclair, 1994) το οποίο προετοιμάστηκε όπως περιγράφεται παρακάτω:

Για την παρασκευή του διαλύθηκαν σε 1L νερό: 14 g άγαρ, 2g L-ασπαραγίνη (Sigma), 0,5g MgSO₄*7H₂O (Applichem), 0,5g KCl (Merck), 1g K₂HPO₄ (Applichem), 5mg Fe(EDTA) και προστέθηκε ακόμη 20gr D- γαλακτόζη (Duchefa Biochemie). Το διάλυμα αποστειρώθηκε στους 125⁰C για 25min και αφέθηκε να κρυώσει στους 45-50⁰C. Κατόπιν, προστέθηκαν επιπλέον 1g Quintozene (Pentachloronitrobenzene 94%, Aldrich), 0,5g Oxgall(ox-bile,dehydrates,purified Fluka), 1g Na₂B₄O₇*10H₂O και 300mg Steptomycin sulfate (Sigma). Το pH του διαλύματος ρυθμίστηκε στο 3,8-4,0 με την προσθήκη φωσφορικού οξέος.

- Για την καταμέτρηση των μυκήτων του γένους *Verticillium* χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό μέσο *Verticillium selective medium II; Pectate Agar* (Dhingra and Sinclair, 1994) το οποίο παρασκευάστηκε όπως περιγράφεται παρακάτω:

Συγκεκριμένα, διαλύθηκαν αργά 0,5 g Sodium polygalacturonate (Sigma) και 15 g άγαρ σε 900 ml ζεστού αναδεδυμένου νερού. Το διάλυμα αυτό (*διάλυμα 1*) αποστειρώθηκε, στους 125⁰C για 25min, και για κάθε λίτρο του ετοιμάστηκε το *διάλυμα 2*: σε 73ml αποστειρωμένου νερού προστέθηκαν 1ml TERGITOL-NPX(NONIDET P40 SUBSTITUTE, Sigma), 3ml guanidine HCl (Sigma), 7ml 1M KH₂PO₄ (αποστειρωμένο στους 125⁰C για 25min, Applichem) και 1ml διαλύματος ιχνοστοιχείων το οποίο αποτελείται από 5Mm MnCl₂*H₂O (Chem Lab), 3Mm ZnCl₂ (Chem Lab), 0,25Mm CuCl₂*H₂O (Chem Lab), 0,1Mm NaMoO₄*H₂O (Riedel de Haen) και 0,1Mm CoCl₂*6 H₂O (Chem Lab). Ο τελικός όγκος του *διαλύματος 2* είναι 85 ml. Στη συνέχεια παρασκευάστηκε το *διάλυμα 3*: 12ml αποστειρωμένου νερού, 0,5ml biotin 1%, 0,5ml MgSO₄*7H₂O (2M), 200mg streptomycin sulfate και 2ml Ferrous Citrate (17 Mm). Τα αντιδραστήρια του *διαλύματος 3,1* το διάλυμα των ιχνοστοιχείων και το *διάλυμα 2* αποστειρωθήκαν με PES Syringe Filter μεμβράνης πόρων 0,22μm.

- Για την καταμέτρηση των μυκήτων του γένους *Rhizoctonia* χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό μέσο *Ko & Hora medium* (Dhingra and Sinclair, 1994) που παρασκευάστηκε όπως περιγράφεται παρακάτω:

Για την παρασκευή του διαλύματος αυτού διαλύθηκαν σε 1L νερό 0,5g KCl (Merck), 1g K₂HPO₄ (Applichem), 0,2g NaNO₂, 0,5g MgSO₄*7 H₂O (Applichem), 10mg FeSO₄*7H₂O (Merck), 0,4g Gallic acid (Sigma) και 15g agar. Το διάλυμα αποστειρώθηκε στους 125⁰C για 25min και αφού κρύωσε, προστέθηκαν 90mg από το αντιβιοτικό fenaminosulf και 50mg από το αντιβιοτικό streptomycin.

- Για την καταμέτρηση των μυκήτων του γένους *Sclerotinia* χρησιμοποιήθηκε εκλεκτικό θρεπτικό μέσο όπως αυτό περιγράφηκε από τους Guttierrez and Shew, (1998):

Για το διάλυμα αυτό διαλύθηκαν 15 g agar, PDA 3% (Biolab) και 66,2 mg/L CaCl₂*2H₂O (Merck) σε 1L νερό. Ακολούθησε η αποστείρωσή του στους 125⁰C για 25min και ακολούθως προστέθηκαν 25mg pentachloronitrobenzene (Aldrich), 150mg penicillin G (Sigma), 150mg streptomycin sulfate (Sigma) και 50mg bromophenol blue(Appllichem).

Λόγω του γεγονότος ότι δεν υπάρχουν διαθέσιμα απολύτως εκλεκτικά θρεπτικά μέσα για τους μύκητες που επιλέχθηκαν να μελετηθούν είναι πιθανό στα επιλεγμένα θρεπτικά μέσα να αναπτύσσονται και μύκητες συγγενείς φυλογενετικά. Έτσι για την ακριβή εκτίμηση του πληθυσμού των παραπάνω μυκήτων πραγματοποιήθηκε προκαταρκτική απομόνωση και ταυτοποίηση των μυκήτων που αναπτύχθηκαν στα τρυβλία. Τα τρυβλία επώαστηκαν στους 27⁰C για 7-9 ημέρες, ανάλογα με το χρόνο που απαιτήθηκε για να εδραιωθεί η ανάπτυξη των μυκήτων στην επιφάνειά τους.

2.3.2. Υγρή καλλιέργεια μυκήτων

Μετά την πάροδο του απαραίτητου χρόνου επώασης, στην επιφάνεια των τρυβλίων αναπτύχθηκαν χαρακτηριστικές αποικίες μυκήτων, οποίες διέφεραν μεταξύ τους μορφολογικά. Οι διακριτές μορφολογικά αποικίες απομονώθηκαν από τα τρυβλία και επανακαλλιεργήθηκαν σε υγρή καλλιέργεια. Ειδικότερα, κάθε αποικία εμβολιάστηκε σε φλάσκα με 100 ml Potato Dextrose Broth (PDB).

2.4. Μοριακή ταυτοποίηση μυκήτων

2.4.1. Απομόνωση DNA μυκήτων

Μετά τη έναρξη της υγρής καλλιέργειας για κάθε αποικία μυκήτων, πραγματοποιήθηκε απομόνωση DNA με τη μέθοδο CTAB όπως περιγράφεται παρακάτω:

- Αρχικά από κάθε φλάσκα καλλιέργειας μυκήτων συλλέχθηκε μυκητιακή βιομάζα και αφού διηθήθηκε διαμέσου γάζας το μυκήλιο του μύκητα συλλέχθηκε σε χαρτί.
- Ακολούθησε η κονιορτοποίηση του μυκητιακού ιστού σε υγρό άζωτο με τη βοήθεια γουδιού
- Πραγματοποιήθηκε η προθέρμανση ρυθμιστικού διαλύματος εκχύλισης CTAB στους 65⁰C σε υδατόλουτρο. Η σύσταση του αντιδραστηρίου αυτού είναι: 100mM Tris-Cl pH=8, 200mM EDTA pH=8, 1,4M NaCl και 2% w/v CTAB.
- Έγινε προσθήκη ενός όγκου του θερμού ρυθμικού διαλύματος εκχύλισης CTAB σε κάθε δείγμα (200 μl) και ακολούθησε προσθήκη 1μl μερκαπτοαιθανόλης. Στη συνέχεια, τα δείγματα επώαστηκαν για 10-30min στους 65⁰C και αναδεύτηκαν ισχυρά (vortex).
- Ακολούθησε η προσθήκη ενός όγκου του αντιδραστηρίου SEVAG (200μl) σε κάθε δείγμα και η ανάδευσή του (vortex). Το αντιδραστήριο SEVAG αποτελείται από χλωροφόρμιο και ισοαμυλική αλκοόλη (3-methylbutanol) σε αναλογία 24:1.

- Ακολούθησε φυγοκέντρηση των δειγμάτων για 2min στις μέγιστες στροφές.
- Η υδατική φάση μεταφέρθηκε σε καθαρό eppendorf. Σε αυτό το στάδιο έχουν δημιουργηθεί 3 φάσεις. Πάνω είναι το DNA, ακολουθούν οι πρωτεΐνες και μετά η οργανική φάση με τα συστατικά του κυτταρικού τοιχώματος.
- Ακολούθησε η προσθήκη ισοπροπανόλης σε ποσότητα 0,7 του όγκου της υδατικής φάσης, τα δείγματα αναμειχθήκαν με ανακίνηση και επωάστηκαν για 10min σε θερμοκρασία δωματίου.
- Πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση στις μέγιστες στροφές για 10min έτσι ώστε το DNA να σχηματιστεί με τη μορφή πελέττας στο eppendorf, οπότε αφαιρέθηκε το υπερκείμενο.
- Ακολούθησε πλύση των δειγμάτων με 0,5ml παγωμένης αιθανόλης 70%. Στο σημείο αυτό δεν έγινε επαναδιάλυση, απλά χτύπημα με το χέρι.
- Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν για 5min στις μέγιστες στροφές.
- Το υπερκείμενο αφαιρέθηκε και ακολούθησε σύντομη φυγοκέντρηση.
- Το DNA που συλλέχθηκε επαναδιαλύθηκε σε 50μl ddH₂O με 1μl RNase σε κάθε δείγμα.

2.4.2. Ποιοτικός προσδιορισμός απομονωμένου DNA μυκήτων

Ο έλεγχος της ποιότητας και της ποσότητας του DNA των μυκήτων πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αγαρόζης. Τα μόρια του DNA γίνονται ορατά με την προσθήκη βρωμιούχου αιθιδίου, το οποίο έχει την ιδιότητα να παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων του DNA και να φθορίζει παρουσία υπεριώδους φωτός. Για την παρασκευή της πηκτής αγαρόζης ακολουθήθηκαν τα παρακάτω βήματα:

- Προσθήκη αγαρόζης 1% σε ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης 1XTAE, σύστασης 40 Mm Tris acetate ,1Mm EDTA.
- Προσθήκη 0,001% v/v διαλύματος βρωμιούχου αιθιδίου
- Προστίθεται 1/10 του όγκου της χρωστικής 10X DLB στα δείγματα του DNA και ακολουθεί η τοποθέτησή τους στην πηκτή
- Ηλεκτροφόρηση σε ηλεκτρικό πεδίο στα 90V για διάστημα 40 min.

2.4.3. Ενίσχυση απομονωμένου DNA μυκήτων

Το επόμενο στάδιο της εργασίας περιλάμβανε την ενίσχυση της ITS περιοχής του γονιδιώματος των απομονωθέντων μυκήτων με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR). Κατά την τεχνική αυτή πραγματοποιείται in vitro ενίσχυση επιλεγμένων αλληλουχιών DNA στόχου από ελάχιστες αρχικές ποσότητες δείγματος. Η μέθοδος στηρίζεται στη χρήση ειδικής DNA πολυμεράσης που είναι δραστική σε θερμοκρασίες έως 95⁰C, σε ένα ζεύγος συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων τα οποία ονομάζονται εκκινητικά μόρια (primers), σε κατάλληλο διάλυμα ελεύθερων 5'-τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs), σε κατάλληλη συγκέντρωση διαλύματος MgCl₂, σε ρυθμιστικό διάλυμα Taq πολυμεράσης και σε μικρή ποσότητα DNA μορίου μήτρας. Η PCR πραγματοποιείται σε κύκλους σε ειδικά μηχανήματα που ονομάζονται θερμοκυκλοποιητές. Κάθε κύκλος αποτελείται από επιμέρους στάδια και έχει ως αποτέλεσμα τον εκθετικό πολλαπλασιασμό του DNA-στόχου. Ο κάθε κύκλος περιλαμβάνει το στάδιο αποδιάταξης, σε θερμοκρασίες συνήθως 92-95⁰C για 30 sec, του υβριδισμού στους 50-65⁰C για 1-2min κατά το οποίο οι

εκκινητές υβριδίζονται με τις συμπληρωματικές αλληλουχίες στους δύο κλώνους και του πολυμερισμού στους 70-78⁰C για 1-2⁰C που συντίθεται το DNA.

Η PCR που πραγματοποιήθηκε στη συγκεκριμένη πειραματική εργασία σκόπευε στην ενίσχυση της περιοχής ITS (600kb) όλων των μυκήτων που απομονώθηκαν. Η συγκεκριμένη περιοχή αποτελεί 'barcode' για τη μοριακή ταυτοποίησή των μυκήτων. Οι αλληλουχίες των εκκινητικών μορίων καθώς και τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την PCR παρουσιάζονται στους παρακάτω πίνακες:

Πίνακας 1. Η αλληλουχία των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στην PCR.

Εκκινητής	Αλληλουχία	Tm
ITS1F	5'-CTT GGT CAT TTA GAG GAA GTA A -3'	45.4
ITS4	5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC -3'	49.6

Πίνακας 2. Οι όγκοι και οι συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων της PCR.

Αντιδραστήρια	Όγκος
Buffer (10x optimized)	1 μl
dNTPs (10mM)	2,5μl
Forward primer PsF311 (20pmol/μl)	0,5 μl
Reverse primer PsR1459 (20pmol/μl)	1 μl
Πολυμεράση (1U/μl)	2 μl
DNA	Ml
ddH ₂ O	18,9μl
Συνολικός όγκος	25 μl

Οι συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν για την πραγματοποίηση της PCR παρατίθενται στον πίνακα 3.

Πίνακας 3. Θερμοκυκλοποιητικές συνθήκες PCR ενίσχυσης της ITS περιοχής

Αρχική αποδιάταξη	94 °C	5min	
Αποδιάταξη	94°C	30sec	30 κύκλοι
Υβριδοποίηση	55 °C	30sec	
Επιμήκυνση	72 °C	1min	
Τελική επιμήκυνση	72 °C	10min	

2.4.4. Έλεγχος των προϊόντων PCR

Μετά την ενίσχυση του DNA κάθε μορφολογικά διακριτής αποικίας μυκήτων με την PCR, ακολούθησε ο έλεγχος των προϊόντων της μέσω της ηλεκτροφόρησης σε πηκτής αгарόζης, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω σε πηκτή αгарόζης 1% Για θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε DNA από τον μύκητα *Pleurotus ostreatus*.

2.4.5. Καθαρισμός προϊόντων PCR και ποιοτικός έλεγχός του

Για τον καθαρισμό των προϊόντων PCR από τυχόν διμερή, άλατα ή υπολείμματα εκκινητών χρησιμοποιήθηκε το NucleoSpin gel kit (Macharey-Nagel). Η διαδικασία περιλάμβανε την επαναδιάλυση του DNA σε 30μl υπερκάθαρου, αποστειρωμένου νερού (ddH₂O), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Επιπλέον, επαναλήφθηκε η μέθοδος της ηλεκτροφόρησης για τον έλεγχο των καθαρισμένων πλέον προϊόντων PCR.

2.4.6. Αλληλούχιση των PCR προϊόντων

Το τελευταίο στάδιο για τη μοριακή ταυτοποίηση των δειγμάτων μυκήτων περιλάμβανε την αλληλούχισή των προϊόντων PCR που παραλήφθησαν ύστερα από το στάδιο του καθαρισμού. Η αλληλούχιση πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Ανοσολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Τα δεδομένα αλληλούχισης υποβλήθηκαν σε επεξεργασία χρησιμοποιώντας το λογισμικό Chromas και οι αλληλουχίες που παραλήφθησαν απεστάλλησαν για ομοπαράθεση με τις καταχωρημένες αλληλουχίες της ηλεκτρονικής βάσης δεδομένων χρησιμοποιώντας τοonline Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) tool. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

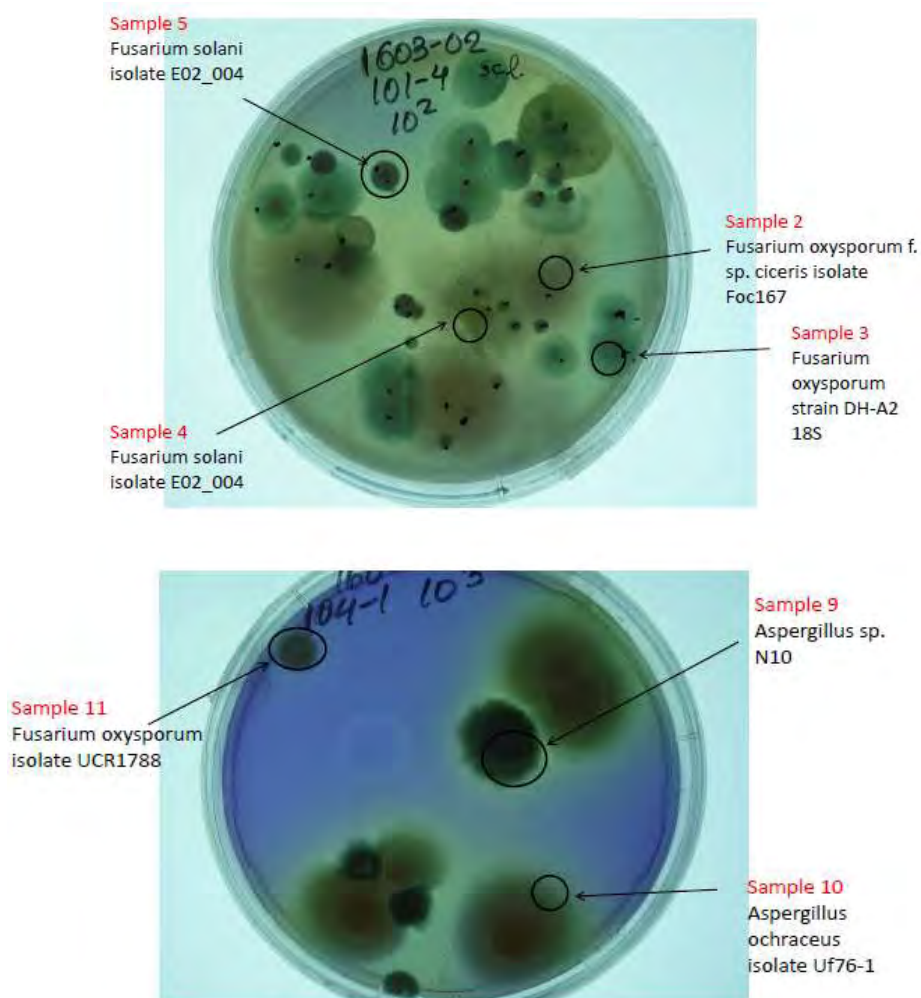
2.5. Εκτίμηση του πληθυσμού των επιλεγμένων μυκήτων στα δείγματα εδάφους

Η ταυτοποίηση των διάφορων γενών μυκήτων στα δείγματα εδάφους που αναλύθηκαν σε προκαταρκτικός στάδιο χρησιμοποιήθηκε ως εργαλείο για την καταμέτρηση των μυκήτων σε κάθε δείγμα εδάφους των αρχικών τεσσάρων κηπευτικών καλλιιεργειών.

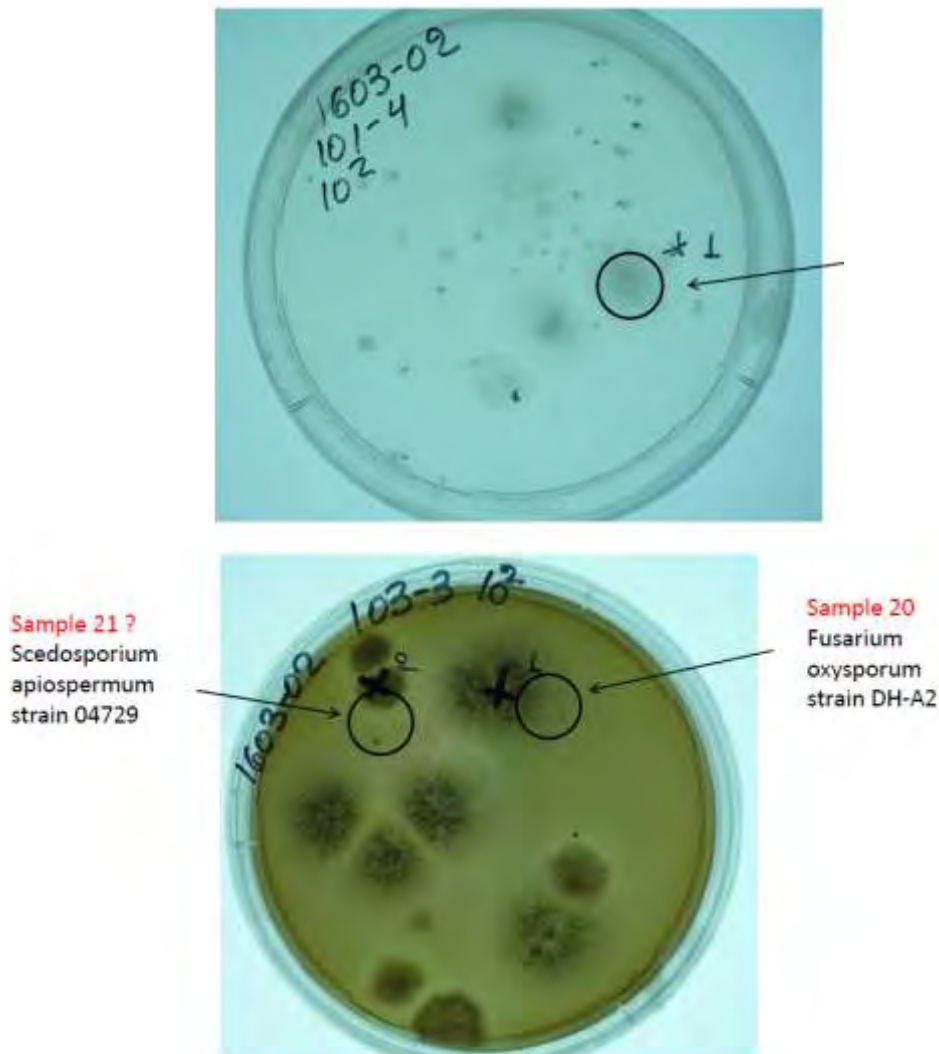
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1. Στερεή καλλιέργεια μυκήτων

Επειδή, όπως αναφέρθηκε, τα θρεπτικά μέσα που περιείχαν τα τρυβλία ήταν και μερικώς και όχι απολύτως εκλεκτικά, επέτρεψαν την ανάπτυξη και άλλων μυκήτων που συσχετίζονται φυλογενετικά με τα τέσσερα γένη μυκήτων που μελετήθηκαν. Για το λόγο αυτό, στην επιφάνεια καθενός από τα τέσσερα είδη τρυβλίων αναπτύσσονταν περισσότερα του ενός γένη μυκήτων, που διακρίνονταν επειδή ήταν μορφολογικά διαφορετικά, όπως φαίνεται από τις παρακάτω εικόνες:



Εικόνες 14, 15: Τρυβλία με εκλεκτικό θρεπτικό μέσο για μύκητες του γένους *Sclerotinia*, επί των οποίων έχουν αναπτυχθεί μορφολογικά διακριτές αποικίες μυκήτων που ανήκουν στα γένη *Fusarium* και *Aspergillus*.



Εικόνα 16, 17: Πάνω εικόνα εμφανίζονται μορφολογικά διακριτές αποικίες μυκήτων που ανήκουν στο γένος *Fusarium* σε τριβλία με εκλεκτικό θρεπτικό μέσο για μύκητες του γένους *Verticillium*. Στη δεύτερη εικόνα εμφανίζονται αποικίες μυκήτων που ανήκουν στα γένη *Fusarium* και *Scedosporium* που αναπτύχθηκαν σε τριβλία με εκλεκτικό θρεπτικό μέσο για μύκητες του γένους *Rhizoctonia*.

3.2. Υγρή καλλιέργεια μυκήτων

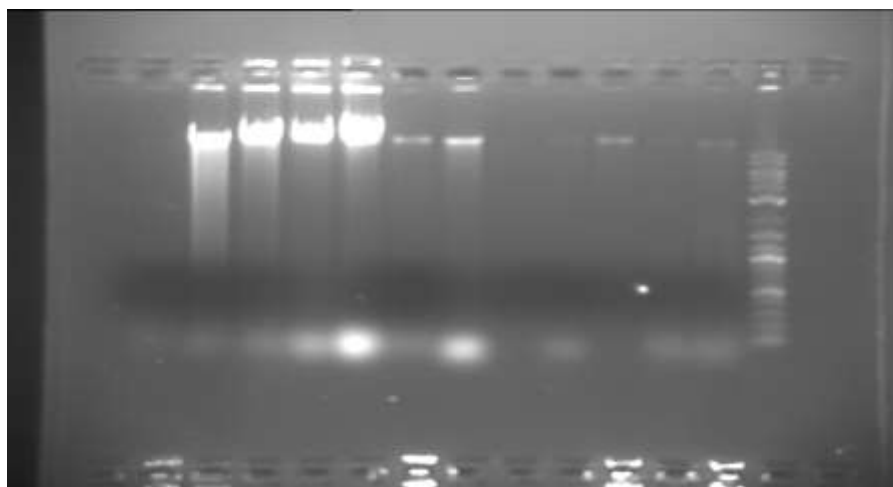
Οι μορφολογικά διακριτές αποικίες που αναπτύχθηκαν στην επιφάνεια των τρυβλίων απομονώθηκαν και ανακαλλιιεργήθηκαν σε υγρό θρεπτικό μέσο PDB. Συγκεκριμένα, απομονώθηκαν 24 διαφορετικές αποικίες οι οποίες καλλιιεργήθηκαν σε φλάσκες. Κάθε αποικία μυκήτων καλλιιεργήθηκε σε μία φλάσκα, οπότε συνολικά η υγρή καλλιιεργεια των μυκήτων αποτελούνταν από 24 φλάσκες (Εικόνα 18).



Εικόνα 18: Υγρές καλλιιεργειες των μυκήτων που απομονώθηκαν από τα αρχικά τρυβλία.

3.3. Απομόνωση του DNA μυκήτων

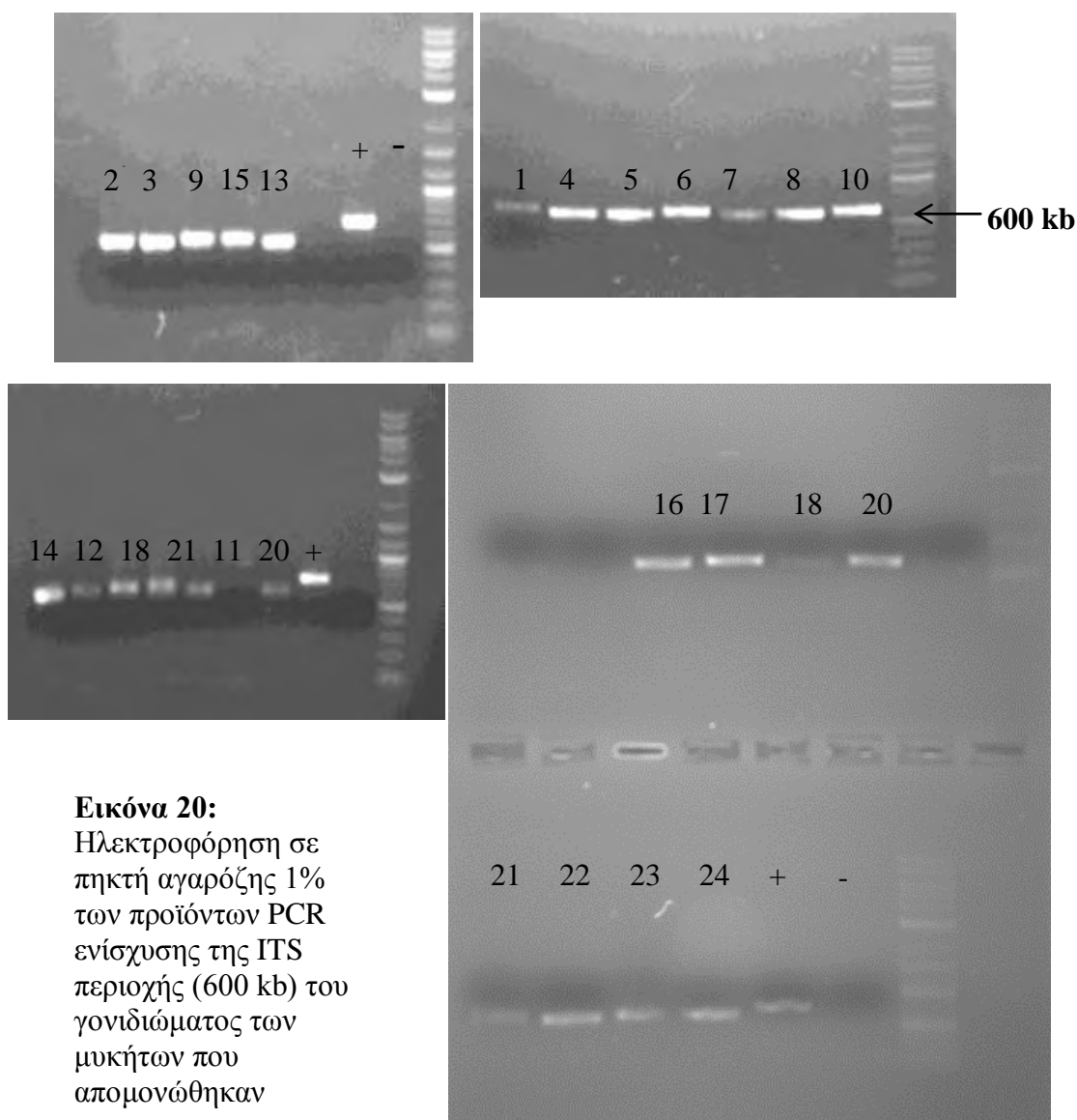
Αφού πραγματοποιήθηκε απομόνωση DNA από καθένα από τους μύκητες με τη μέθοδο CTAB τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης. Στην Εικόνα 19 παρουσιάζονται ενδεικτικά αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης για μερικούς από τους μύκητες.



Εικόνα 19: Ηλεκτροφόρηση DNA από τους μύκητες που επιλέχθηκαν από τα τριβλία και ανακαλλιεργήθηκαν σε υγρές καλλιέργειες σε πηκτή αγαρόζης 1%

3.4. Ενίσχυση του DNA μυκήτων

Η εξαγωγή DNA από τους μύκητες ακολουθήθηκε από ενίσχυση με τη μέθοδο PCR, της ITS περιοχής (600kb) του γονιδιώματος των μυκήτων. Τα προϊόντα PCR που προέκυψαν ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης και τα αποτελέσματα παρατίθενται στην παρακάτω εικόνα.

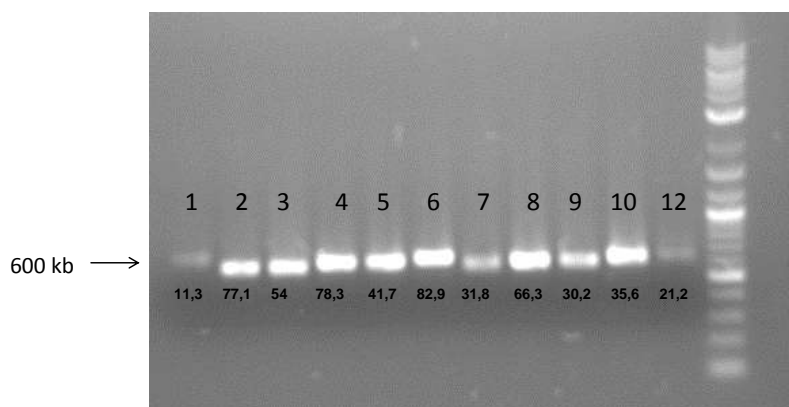


Εικόνα 20:

Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1% των προϊόντων PCR ενίσχυσης της ITS περιοχής (600 kb) του γονιδιώματος των μυκήτων που απομονώθηκαν

3.5. Καθαρισμός των προϊόντων PCR

Τα προϊόντα της PCR καθαρίστηκαν με την χρήση κατάλληλου εμπορικού κιτ όπως έχει ήδη περιγραφεί και στην παρακάτω εικόνα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης των καθαρισμένων πλέον PCR προϊόντων τα οποία απεστάλησαν προς αλληλούχιση.



Εικόνα 21: Ηλεκτροφόρηση καθαρισμένων PCR προϊόντων των δειγμάτων 1-10, 12. Στην εικόνα παρουσιάζεται και η συγκέντρωση dsDNA για το κάθε δείγμα

3.6. Αλληλούχιση των PCR προϊόντων

Τα αποτελέσματα της αλληλούχισης των PCR προϊόντων από τους 24 μύκητες που απομονώθηκαν έδειξαν ότι στελέχη μόνο ενός εκ των τεσσάρων μυκήτων-στόχων αναπτυσσόταν στα θρεπτικά μέσα που χρησιμοποιήθηκαν. Συγκεκριμένα, εντοπίστηκαν στελέχη μόνο από το γένος *Fusarium*. Στον Πίνακα 4 παρατίθενται τα αποτελέσματα από την ομοπαράθεση των αλληλουχιών της ITS περιοχής των μυκήτων που απομονώθηκαν από τα τριβλία στην βιβλιοθήκη δεδομένων NCBI. Έτσι οι μύκητες 2-5, 7, 11, 13, 20, 22-24 (με πορτοκαλί χρώμα στον πίνακα) ταυτοποιήθηκαν ως διαφορετικά στελέχη του γένους *Fusarium*. Ειδικότερα, καταγράφηκαν στελέχη που ανήκουν σε διαφορετικές φυλές του είδους *F. oxysporum* (f.sp *ciceris*, *melonis*, *ranuncluli*) καθώς και στελέχη του είδους *Fusarium solani*. Οι μύκητες 1, 6, 9, 10, 12 και 16 ταυτοποιήθηκαν ως στελέχη του γένους *Aspergillus* (με γαλάζιο χρώμα στον πίνακα) και ειδικότερα ειδών όπως *A. tubingensis* και *A. ochraceous*. Τέλος, οι μύκητες 17, 19 και 21 (με κίτρινο χρώμα στον πίνακα) φαίνεται ότι είναι το ίδιο στέλεχος που παρουσιάζει 100% ομολογία στην αλληλουχία του με στέλεχος του είδους *Scedosporium apiospermum*.

Πίνακας 4: Παρουσίαση των αποτελεσμάτων της αλληλούχισης των 24 δειγμάτων DNA των μυκήτων. Για κάθε δείγμα DNA παρουσιάζονται στην πρώτη στήλη τα πιθανά στελέχη μυκήτων που περιλαμβάνει (το περισσότερο πιθανό στέλεχος εμφανίζεται με έντονα γράμματα), στη δεύτερη ο λόγος αντιστοιχίας ζευγών βάσεων (πόσα ζεύγη βάσεων του ενισχυμένου DNA από κάθε δείγμα αντιστοιχούν στα ζεύγη βάσεων των πιθανών στελεχών του) και στην τρίτη στήλη το ποσοστό ομοιότητας.

DNA 2	Fusarium oxysporum f. sp. ciceris isolate Foc167	509/509	100%
	Fusarium oxysporum genomic DNA	509/509	100%
	Fusarium oxysporum isolate UCR1788	509/509	100%
DNA 7	Fusarium oxysporum f. sp. melonis isolate OTU1080	509/513	99%
	Fusarium sp. WF157	508/513	99%
	Colletotrichum sp. WF154	508/513	99%
DNA 22	Fusarium oxysporum f. sp. ranunculi strain 511_11_2	514/515	99%
	Fusarium sp. WF157	514/515	99%
	Colletotrichum sp. WF154	514/515	99%
	Fusarium oxysporum f. sp. melonis isolate OTU1080	519/521	99%
DNA 3	Fusarium oxysporum strain DH-A2	515/515	100%
	Fusarium oxysporum isolate UCR1788	514/514	100%
	Fusarium oxysporum isolate 225	514/514	100%
DNA 13	Fusarium oxysporum strain DH-A2	524/524	100%
	Fusarium oxysporum strain R1	523/524	99%
	Fusarium oxysporum isolate FOX52	523/524	99%
DNA 20	Uncultured fungus clone PN7B.3	512/513	99%
	Fusarium oxysporum strain DH-A2	512/514	99%
	Fusarium oxysporum isolate UCR1788	511/513	99%
DNA 11	Fusarium oxysporum isolate UCR1788	512/512	100%
	Fusarium oxysporum isolate 225	512/512	100%

	Fusarium oxysporum isolate 392	512/512	100%
DNA 4	Fusarium solani isolate E02_004	536/536	100%
	Fusarium oxysporum isolate 850	536/536	100%
	Uncultured Fusarium sp. clone PM12b	536/536	100%
DNA 5	Fusarium solani isolate E02_004	534/534	100%
	Fusarium solani isolate D02_005	534/534	100%
	Fusarium solani isolate C02_006	534/534	100%
DNA 24	Fusarium solani isolate CY230	542/542	100%
	Fusarium sp. P62	542/543	99%
	Fusarium solani isolate KS-14	542/543	99%
DNA 23	Fusarium sp. ZZF67	527/527	100%
	Gibberella sp. C2-18	526/526	100%
	Gibberella sp. C1-13	526/526	100%

DNA 1	Aspergillus tubingensis strain A2S1_D60	566/570	99%
	Aspergillus niger strain WHAT2 18S	566/570	99%
	Aspergillus tubingensis isolate A4S5_21	565/569	99%
DNA 12	Aspergillus tubingensis isolate A2S1_7	546/546	100%
	Aspergillus tubingensis isolate A4S5_21	545/546	99%
	Aspergillus tubingensis isolate A3S6_2	545/546	99%
DNA 6	Aspergillus ochraceus isolate Uf76-1	560/561	99%
	Aspergillus ochraceus strain A-3280	558/559	99%
	Aspergillus ochraceus isolate SH0701	558/559	99%
DNA 16	Aspergillus ochraceus strain A-3280	543/543	100%
	Aspergillus ochraceus isolate SH0701	543/543	100%
	Aspergillus ochraceus strain 91902	543/543	100%
DNA 10	Aspergillus ochraceus isolate Uf76-1	559/559	100%

	Aspergillus ochraceus strain A-3280	560/563	99%
	Aspergillus ochraceus isolate SH0701	560/563	99%
DNA 9	Aspergillus sp. N10	543/543	100%
	Emericella sp. AUMC 6937	542/543	99%
	Uncultured fungus clone L046938-122-076-A12-unis	543/544	99%

DNA 17	Scedosporium apiospermum strain 04729	523/523	100%
	Pseudallescheria boydii isolate VA 103543	523/523	100%
	Scedosporium apiospermum 18S rRNA	522/522	100%
DNA 19	Pseudallescheria boydii isolate VA	588/589	99%
	Scedosporium apiospermum strain 04729	582/583	99%
	Scedosporium apiospermum	588/592	99%
DNA 21	Scedosporium apiospermum strain 04729	421/428	98%
	Pseudallescheria boydii isolate VA 103543	421/428	98%
	Scedosporium apiospermum strain FMR 8535	419/426	98%

3.7. Εκτίμηση του πληθυσμού των επιλεγμένων φυτοπαθογόνων μυκήτων

Μετά την ταυτοποίηση των μυκήτων που αναπτύχθηκαν στα θρεπτικά μέσα στο πλαίσιο της προκαταρκτική αξιολόγησης της εκλεκτικότητας τους, ακολούθησε ανάλυση όλων των δειγμάτων στα επιλεγέντα θρεπτικά μέσα και καταμέτρησή των πληθυσμών τους με την μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων. Στους παρακάτω πίνακες παρουσιάζονται αναλυτικά οι πληθυσμοί των μυκήτων όλων των δειγμάτων για κάθε καλλιέργεια κηπευτικών αναλυτικά. Θα πρέπει να τονιστεί ότι παρά το γεγονός ότι στην αρχική ταυτοποίηση των μορφολογικά διαφοροποιημένων μυκήτων που προέκυψαν στον προκαταρκτικό έλεγχο δεν ανιχνεύθηκαν στελέχη των μυκήτων *Verticillium*, *Rhizoctonia*, *Sclerotinia* πραγματοποιήθηκε επίστρωση όλων των δειγμάτων στα αντίστοιχα θρεπτικά μέσα και έλεγχος για την ανάπτυξη αποικιών που διαφοροποιούνταν από τους ήδη ταυτοποιημένους μύκητες. Παρόλα αυτά σε καμία περίπτωση δεν ανιχνεύθηκαν νέες μορφολογικά διαφορετικές αποικίες μυκήτων στα υπόλοιπα δείγματα. Συνοπτικά, στα δείγματα εδάφους που συλλέχθηκαν από καλλιέργεια αγγουριάς παρατηρήθηκαν πληθυσμοί μυκήτων του γένους *Aspergillus* και *Fusarium* που κυμάνθηκαν από 1000 ως 96000 cfu/g εδάφους και από 1000 ως 44000 cfu/g εδάφους αντίστοιχα. Ανάλογα στα δείγματα εδάφους που συλλέχθηκαν από καλλιέργεια φράουλας παρατηρήθηκαν πληθυσμοί μυκήτων του γένους *Aspergillus* και *Fusarium* που κυμάνθηκαν από 2000 ως 10000 cfu/g εδάφους και από 2100 ως 34000 cfu/g εδάφους αντίστοιχα. Ανάλογα στα δείγματα εδάφους που συλλέχθηκαν από καλλιέργεια τομάτας παρατηρήθηκαν πληθυσμοί μυκήτων του γένους *Aspergillus* και *Fusarium* που κυμάνθηκαν από 1700 ως 45000 cfu/g εδάφους και από 4000 ως 40000 αντίστοιχα. Τέλος στα δείγματα εδάφους που συλλέχθηκαν από καλλιέργεια πιπεριάς παρατηρήθηκαν πληθυσμοί μυκήτων του γένους *Aspergillus* και *Fusarium* που κυμάνθηκαν από 2000 ως 42000 cfu/g εδάφους και από 6000 ως 44000 αντίστοιχα

Πίνακας 5: Εκτίμηση του πληθυσμού των διαφόρων μυκήτων σε 48 δείγματα εδάφους καλλιέργειας αγγουριάς. Κάθε τιμή είναι ο μέσος όρος δύο επαναλήψεων ανά αραιώση ± την τυπική απόκλιση.

No	Κωδικός δείγματος	Γένος μυκήτων (cfu/g εδάφους)				
		<i>Aspergillus</i> ^a	<i>Fusarium</i> ^b	<i>Verticillium</i>	<i>Rhizoctonia</i>	<i>Sclerotinia</i>
1	101-4	1.4x10 ⁴ ± 7.5x10 ³	2.2x10 ⁴ ± 9.6x10 ³	0	0	0
2	102-2	1x10 ³ ± 0	1x10 ³ ± 0	0	0	0
3	103-3	0	7x10 ³ ± 2.8x10 ³	0	0	0
4	104-1	2.6x10 ⁴ ± 1.3x10 ⁴	1.8x10 ⁴ ± 4.9x10 ³	0	0	0
5	201-2	0	2.3x10 ³ ± 1.5x10 ³	0	0	0
6	303-2	4x10 ³ ± 1.4x10 ³	3.6x10 ⁴ ± 2.1x10 ⁴	0	0	0
7	202-4	2x10 ³ ± 0	6.3x10 ³ ± 2.1x10 ³	0	0	0

8	203-1	$2.7 \times 10^3 + 1.5 \times 10^3$	$1.2 \times 10^4 + 4 \times 10^3$	0	0	0
9	301-4	$4.3 \times 10^3 + 1.5 \times 10^3$	$1.3 \times 10^4 + 4 \times 10^3$	0	0	0
10	204-3	$3.5 \times 10^3 + 2.1 \times 10^3$	$8.7 \times 10^3 + 3.8 \times 10^3$	0	0	0
11	302-3	$2 \times 10^3 + 0$	$8.3 \times 10^3 + 3.1 \times 10^3$	0	0	0
12	304-1	$5.3 \times 10^3 + 1.5 \times 10^3$	$2.1 \times 10^4 + 1 \times 10^4$	0	0	0
13	401-2	$2 \times 10^3 + 0$	$1.9 \times 10^4 + 2.6 \times 10^3$	0	0	0
14	402-4	$3 \times 10^3 + 1 \times 10^3$	$1.8 \times 10^4 + 7.9 \times 10^3$	0	0	0
15	403-1	$9.3 \times 10^3 + 3.8 \times 10^3$	$1.9 \times 10^4 + 1.1 \times 10^4$	0	0	0
16	404-3	$5.5 \times 10^3 + 2.1 \times 10^3$	$6 \times 10^3 + 1 \times 10^3$	0	0	0
17	Tr1-1	$3.6 \times 10^4 + 9.5 \times 10^3$	$3.8 \times 10^4 + 1.6 \times 10^4$	0	0	0
18	Tr1-2	$2.1 \times 10^4 + 4.9 \times 10^3$	$2.8 \times 10^4 + 8.5 \times 10^3$	0	0	0
19	Tr1-3	$1.2 \times 10^4 + 4 \times 10^3$	$4.4 \times 10^4 + 1 \times 10^4$	0	0	0
20	Tr1-4	$2.3 \times 10^4 + 4.7 \times 10^3$	$3.6 \times 10^4 + 2.1 \times 10^4$	0	0	0
21	Tr2-1	$8 \times 10^3 + 3.6 \times 10^3$	$4.1 \times 10^4 + 6.1 \times 10^3$	0	0	0
22	Tr2-2	$2 \times 10^3 + 0$	$4 \times 10^4 + 4 \times 10^3$	0	0	0
23	Tr2-3	$4 \times 10^3 + 1 \times 10^3$	$2.8 \times 10^4 + 7.1 \times 10^3$	0	0	0
24	Tr2-4	$5 \times 10^3 + 1 \times 10^3$	$2.2 \times 10^4 + 3.8 \times 10^3$	0	0	0
25	Tr3-1	$8.3 \times 10^3 + 3.8 \times 10^3$	$3.3 \times 10^4 + 1.3 \times 10^4$	0	0	0
26	Tr3-2	$1.5 \times 10^4 + 2.1 \times 10^3$	$2.1 \times 10^4 + 3.1 \times 10^4$	0	0	0
27	Tr3-3	$3 \times 10^3 + 1.4 \times 10^3$	$2.9 \times 10^4 + 3.5 \times 10^3$	0	0	0
28	Tr3-4	$6.3 \times 10^3 + 3.2 \times 10^3$	$2.2 \times 10^4 + 8.2 \times 10^3$	0	0	0
29	Tr4-1	$5.5 \times 10^3 + 2.1 \times 10^3$	$1.8 \times 10^4 + 2.1 \times 10^3$	0	0	0
30	Tr4-2	$8.8 \times 10^4 + 3.5 \times 10^3$	$1.1 \times 10^4 + 1.4 \times 10^3$	0	0	0
31	Tr4-3	$6.1 \times 10^4 + 1.2 \times 10^4$	$1.4 \times 10^4 + 5.7 \times 10^3$	0	0	0
32	Tr4-4	$9.6 \times 10^4 + 3.5 \times 10^3$	$3.9 \times 10^4 + 9.2 \times 10^3$	0	0	0
33	153	$1,5 \times 10^3 + 7,1 \times 10^2$	$1,7 \times 10^4 + 6,4 \times 10^3$	0	0	0
34	156	$5,5 \times 10^3 + 6,4 \times 10^3$	$2,2 \times 10^4 + 1,1 \times 10^4$	0	0	0

35	159	$5,5 \times 10^3 \pm 2,1 \times 10^3$	$3,6 \times 10^4 \pm 2,8 \times 10^3$	0	0	0
36	162	$1,0 \times 10^3 \pm 0$	$2,0 \times 10^4 \pm 7,1 \times 10^2$	0	0	0
37	168	$5,5 \times 10^3 \pm 7,1 \times 10^2$	$3,0 \times 10^4 \pm 1,2 \times 10^4$	0	0	0
38	171	$5,0 \times 10^3 \pm 0$	$2,0 \times 10^4 \pm 7,1 \times 10^2$	0	0	0
39	174	$3,0 \times 10^3 \pm 2,8 \times 10^3$	$1,9 \times 10^4 \pm 4,9 \times 10^3$	0	0	0
40	180	$7,5 \times 10^3 \pm 7,1 \times 10^2$	$2,0 \times 10^4 \pm 7,8 \times 10^3$	0	0	0
41	186	$2,0 \times 10^3 \pm 0$	$2,7 \times 10^4 \pm 7,1 \times 10^3$	0	0	0
42	189	$7,5 \times 10^3 \pm 2,1 \times 10^3$	$3,0 \times 10^4 \pm 2,8 \times 10^3$	0	0	0
43	192	$5,0 \times 10^3 \pm 1,4 \times 10^3$	$3,0 \times 10^4 \pm 6,4 \times 10^3$	0	0	0
44	195	$3,0 \times 10^3 \pm 0$	$1,6 \times 10^4 \pm 9,2 \times 10^3$	0	0	0
45	198	$2,0 \times 10^3 \pm 1,4 \times 10^3$	$1,2 \times 10^4 \pm 3,5 \times 10^3$	0	0	0
46	204	$3,0 \times 10^3 \pm 1,4 \times 10^3$	$2,1 \times 10^4 \pm 2,3 \times 10^4$	0	0	0
47	207	$2,5 \times 10^3 \pm 7,1 \times 10^2$	$2,5 \times 10^4 \pm 2,8 \times 10^3$	0	0	0
48	210	$2,0 \times 10^3 \pm 0$	$2,9 \times 10^4 \pm 7,1 \times 10^3$	0	0	0

Πίνακας 6: Εκτίμηση του πληθυσμού των διαφόρων μυκήτων σε 32 δείγματα εδάφους καλλιέργειας φράουλας. Κάθε τιμή είναι ο μέσος όρος δύο επαναλήψεων ανά αραίωση \pm την τυπική απόκλιση.

No	Κωδικός δείγματος	Γένος μυκήτων (cfu/g εδάφους)				
		Aspergillus	Fusarium	Verticillium	Rhizoctonia	Sclerotinia
1	101-1	$3,0 \times 10^3 \pm 0$	$4,0 \times 10^3 \pm 2,0 \times 10^3$	0	0	0
2	102-4	$3,0 \times 10^3 \pm 0$	$2,1 \times 10^4 \pm 2,6 \times 10^3$	0	0	0
3	103-2	$4,0 \times 10^3 \pm 2,0 \times 10^3$	$1,4 \times 10^4 \pm 2,6 \times 10^3$	0	0	0
4	104-3	$1 \times 10^4 \pm 0$	$5,7 \times 10^4 \pm 4,4 \times 10^4$	0	0	0
5	201-3	$7,7 \times 10^3 \pm 3,1 \times 10^3$	$1,2 \times 10^5 \pm 7,3 \times 10^4$	0	0	0
6	202-2	0	$2,0 \times 10^4 \pm 0$	0	0	0
7	203-4	$3,0 \times 10^3 \pm 0$	$1,2 \times 10^4 \pm 6,4 \times 10^3$	0	0	0

8	204-1	0	$4 \times 10^3 \pm 0$	0	0	0
9	301-1	$4 \times 10^3 \pm 0$	$8,5 \times 10^3 \pm 7,1 \times 10^2$	0	0	0
10	302-4	$7,5 \times 10^3 \pm 2,1 \times 10^3$	$4,5 \times 10^3 \pm 7,1 \times 10^2$	0	0	0
11	303-3	$5 \times 10^3 \pm 0$	$2,0 \times 10^4 \pm 2,4 \times 10^4$	0	0	0
12	304-2	$4 \times 10^3 \pm 0$	$4,0 \times 10^3 \pm 1,4 \times 10^3$	0	0	0
13	401-3	$4,5 \times 10^3 \pm 2,1 \times 10^3$	$3,4 \times 10^4 \pm 7,1 \times 10^3$	0	0	0
14	402-2	$1 \times 10^3 \pm 0$	$2,3 \times 10^4 \pm 2,3 \times 10^4$	0	0	0
15	403-4	0	$7,5 \times 10^3 \pm 7,1 \times 10^2$	0	0	0
16	404-1	$8,0 \times 10^3 \pm 0$	$7,0 \times 10^3 \pm 7,1 \times 10^3$	0	0	0
17	101-4 (0DBA)	0	$7,0 \times 10^3 \pm 1,4 \times 10^3$	0	0	0
18	102-2	$4,0 \times 10^3 \pm 0$	$7,5 \times 10^3 \pm 7,1 \times 10^2$	0	0	0
19	103-3	$2,0 \times 10^3 \pm 0$	$9,0 \times 10^3 \pm 4,2 \times 10^3$	0	0	0
20	104-1	$5,0 \times 10^3 \pm 0$	$1,1 \times 10^4 \pm 7,1 \times 10^2$	0	0	0
21	201-2	0	$8,0 \times 10^3 \pm 2,8 \times 10^3$	0	0	0
22	202-4	$4,0 \times 10^3 \pm 0$	$6,0 \times 10^3 \pm 5,7 \times 10^3$	0	0	0
23	203-1	$3,0 \times 10^3 \pm 0$	$6,5 \times 10^3 \pm 7,1 \times 10^2$	0	0	0
24	204-3	$6,0 \times 10^3 \pm 0$	$1,4 \times 10^4 \pm 8,5 \times 10^3$	0	0	0
25	301-4	$2,0 \times 10^3 \pm 0$	$5,0 \times 10^3 \pm 0$	0	0	0
26	302-3	0	$7,0 \times 10^3 \pm 2,8 \times 10^3$	0	0	0
27	303-2	$4,5 \times 10^3 \pm 2,1 \times 10^3$	$9,5 \times 10^3 \pm 7,1 \times 10^2$	0	0	0
28	304-1	$3,5 \times 10^3 \pm 7,1 \times 10^2$	$2,3 \times 10^4 \pm 7,1 \times 10^3$	0	0	0
29	401-2	$3,5 \times 10^3 \pm 2,1 \times 10^3$	$7,5 \times 10^3 \pm 7,1 \times 10^2$	0	0	0
30	402-4	$2,0 \times 10^3 \pm 0$	$1,4 \times 10^4 \pm 1,4 \times 10^3$	0	0	0
31	403-1	$3,0 \times 10^3 \pm 0$	$1,5 \times 10^4 \pm 5,7 \times 10^3$	0	0	0
32	404-3	$3,0 \times 10^3 \pm 0$	$1,7 \times 10^4 \pm 6,4 \times 10^3$	0	0	0

Πίνακας 7: Εκτίμηση του πληθυσμού των διαφόρων μυκήτων σε 31 δείγματα εδάφους καλλιέργειας τομάτας. Κάθε τιμή είναι ο μέσος όρος δύο επαναλήψεων ανά αραίωση \pm την τυπική απόκλιση.

No	Κωδικός Δείγματος	Γένος μυκήτων (cfu/g εδάφους)				
		Aspergillus	Fusarium	Verticillium	Rhizoctonia	Sclerotinia
1	1.1	$2,7 \times 10^3 \pm 2,1 \times 10^3$	$2,2 \times 10^4 \pm 2,1 \times 10^4$	0	0	0
2	1.2	$4 \times 10^3 \pm 0$	$1,4 \times 10^4 \pm 5,9 \times 10^3$	0	0	0
3	1.3	$3,0 \times 10^3 \pm 1,7 \times 10^3$	$1,2 \times 10^4 \pm 3,1 \times 10^3$	0	0	0
4	2.1	$5,0 \times 10^3 \pm 1,4 \times 10^3$	$2,2 \times 10^4 \pm 1,3 \times 10^4$	0	0	0
5	2.2	$3,0 \times 10^3 \pm 0$	$2,0 \times 10^4 \pm 8,9 \times 10^3$	0	0	0
6	2.3	$1,7 \times 10^3 \pm 1,2 \times 10^3$	$8,7 \times 10^3 \pm 5,5 \times 10^3$	0	0	0
7	2.4	$2,5 \times 10^3 \pm 7,1 \times 10^2$	$4,0 \times 10^3 \pm 1,7 \times 10^3$	0	0	0
8	3.1	$6,0 \times 10^3 \pm 0$	$1,7 \times 10^4 \pm 1,5 \times 10^4$	0	0	0
9	3.2	$5,0 \times 10^3 \pm 3,6 \times 10^3$	$2,1 \times 10^4 \pm 1,3 \times 10^4$	0	0	0
10	3.3	$3,0 \times 10^3 \pm 1,0 \times 10^3$	$8,0 \times 10^3 \pm 3,6 \times 10^3$	0	0	0
11	3.4	$5,0 \times 10^3 \pm 2,8 \times 10^3$	$2,7 \times 10^4 \pm 1,4 \times 10^4$	0	0	0
12	4.1	$3,0 \times 10^3 \pm 1,7 \times 10^3$	$9,7 \times 10^3 \pm 6,1 \times 10^3$	0	0	0
13	4.2	$1,7 \times 10^3 \pm 5,8 \times 10^2$	$1,1 \times 10^4 \pm 1,2 \times 10^4$	0	0	0
14	4.3	$2,3 \times 10^3 \pm 5,8 \times 10^2$	$1,3 \times 10^4 \pm 1,1 \times 10^4$	0	0	0
15	4.4	$2,3 \times 10^3 \pm 5,8 \times 10^2$	$1,0 \times 10^4 \pm 5,6 \times 10^3$	0	0	0
16	Tr1-1	$1,8 \times 10^4 \pm 5,7 \times 10^3$	$3,4 \times 10^4 \pm 7,1 \times 10^2$	0	0	0
17	Tr1-2	$3,1 \times 10^4 \pm 2,1 \times 10^3$	$3,9 \times 10^4 \pm 6,4 \times 10^3$	0	0	0
18	Tr1-3	$4,5 \times 10^4 \pm 4,9 \times 10^3$	$3,1 \times 10^4 \pm 2,8 \times 10^3$	0	0	0
19	Tr1-4	$2,1 \times 10^4 \pm 5,7 \times 10^3$	$2,4 \times 10^4 \pm 3,5 \times 10^3$	0	0	0
20	Tr2-1	$3,0 \times 10^4 \pm 2,1 \times 10^3$	$3,0 \times 10^4 \pm 5,7 \times 10^3$	0	0	0
21	Tr2-2	$2,2 \times 10^4 \pm 1,4 \times 10^3$	$2,2 \times 10^4 \pm 3,5 \times 10^3$	0	0	0
22	Tr2-3	$2,7 \times 10^4 \pm 1,4 \times 10^3$	$3,7 \times 10^4 \pm 2,1 \times 10^3$	0	0	0

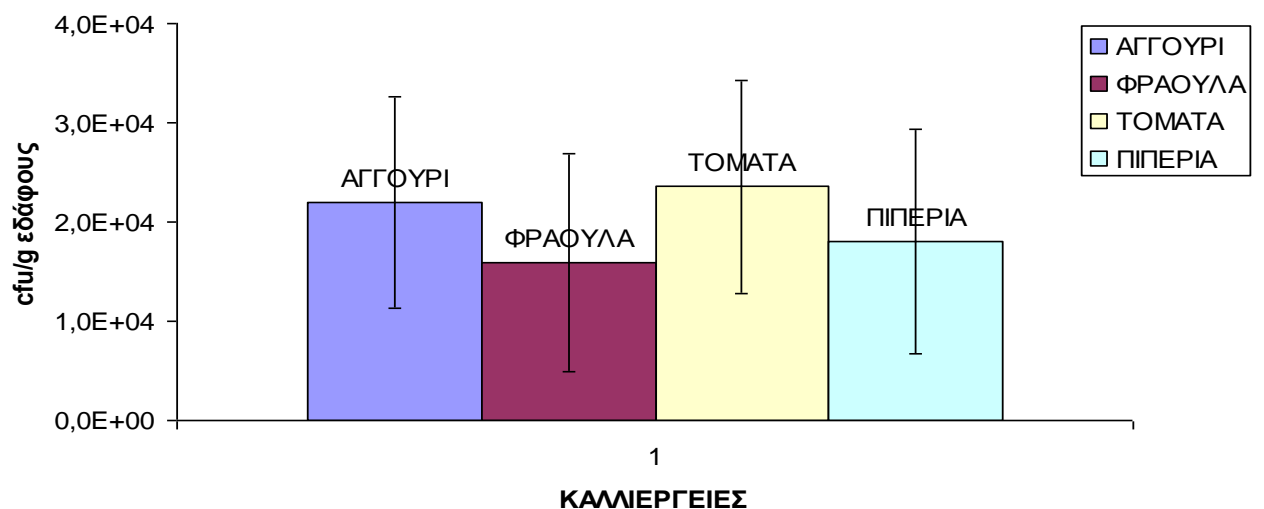
23	Tr2-4	$2,7 \times 10^4 \pm 2,1 \times 10^3$	$3,1 \times 10^4 \pm 9,2 \times 10^3$	0	0	0
24	Tr3-1	$1,7 \times 10^4 \pm 5,7 \times 10^3$	$2,5 \times 10^4 \pm 7,8 \times 10^3$	0	0	0
25	Tr3-2	$2,4 \times 10^4 \pm 1,4 \times 10^3$	$4,0 \times 10^4 \pm 5,7 \times 10^3$	0	0	0
26	Tr3-3	$3,2 \times 10^4 \pm 4,2 \times 10^3$	$3,9 \times 10^4 \pm 1,4 \times 10^3$	0	0	0
27	Tr3-4	$2,7 \times 10^4 \pm 6,4 \times 10^3$	$2,4 \times 10^4 \pm 3,5 \times 10^3$	0	0	0
28	Tr4-1	$1,6 \times 10^4 \pm 7,1 \times 10^3$	$3,2 \times 10^4 \pm 7,1 \times 10^2$	0	0	0
29	Tr4-2	$3,0 \times 10^4 \pm 1,1 \times 10^4$	$3,4 \times 10^4 \pm 7,1 \times 10^2$	0	0	0
30	Tr4-3	$3,1 \times 10^4 \pm 2,1 \times 10^3$	$3,9 \times 10^4 \pm 6,4 \times 10^3$	0	0	0
31	Tr4-4	$1,8 \times 10^4 \pm 7,1 \times 10^2$	$3,1 \times 10^4 \pm 2,8 \times 10^3$	0	0	0

Πίνακας 8: Εκτίμηση του πληθυσμού των διαφόρων μυκήτων σε 32 δείγματα εδάφους καλλιέργειας πιπεριάς. Κάθε τιμή είναι ο μέσος όρος δύο επαναλήψεων ανά αραιώση \pm την τυπική απόκλιση.

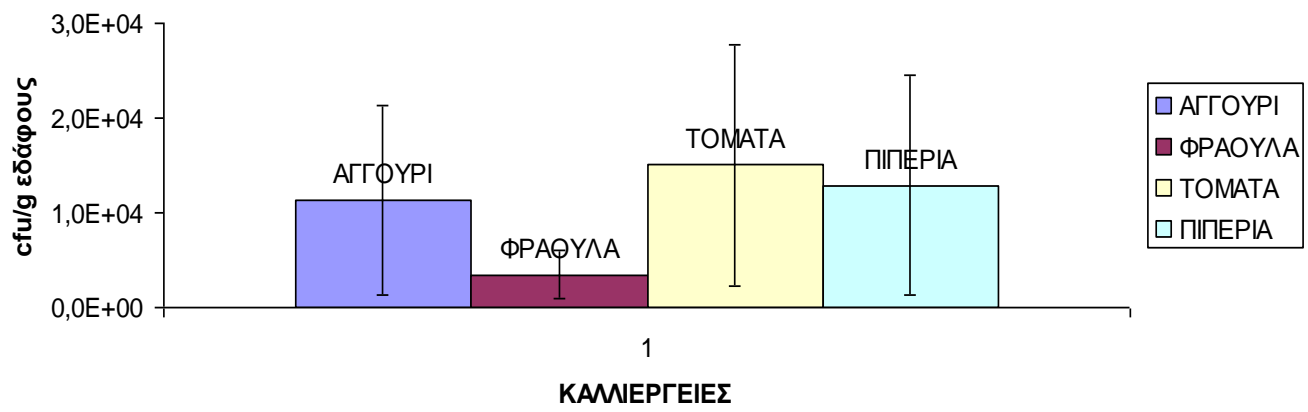
No	Κωδικός Δείγματος	Γένος μυκήτων (cfu/g έδαφους)				
		Aspergillus	Fusarium	Verticillium	Rhizoctonia	Sclerotinia
1	1.1	$2,5 \times 10^3 \pm 2,1 \times 10^3$	$1,1 \times 10^4 \pm 6,0 \times 10^3$	0	0	0
2	1.2	$2,0 \times 10^3 \pm 1,0 \times 10^3$	$1,1 \times 10^4 \pm 5,6 \times 10^3$	0	0	0
3	1.3	$4,3 \times 10^3 \pm 1,5 \times 10^3$	$8,5 \times 10^3 \pm 3,5 \times 10^3$	0	0	0
4	1.4	$2,5 \times 10^3 \pm 7,1 \times 10^2$	$6,0 \times 10^3 \pm 3,6 \times 10^3$	0	0	0
5	2.1	$3,0 \times 10^3 \pm 0$	$7,3 \times 10^3 \pm 2,3 \times 10^3$	0	0	0
6	2.2	$5,0 \times 10^3 \pm 1,0 \times 10^3$	$1,3 \times 10^4 \pm 6,4 \times 10^3$	0	0	0
7	2.3	$5,0 \times 10^3 \pm 3,5 \times 10^3$	$1,2 \times 10^4 \pm 6,1 \times 10^3$	0	0	0
8	2.4	$2,7 \times 10^3 \pm 1,2 \times 10^3$	$8,3 \times 10^3 \pm 5,1 \times 10^3$	0	0	0
9	3.1	$3,5 \times 10^3 \pm 7,1 \times 10^2$	$1,2 \times 10^4 \pm 6,6 \times 10^3$	0	0	0
10	3.2	$2,5 \times 10^3 \pm 2,1 \times 10^3$	$9,0 \times 10^3 \pm 7,5 \times 10^3$	0	0	0

11	3.3	$3,7 \times 10^3 \pm 5,8 \times 10^2$	$1,3 \times 10^4 \pm 2,6 \times 10^3$	0	0	0
12	3.4	$5,3 \times 10^3 \pm 2,1 \times 10^3$	$9,7 \times 10^3 \pm 6,7 \times 10^3$	0	0	0
13	4.1	$2,7 \times 10^3 \pm 1,5 \times 10^3$	$1,5 \times 10^4 \pm 3,5 \times 10^3$	0	0	0
14	4.2	$3,0 \times 10^3 \pm 1,7 \times 10^3$	$1,3 \times 10^4 \pm 4,6 \times 10^3$	0	0	0
15	4.3	$3,0 \times 10^3 \pm 1,7 \times 10^3$	$1,0 \times 10^4 \pm 4,0 \times 10^3$	0	0	0
16	4.4	$2,0 \times 10^3 \pm 1,0 \times 10^3$	$6,0 \times 10^3 \pm 1,0 \times 10^3$	0	0	0
17	Tr1-1	$3,0 \times 10^4 \pm 2,5 \times 10^4$	$4,4 \times 10^4 \pm 2,3 \times 10^4$	0	0	0
18	Tr1-2	$1,9 \times 10^4 \pm 1,3 \times 10^4$	$2,5 \times 10^4 \pm 1,6 \times 10^4$	0	0	0
19	Tr1-3	$2,2 \times 10^4 \pm 1,6 \times 10^4$	$2,5 \times 10^4 \pm 1,2 \times 10^4$	0	0	0
20	Tr1-4	$1,6 \times 10^4 \pm 1,1 \times 10^4$	$1,4 \times 10^4 \pm 3,5 \times 10^3$	0	0	0
21	Tr2-1	$2,1 \times 10^4 \pm 1,6 \times 10^4$	$2,3 \times 10^4 \pm 1,4 \times 10^4$	0	0	0
22	Tr2-2	$3,6 \times 10^4 \pm 1,9 \times 10^4$	$2,6 \times 10^4 \pm 1,3 \times 10^4$	0	0	0
23	Tr2-3	$1,4 \times 10^4 \pm 7,1 \times 10^3$	$2,0 \times 10^4 \pm 1,6 \times 10^3$	0	0	0
24	Tr2-4	$1,1 \times 10^4 \pm 7,8 \times 10^3$	$1,2 \times 10^4 \pm 8,5 \times 10^3$	0	0	0
25	Tr3-1	$3,7 \times 10^4 \pm 8,5 \times 10^3$	$2,9 \times 10^4 \pm 2,3 \times 10^4$	0	0	0
26	Tr3-2	$2,0 \times 10^4 \pm 1,9 \times 10^4$	$1,5 \times 10^4 \pm 9,2 \times 10^3$	0	0	0
27	Tr3-3	$4,2 \times 10^4 \pm 1,3 \times 10^4$	$5,7 \times 10^4 \pm 3,6 \times 10^4$	0	0	0
28	Tr3-4	$2,0 \times 10^4 \pm 1,2 \times 10^4$	$2,5 \times 10^4 \pm 1,5 \times 10^4$	0	0	0
29	Tr4-1	$1,7 \times 10^4 \pm 1,3 \times 10^4$	$2,7 \times 10^4 \pm 2,2 \times 10^4$	0	0	0
30	Tr4-2	$2,1 \times 10^4 \pm 1,1 \times 10^4$	$2,5 \times 10^4 \pm 1,6 \times 10^4$	0	0	0
31	Tr4-3	$2,0 \times 10^4 \pm 1,8 \times 10^4$	$3,1 \times 10^4 \pm 1,6 \times 10^4$	0	0	0
32	Tr4-4	$1,3 \times 10^4 \pm 1,5 \times 10^4$	$1,4 \times 10^4 \pm 7,8 \times 10^3$	0	0	0

Διάγραμμα 1: Παρουσίαση της εκτίμησης του πληθυσμού του μύκητα *Fusarium* σε εδάφη από διάφορες κηπευτικές καλλιέργειες όπου παρατηρείται και στις τέσσερις καλλιέργειες υψηλό φορτίο του συγκεκριμένου μύκητα.



Διάγραμμα 2: Παρουσίαση της εκτίμησης του πληθυσμού του μύκητα *Aspergillus* σε εδάφη από διάφορες κηπευτικές καλλιέργειες όπου παρατηρείται και στις τέσσερις καλλιέργειες υψηλό φορτίο του συγκεκριμένου μύκητα.

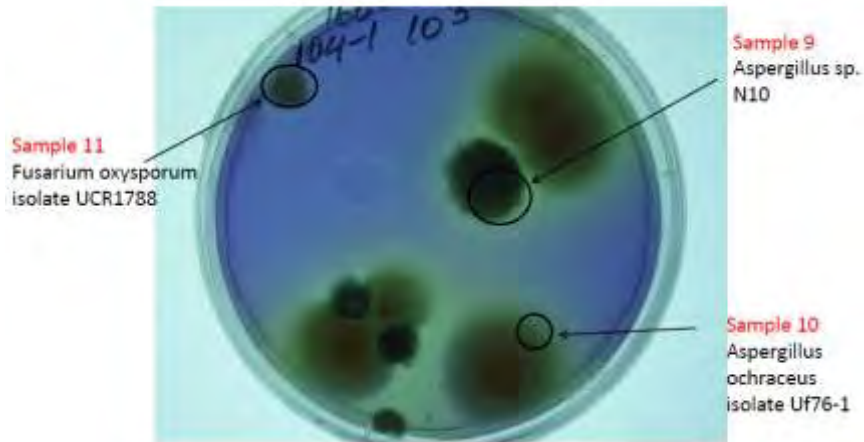


4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η συγκεκριμένη διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε με σκοπό την καταμέτρηση του πληθυσμού εδαφογενών μυκήτων που ανήκουν στα γένη *Fusarium*, *Verticillium*, *Sclerotinia* και *Rhizoctonia* σε δείγματα εδάφους που συλλέχθηκαν από καλλιέργειες πιπεριάς, τομάτας, φράουλας και αγγουριού. Καθώς στα τέσσερα αυτά γένη συμπεριλαμβάνονται μύκητες που αποτελούν παθογόνα ιδιαίτερης σημασίας για τις φυτικές καλλιέργειες, η εκτίμηση του πληθυσμού τους μπορεί να αποτελέσει εργαλείο εκτίμησης του μολυσματικού δυναμικού των συγκεκριμένων μυκήτων στο έδαφος και κατ'επέκταση εκτίμησης της πιθανότητας εμφάνισης μυκητολογικής προσβολής από τους συγκεκριμένους μύκητες στις αντίστοιχες καλλιέργειες κηπευτικών ειδών.

Λόγω του γεγονότος ότι η καταμέτρηση του πληθυσμού των συγκεκριμένων μυκήτων πραγματοποιήθηκε σε μερικώς εκλεκτικά θρεπτικά μέσα επιλέχθηκε να εξεταστεί σε προκαταρκτικές αναλύσεις η ταυτότητα των μυκήτων που αναπτύσσονται στα επιλεγμένα θρεπτικά μέσα ώστε να είμαστε απολύτως ακριβείς στην καταμέτρηση των πληθυσμών των επιλεγμένων μυκήτων. Η ταυτοποίηση των διαφόρων στελεχών μυκήτων πραγματοποιήθηκε με αλληλούχιση της ITS περιοχής του γονιδιώματος των μυκήτων που θεωρείται η πιο αντιπροσωπευτική για την καλύτερη ταυτοποίηση των μυκήτων (Schoch et al., 2012). Τα αποτελέσματα της ταυτοποίησης των μυκήτων έδειξαν ότι τα θρεπτικά μέσα στα οποία έγινε η καταμέτρηση του πληθυσμού των φυτοπαθογόνων μυκήτων παρέχουν μια μερική και όχι απόλυτη εκλεκτικότητα και επιτρέπουν την ανάπτυξη και μυκήτων που παρουσιάζουν ομοιότητες στην φυσιολογία τους με τους μύκητες στόχους. Έτσι σε θρεπτικό μέσο εκλεκτικό για μύκητες του γένους *Sclerotinia* αναπτύχθηκαν και ταυτοποιήθηκαν μύκητες που ανήκουν κυρίως στο γένος *Fusarium* και δευτερευόντως μύκητες του γένους *Aspergillus* (Εικόνα 22). Αντίστοιχα σε θρεπτικό εκλεκτικό μέσο για μύκητες του γένους *Rhizoctonia* αναπτύχθηκαν και ταυτοποιήθηκαν μύκητες που ανήκουν στα γένη *Scedosporium*, *Aspergillus* και *Fusarium* (Εικόνα 23). Τέλος στο θρεπτικό μέσο για μύκητες του γένους *Verticillium* αναπτύχθηκαν και ταυτοποιήθηκαν

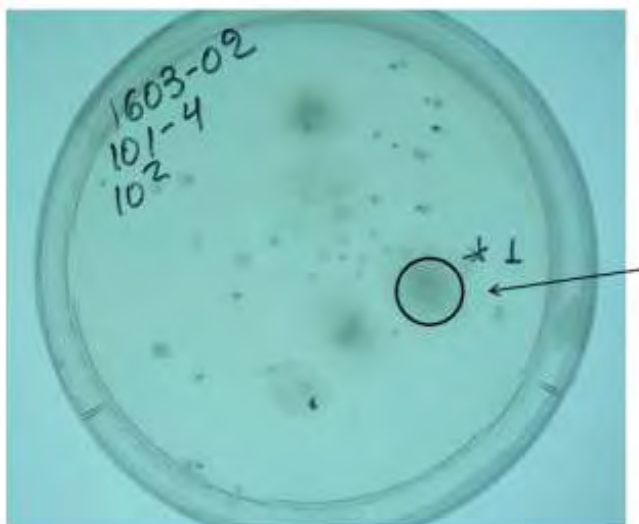
μύκητες που ανήκουν στο γένος *Fusarium* (Εικόνα 24). Θα πρέπει να τονιστεί ότι στελέχη που ανήκουν στο είδος *Scedosporium apiospermum* θεωρούνται ως αναδυόμενα παθογόνα του ανθρώπου και έχει βρεθεί ότι προκαλούν διάφορες ασθένειες (Cooley et al., 2007).



Εικόνα 22: Ανάπτυξη μυκήτων που ανήκουν στα γένη *Fusarium* και *Aspergillus* σε τριβλία με εκλεκτικό θρεπτικό μέσο για μύκητες του γένους *Sclerotinia*.



Εικόνα 23: Ανάπτυξη μυκήτων που ανήκουν στα γένη *Fusarium* και *Scedosporium* σε τριβλία με εκλεκτικό θρεπτικό μέσο για μύκητες του γένους *Rhizoctonia*.



Εικόνα 24: Ανάπτυξη μυκήτων που ανήκουν στο γένος *Fusarium* σε τριβλία με εκλεκτικό θρεπτικό μέσο για μύκητες του γένους *Verticillium*.

Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα και λόγω του γεγονότος ότι δεν υπάρχει στην βιβλιογραφία εναλλακτικά θρεπτικά μέσα που να παρέχουν απόλυτη εκλεκτικότητα για τους μύκητες στόχους ακολούθησε εκτίμηση του πληθυσμού των μυκήτων στα υπόλοιπα δείγματα εδάφους με τα αρχικά επιλεγμένα θρεπτικά μέσα. Στο πλαίσιο αυτό η αρχική ταυτοποίηση των μυκήτων λήφθηκε υπόψη ώστε να εκτιμηθεί με ακρίβεια σε επίπεδο γένος και όχι είδους ο αριθμός των μυκήτων στόχων αλλά και μυκήτων που αρχικά δεν αποτέλεσαν στόχους αλλά εμφανίστηκαν με μεγάλη συχνότητα στα θρεπτικά μέσα που χρησιμοποιήθηκαν. Όπως αποδείχτηκε, στα εδάφη που αναλύθηκαν παρατηρήθηκαν υψηλοί πληθυσμοί μυκήτων του γένους *Fusarium* σε αντίθεση με την μη ανίχνευση μυκήτων από τα υπόλοιπα τρία γένη μυκήτων που αποτέλεσαν στόχους της καταμέτρησης. Η ταυτοποίηση μερικών από τους μύκητες του γένους *Fusarium* που ανιχνεύθηκαν στα τριβλία έδειξαν ότι ανήκουν σε φυλές που χαρακτηρίζονται ως φυτοπαθογόνα συγκεκριμένων καλλιεργειών όπως το *Fusarium oxysporum f.sp. melonis* που αποτελεί σημαντικό φυτοπαθογόνο του πεπονιού (Katan et al., 1994), το *F. oxysporum f.sp. ciceris* που προκαλεί φουζαρίωση του ρεβιθιού (Singh et al. 2010) και το *Fusarium solani* που στελέχη του έχει βρεθεί ότι προκαλούν φουζαριώσεις σε φυτά της οικογένειας Cucurbitaceae (Campaco et al. 1993). Θα πρέπει να τονιστεί βέβαια ότι στελέχη του είδους *F. solani* έχει βρεθεί ότι παρουσιάζουν επισχετική δράση έναντι άλλων φουζαριών που προκαλούν αδροφουζαριώσεις σε τομάτα (Kavroulakis et al., 2007). Αντίθετα, σε αρκετά δείγματα εδάφους εμφανίστηκαν μύκητες του γένους *Aspergillus*. Ο αριθμός τους ήταν της τάξης μεγέθους 10^3 - 10^5 , όπως υπέδειξε η καταμέτρηση όλων των αποικιών.

Η κυριαρχία μυκήτων του γένους *Fusarium* στα εδάφη που αναλύθηκαν δεν προκαλεί έκπληξη καθώς όλα σχεδόν τα καλλιεργούμενα φυτά, συμπεριλαμβανομένου και των τεσσάρων εξεταζόμενων, προσβάλλονται από ένα τουλάχιστον είδος του γένους αυτού (Wollenweber and Reinking, 1935). Τα αποτελέσματα υπέδειξαν πως, στα περισσότερα από τα δείγματα εδάφους που αναλύθηκαν, το κυρίαρχο γένος ήταν το *Fusarium* και μάλιστα σε μεγάλη ποσότητα, όπως υποδηλώνει η τάξη μεγέθους της καταμέτρησης των μυκήτων του. Το γεγονός αυτό είναι ίσως αναμενόμενο, καθώς αποτελεί ένα κοσμοπολίτικο είδος, και το πλέον διαδεδομένο από τα είδη του γένους *Fusarium*. Είναι αναμφίβολα το πιο σημαντικό από οικονομικής άποψης είδος του γένους, δεδομένου των πολλών ξενιστών του και των απωλειών που προκαλεί όταν προσβάλλει ένα φυτό. Η μεγάλη του διασπορά και η οικονομική του σημασία το καθιστούν ένα από τα πλέον μελετημένα είδη.

Όσον αφορά το γένος *Aspergillus*, περιλαμβάνει είδη που προσβάλουν και τον άνθρωπο. Εκτός από τους μύκητες που ανήκουν στα είδη *Aspergillus niger*, *Aspergillus carbonarius* και *Aspergillus flavus* και αποτελούν από τα σοβαρότερα φυτοπαθογόνα, πολλά είδη μυκήτων αυτού του γένους έχουν μεγάλη σημασία για τον άνθρωπο. Κάποια είδη παράγουν τις τοξικές ουσίες μυκοτοξίνες, σημαντική ομάδα των οποίων αποτελούν οι αφλατοξίνες. (The Genus *Aspergillus*, 1965) Ειδικότερα, η αφλατοξίνη B1 είναι ισχυρότατο καρκινογόνο, η οποία προσδένεται σε ένα ογκοκατασταλτικό γονίδιο των θηλαστικών, προκαλώντας μια ειδική σημειακή μετάλλαξη. Εκτός από τις αφλατοξίνες, είδη

του γένους *Aspergillus* παράγουν και άλλες μυκοτοξίνες, τις ωχρατοξίνες, γνωστές και σαν νεφροτοξίνες, που καταστρέφουν το ήπαρ και το πάγκρεας. Άλλες τοξίνες που παράγονται από είδη του γένους *Aspergillus* είναι η κίτρινη που καταστρέφει το πάγκρεας και η πατουλίνη που προκαλεί αιμορραγία των πνευμόνων και του εγκεφάλου. Μια ισχυρότατη τοξίνη είναι και το κυκλικό πεπτίδιο μαλφορμίνη Α το οποίο είναι πολύ τοξικό στα θηλαστικά και προκαλεί καρκινογένεση ακόμα και στα φυτά. Εκτός από ισχυρές τοξίνες, είδη του γένους *Aspergillus* προκαλούν ασθένειες γνωστές με τον όρο ασπεργιλλώσεις. Οι συγκεκριμένες ασθένειες ενοχοποιούνται για σημαντικές φλεγμονές των πνευμόνων (Χριστιάς, 1999).

Γενικά Συμπεράσματα

Συμπερασματικά τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας έδειξαν ότι

- Τα θρεπτικά μέσα που χρησιμοποιήθηκαν για την εκτίμηση του πληθυσμού μυκήτων που ανήκουν στα γένη *Fusarium*, *Verticillium*, *Sclerotinia*, *Rhizoctonia* δεν παρουσιάζουν απόλυτη εκλεκτικότητα και επιτρέπουν την ανάπτυξη και άλλων μυκήτων που δεν ανήκουν στα παραπάνω γένη. Για τον λόγο αυτό η χρήση τους θα πρέπει να συνοδεύεται από ταυτοποίηση των μυκήτων που αναπτύσσονται σε αυτά ώστε να υπάρχει ακριβής εκτίμηση του πληθυσμού των μυκήτων-στόχων και να αποφεύγονται λανθασμένες εκτιμήσεις
- Τα εδάφη που αναλύθηκαν παρουσιάζουν υψηλό φορτίο μυκήτων που ανήκουν στο γένος *Fusarium* και είναι πιθανό να προκαλέσουν φυτοπαθολογικές προσβολές στα κηπευτικά που καλλιεργούνται. Ιδιαίτερα ανιχνεύθηκαν είδη του συγκεκριμένου γένους που προκαλούν ασθένειες σε πεπόνι, ρεβύθι και κολοκυνθοειδή.
- Αντίθετα δεν ανιχνεύθηκαν μύκητες που ανήκουν στα γένη *Verticillium*, *Rhizoctonia*, *Sclerotinia*. Αντ' αυτών μύκητες του γένους *Aspergillus* που δεν έχει αναφερθεί ότι προκαλούν σοβαρά φυτοπαθολογικά προβλήματα ανιχνεύθηκαν σε πληθώρα δειγμάτων
- Η μέθοδος αυτή αποτελεί μια απλή προσέγγιση καταμέτρησης του πληθυσμού εδαφογενών μυκήτων με φυτοπαθολογικό ενδιαφέρον και παρουσιάζει συγκεκριμένα προβλήματα που απορρέουν από την περιορισμένη εκλεκτικότητα των θρεπτικών μέσων. Μελλοντικές μελέτες θα εστιάσουν στην ανάπτυξη εξειδικευμένων μεθόδων PCR πραγματικού χρόνου για την εκτίμηση του πληθυσμού μυκήτων με φυτοπαθολογικό ενδιαφέρον και ανίχνευση σε επίπεδο είδους και όχι γένους.

Βιβλιογραφία

- Agrios G. N., 1997, Plant Pathology, 4th edn. San Diego, CA, USA: Academic Press.
- Agrios G. N., 2005, Plant Pathology, 5th edn. Elsevier, New York.
- Anderson N.A., 1982, The genetics and pathology of *Rhizoctonia solani*, Ann Rev Phytopathol 20, 329-347.
- Back M. A., Haydock P. P., Jenkinson P., 2002, Disease complexes involving plant parasitic nematodes and soilborne pathogens, Plant Pathol., 51: 683–697.
- Bishop C., D., Cooper R. M., 1983, An ultra structural study of root invasion in three vascular wilt diseases, Physiol. Mol. Plant Path. 22, 15-27.
- Brase S., Encinas A., Keck J., Nising F. C., 2009, Chemistry and Biology of Mycotoxins and Related Fungal Metabolites, Chem. Rev., 109, 3903–3990.
- Desprez-Loustau M.L., Robin C., Buee M., Courtecuisse R., Garbaye J., Suffert F., Sache I., Rizzo M. D., 2007, The fungal dimension of biological invasions, Trends in Ecology and Evolution Vol.22 No.9.
- Bowers J. H., Nameth S. T., Riedel R. M., Rowe R. C., 1996, Infection and colonization of potato roots by *Verticillium dahliae* as affected by *Pratylenchus penetrans* and *P. crenatus*, Phytopathology, 86: 614–621.
- Champaco ER, Martyn RD, Miller ME. (1993). Comparison of *Fusarium solani* and *F. oxysporum* as causal agents of fruit rot and root rot of muskmelon. HortScience 28: 1174±1177
- Cooley Louise, Spelman Denis, Thursky Karin, and Slavin Monica Infection with *Scedosporium apiospermum* and *S. prolificans*, Australia Volume 13, Number 8— August 2007
- Cubeta, M. A., and R. Vilgalys, 1997, Population Biology of the *Rhizoctonia Solani* Complex, Population Genetics of Soilborne Fungal Plant Pathogens 87.4: 480-84, The American Phytopathological Society.
- Damicone J. P., Brandenburg L, 2010, Common disease of tomatoes. Part 1. Disease caused by fungi, Oklahoma Cooperative Extension Fact Sheets, EPP-7625, Oklahoma State University, Division of Agricultural Sciences and Natural Resources.
- Dez J. B., Clewes E., 2003, Plant pathogenic *Verticillium* species: how many of them are there?, Molecular Plant Pathology, 4 (4): 297-305.
- Dhingra OD, Sinclair JB (1994) Basic Plant Pathology Methods, 2ND Edition. CRC Press

Doubrava N., Blake J. H., Keinath A. P., Williamson J., 2007, Cucumber, Squash, Melon & Other Cucurbit Diseases, Clemson Cooperative Extension, HGIC 2206 1-888-656-9988, <http://www.clemson.edu/extension/hgic>.

Egan J. E., Talbot J. N., 2008, Genomes, free radicals and plant cell invasion: recent developments in plant pathogenic fungi, *Current Opinion in Plant Biology*, 11:367–372.

Fradin E. F., Thomma B. P., 2006. “Physiology and molecular aspects of *Verticillium* wilt diseases caused by *V. dahlia* and *V. albo-atrum*”. *Molecular Plant Pathology*, 7 (2): 71-86.

Fravel D., Olivain C., and Alabouvette C., 2003, *Fusarium oxysporum* and its biocontrol, *New Phytologist* 157: 493-502.

Garrett S. D., 1970, *Pathogenic root-infection fungi*, London, UK: Cambridge University Press

González García V., Portal Onco M. A., Rubio Susan V., 2006, Review. Biology and Systematics of the form genus *Rhizoctonia*, *Spanish Journal of Agricultural Research*, 4 (1): 55-79.

Gutierrez WA, Shew H.D (1998) Identification and quantification of ascospores as the primary inoculum for collar rot of greenhouse-produced tobacco seedlings. *Plant Disease* 82:485-490

Harrison J. A., 1971, Association between the potato-cyst nematode *Heterodera rostochiensis* Woll. and *Verticillium dahliae* Kleb. in the earlydying disease of potatoes, *Ann. Appl. Biol.*, 67: 185–193.

Horbach R., Navarro-Quesadac R. A., Knoggec W., Deising B. H., 2011, When and how to kill a plant cell: Infection strategies of plant pathogenic fungi, *Journal of Plant Physiology* 168, 51-62.

Howlett J. B., 2006, Secondary metabolite toxins and nutrition of plant pathogenic fungi *Current Opinion in Plant Biology*, 9:371–375.

Huisman O. C., 1982, Interrelations of root growth dynamics to epidemiology of root-invading fungi, *Annu. Rev. Phytopathol.*, 20: 303–327.

Isaak S., 1998, Some Fungi produce Toxins that affect the Physiological Functioning of Higher Plants: what is the Role of these Compounds in the Development of Plant Diseases? *Mycology Answer's, Mycologist*, Volume 12, Part 3.

Jiménez-Díaz R. M., Millar R. L., 1988, Sporulation on infected tissues, and presence of airborne *Verticillium albo-atrum* in alfalfa fields in New York, *Plant Pathol.*, 37: 64–70.

Johnson D. A., Santo G. S., 2001, Development of wilt in mint in response to infection by two pathotypes of *Verticillium dahliae* and co-infection by *Pratylenchus penetrans*, Plant Dis. 85: 1189–1192.

N. Kavroulakis, S. Ntougias, G.I. Zervakis, C. Ehaliotis, K. Haralampidis, K.K. Papadopoulou (2007) Role of ethylene in the protection of tomato plants against soil-borne fungal pathogens conferred by an endophytic *Fusarium solani* strain. *J. Exp. Bot.* 58: 3853-3864

T. Katan, J. Katan, T.R. Gordon, D. Pozniak. (1994) Physiology races and vegetative compatibility groups of *Fusarium oxysporum f.sp. melonis* in Israel. *Phytopathology*, 84: 153–157

Kenneth B.Raper and Dorothy I.Fennell: The Genus *Aspergillus*, The Williams and Wilkins Co., Baltimore U.S.A., (1965)

Laemmlen F., 2001, *Sclerotinia* diseases, University of California, Agriculture and Natural Resources, UC Peer Reviewed, publication 8042.

Ligoxigakis E. K., Vakalounakis D. J., Thanassouloupoulos C. C., 2002, Weed hosts of *Verticillium dahliae* in Crete: susceptibility, symptomatology and significance, *Phytoparasitica*, 30: 511–518.

Medina E., Romero C., Santos B., Castro A., García A., Romero F., Brenes M., 2011, Antimicrobial Activity of Olive Solutions from Stored Alpeorujo against Plant Pathogenic Microorganisms, *J. Agric. Food Chem.*, 59, 6927–6932.

Miller S. A., Rowe R. C., Riedel R. M., 2004, *Fusarium* and *Verticillium* wilts of tomato, potato, pepper, and eggplant, Fact Sheet Extension HYG-3122-96, The Ohio State University, plant Pathology.

Kucharek T., 2000, *Rhizoctonia* diseases in aboveground plant parts of agronomic and vegetable crops, Plant Pathology Fact Sheet PP-41, Florida Cooperative Extension Service.

Olsen L., Choffnes R. E., Relman A. D., Pray L., 2011, Fungal Diseases: an emerging threat to human, animal, and plant health. Workshop Summary, Institute of Medicine (US) Forum on Microbial Threats, Washington (DC): National Academies Press (US).

Pan Z. Z, Zhu Y. Z., Yu X. J., Lin Q. F., Xiao R. F., Tang J. Y., Chen Q. X., Liu B., 2012, Synthesis of 4'-Thiosemicarbazonegriseofulvin and Its Effects on the Control of Enzymatic Browning and Postharvest Disease of Fruits, *J. Agric. Food Chem.*, 60, 10784–10788.

Parmeter, J. R., 1970, *Rhizoctonia Solani*, Biology and Pathology, Print., University of California Biology and Pathology.

Pegg G. F., Brady B. L., 2002, *Verticillium* Wilts, Wallingford, UK: CABI Publishing.

Pegg G. F., 1974, *Verticillium* diseases, Rev. Plant Pathol., 53: 157–182.

Schnathorst W. C., 1981, Life cycle and epidemiology of *Verticillium*. In Fungal Wilt Diseases of Plants (Mace, M.E., Bell, A.A. and Beckman, C.H., eds), pp. 81–111. New York: Academic Press.

Schoch CL et al. (2012) Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. PNAS 109(16): 6241–6246

R. K. Singh , Abul Hasan & R. G. Chaudhary (2010): Variability in *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* causing vascular wilt in chickpea, *Archives of Phytopathology And Plant Protection*, 43(10), 987-995

Sneh B., Burpee L., Ogoshi A. (eds), 1991, Identification of *Rhizoctonia* species, APS Press. St. Paul.

Ullio L., 2004, Strawberry disease control guide, NSW Agriculture, Agfact H3.3.1, 3rd edition.

Vallad G. E., Bhat R. G., Koike S. T., Ryder E. J., Subbarao K. V., 2005, Weedborne reservoirs and seed transmission of *Verticillium dahliae* in lettuce, Plant. Dis., 89: 317–324.

Wehner T.C. and Barrett C., 2010, NC State and USDA Cucumber Disease Handbook, Cucumber Disease Descriptions, North Carolina State University.

Wilhelm, S. 1955, Longevity of the *Verticillium* wilt fungus in the laboratory and in the field, Phytopathology, 45: 180–181.

Wollenweber H. W., Reinking O. A., 1935, Die Fusarien, ihre Beschreiburg, Schadwirkung und Bekämpfung, Verlag Paul Parey, Berlin, Germany.

Zitter T. A., 1989, Pepper disease control- it starts with the seed, Vegetable MD Online, Cornell University, Department of Plant Pathology, Ithaca, NY.

Zitter T. A., 1998, Fusarium diseases of cucurbits, Fact Sheet Page 733.00, Vegetable MD Online, Cornell University, Department of Plant Pathology, Ithaca, NY.

Ζίφα Α., Μαμούρης Ζ., Μούτου Κ., 2008, Βιολογία, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Θεσσαλίας.

Ηλιόπουλος Γ. Αθανάσιος, 2004, Γενική Φυτοπαθολογία.

Παναγόπουλος Χ.Γ., 1993, Ασθένειες καρποφόρων δένδρων και αμπέλου, Αθήνα: Εκδόσεις Σταμούλης.

Χριστιάς Χ., 1999, Μυκητολογία, Εκδόσεις Αγρότυπος ΑΕ., Αθήνα.