



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ, ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ, ΤΜΗΜΑ
ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

**Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΚΑΠΝΙΣΤΙΚΟΥ ΣΚΕΥΑΣΜΑΤΟΣ
PALADIN® ΣΤΟΥΣ ΠΛΗΘΥΣΜΟΥΣ ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΩΝ
ΕΔΑΦΟΓΕΝΩΝ ΦΥΤΟΠΑΘΟΓΟΝΩΝ ΜΥΚΗΤΩΝ**

**THE EFFECT OF FUMIGANT FORMULATION PALADIN®
IN THE POPULATION OF SELECTED SOILBORNE
PHYTOPATHOGENIC FUNGI**

Πτυχιακή Εργασία

Παπαζλατάνη Χριστίνα

ΛΑΡΙΣΑ 2014-2015

**Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΚΑΠΝΙΣΤΙΚΟΥ ΣΚΕΥΑΣΜΑΤΟΣ
PALADIN® ΣΤΟΥΣ ΠΛΗΘΥΣΜΟΥΣ ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΩΝ
ΕΔΑΦΟΓΕΝΩΝ ΦΥΤΟΠΑΘΟΓΟΝΩΝ ΜΥΚΗΤΩΝ**

**THE EFFECT OF FUMIGANT FORMULATION PALADIN®
IN THE POPULATION OF SELECTED SOILBORNE
PHYTOPATHOGENIC FUNGI**

Επιβλέπων : Καρπούζας Δημήτριος, Αναπληρωτής Καθηγητής

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

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

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

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

Ευχαριστίες

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Καρπούζα Δημήτριο, υπό την επίβλεψη του οποίου πραγματοποιήθηκε η παρούσα εργασία για την επιστημονική καθοδήγηση, τη βοήθεια και την υπομονή του καθ' όλη τη διάρκεια των πειραματικών διαδικασιών.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Ρουσίδου Κωνσταντίνα για την υπομονή, την καθοδήγηση και την βοήθειά της καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος καθώς και την Σκιαδά Βασιλική για την καθοδήγηση και τη βοήθειά της

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

Ευχαριστώ όλα τα μέλη του εργαστηρίου για την καλή συνεργασία και την υπομονή.

Τέλος, οφείλω ένα ιδιαίτερα μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένειά και τους φίλους μου και για την συνεχή υποστήριξη, υπομονή και κατανόηση που μου παρείχαν.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	6
ABSTRACT.....	7
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	8
1.1. Φυτοπαθογόνα εδάφους.....	8
1.1.1. Χαρακτηριστικά παθογένειας	9
1.2. Φυτοπαθογόνα που προσβάλλουν κηπευτικά υπό κάλυψη	9
1.3. Φυτοπαθογόνοι μύκητες εδάφους που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία	10
1.3.1. <i>Fusarium oxysporum</i>	10
1.3.2. <i>Cladosporium</i>	11
1.3.3. <i>Rhizoctonia solani</i>	11
1.4. Μέθοδοι καταπολέμησης	12
1.4.1. Είδη μεθόδων καταπολέμησης των εδαφογενών παθογόνων.....	12
1.4.2. PALADIN® και DMDS.....	15
1.5. Τεχνικές για την μελέτη της μικροβιακής κοινότητας του εδάφους.....	16
1.6. Στόχος της παρούσας πτυχιακής εργασίας	18
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	18
2.1. Πείραμα αγρού	18
2.2. Καλλιέργεια φυτοπαθογόνων μυκήτων και εκχύλιση του DNA τους για χρήση ως θετικό μάρτυρα.....	20
2.2.1. Θεωρητικό Μέρος.....	20
2.2.2. Υλικά και αντιδραστήρια	20
2.2.3. Πειραματική διαδικασία.....	20
2.3. Εκχύλιση του ολικού DNA από τα δείγματα των εδαφών	21
2.3.1. Θεωρητικό Μέρος.....	21
2.3.2. Πειραματικό Μέρος.....	21
2.4. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτη αγαρόζης.....	22
2.4.1. Θεωρητικό Μέρος.....	22
2.4.2. Υλικά και αντιδραστήρια	22
2.4.3. Πειραματικό Μέρος.....	22
2.5. Εκτίμηση της ποικιλότητας των εδαφογενών φυτοπαθογόνων μυκήτων στο έδαφος μέσω δημιουργίας βιβλιοθηκών κλώνων	23
2.5.1. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης του γονιδίου ITS	23

2.5.2.	Κλωνοποίηση	25
2.5.3.	Αλυσιδωτές αντίδρασεις πολυμεράσης της ITS περιοχής των μυκήτων που ανήκουν στο είδος <i>Rhizoctonia solani</i> και του γονιδίου της ενδοπολυγακτουρονάσης (pg1) των μυκήτων του είδους <i>Fusarium oxysporum</i> . 26	
2.5.4.	Κλωνοποίηση των προϊόντων PCR	28
2.6.	PCR πραγματικού χρόνου για την εκτίμηση του πληθυσμού των εδαφογενών μυκήτων <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Cladosporium sp.</i> , και <i>Rhizoctonia solani</i>	28
2.6.1.	Θεωρητικό Μέρος.....	28
2.6.2.	Πειραματικό Μέρος - <i>Fusarium oxysporum</i>	30
2.6.3.	Πειραματικό Μέρος - <i>Cladosporium sp.</i>	32
2.6.4.	Πειραματικό Μέρος - <i>Rhizoctonia solani</i>	33
2.7.	Στατιστική επεξεργασία των δεδομένων.....	34
3.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	35
3.1.	Εκχύλιση ολικού DNA από δείγματα εδαφών	35
3.2.	Αποτελέσματα PCR για το σχηματισμό των βιβλιοθηκών κλώνων.....	35
3.3.	Εκτίμηση της ποικιλότητας των εδαφογενών φυτοπαθογόνων μυκήτων στο έδαφος	37
3.4.1.	Επίδραση του PALADIN [®] στον πληθυσμό του μύκητα <i>Fusarium oxysporum</i> στο έδαφος.....	38
3.4.2.	Επίδραση του PALADIN [®] στον πληθυσμό του μύκητα <i>Cladosporium sp.</i> στο έδαφος.....	41
3.4.3.	Επίδραση του PALADIN [®] στον πληθυσμό του μύκητα <i>Rhizoctonia solani</i> στο έδαφος.....	44
4.	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	46
4.1.	Μελλοντικές μελέτες	47
5.	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	47

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Με την απόσυρση του βρωμιούχου μεθυλίου από την αγορά δημιουργήθηκε ένα σημαντικό κενό στην καταπολέμηση των εδαφογενών παθογόνων και νηματωδών στις κηπευτικές υπό κάλυψη καλλιέργειες. Στο πλαίσιο της ανεύρεσης εναλλακτικών γεωργικών φαρμάκων που θα μπορούσαν να καλύψουν το κενό του βρωμιούχου μεθυλίου δοκιμάστηκαν διάφορα καπνιστικά γεωργικά φάρμακα όπως τα dazomet, 1,3-dichlorpropene, methamsodium και chloropicrin που είχαν ικανοποιητική αποτελεσματικότητα αλλά μικρότερο φάσμα δράσης από το βρωμιούχο μεθύλιο (Giannakou and Kargouzas 2003).

Στόχος της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη της αποτελεσματικότητας του καπνιστικού σκευάσματος PALADIN® του οποίου δραστικό συστατικό αποτελεί το Dimethyl Disulfide (DMDS). Το DMDS δεν εμφανίζει αρνητικές επιρροές στο περιβάλλον όπως το βρωμιούχο μεθύλιο κάτι που το καθιστά μια κατάλληλη εναλλακτική λύση για την προστασία των κηπευτικών από διάφορους φυτοπαθογόνους μύκητες του εδάφους. Οι εδαφογενείς παθογόνοι μύκητες που εξετάστηκαν ανήκουν στα είδη *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani* και στο γένος *Cladosporium*.

Οι πληθυσμοί όλων των μυκήτων επηρεάστηκαν από την παρουσία του PALADIN® στο έδαφος. Οι επίδραση στους μύκητες των ειδών *Fusarium oxysporum* και *Rhizoctonia solani* ήταν πολύ αποτελεσματική και διήρκησε μέχρι το τέλος της καλλιεργητικής περιόδου. Όσον αφορά τους μύκητες του γένους *Cladosporium*, το καπνιστικό PALADIN® περιόρισε προσωρινά αλλά σε σημαντικό βαθμό τον πληθυσμό τους. Η παροδική αυτή μείωση που επέφερε το PALADIN® πιθανότατα είναι ικανή να προστατεύσει τα κηπευτικά κατά τα αρχικά στάδια ανάπτυξης τους αμέσως μετά την μεταφύτευση από προσβολές από τους συγκεκριμένους μύκητες.

ABSTRACT

The withdrawal of methyl bromide from the market created a significant gap in the fight against soilborne pathogens and nematodes in horticultural crops under shelter. In the context of finding alternative pesticides that could fill the void of methyl bromide several soil fumigants were tested, such as dazomet, 1,3-dichlorpropene, methamsodium and chloropicrin, that had good efficacy but a smaller spectrum of action than methyl bromide. (Giannakou and Karpouzas 2003).

The aim of the present work was to study the effectiveness of the fumigant formulation PALADIN® whose active ingredient is Dimethyl Disulfide (DMDS). DMDS exhibits no negative influences on the environment, such as methyl bromide, which makes it a suitable alternative to protect vegetables from various plant pathogenic soil fungi. The soil-borne pathogenic fungi that were tested belong to the species *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani* and to the *Cladosporium* genus.

The populations of all fungi were affected by the presence of PALADIN® in the soil. The impact on the fungal species *Fusarium oxysporum* and *Rhizoctonia solani* was very strong and lasted until the end of the growing season. Regarding the fungi of the genus *Cladosporium*, the fumigant PALADIN® temporarily but significantly reduced their population. This transient decrease that was brought by PALADIN® most likely is capable of protecting vegetables from attacks by certain fungi in their early stages of growth, immediately after transplanting.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Φυτοπαθογόνα εδάφους

Το έδαφος παρέχει κατοικία σε ένα μεγάλο αριθμό οργανισμών όπως βακτήρια, μύκητες, άλγη, ιούς και πρωτόζωα, από τα οποία οι μύκητες και τα βακτήρια είναι τα επικρατέστερα. Κάποιοι από τους μικροοργανισμούς οι οποίοι είναι παρόντες στο έδαφος μπορούν να επιμολύνουν τα φυτά έχοντας καταστροφικές συνέπειες στην παραγωγικότητα τους. Τα παθογόνα του εδάφους, λοιπόν, χρειάζονται ένα ευπαθές φυτό για την ανάπτυξη της παρασιτικής τους φάσης αν και μπορούν να παραμείνουν στο έδαφος ως σαπρόφυτα, σε υπολείμματα οργανικής ύλης, ή ως ανθεκτικές, αδρανείς μορφές για αρκετές βδομάδες ή ακόμα και χρόνια ανάλογα με την βιολογία του εκάστοτε μικροοργανισμού. Συνεπώς, στις περισσότερες περιπτώσεις, τα εδάφη, όσο υγιή και αν είναι, φιλοξενούν τέτοιου είδους οργανισμούς και η ολοκληρωτική εξάλειψη τους είναι σχεδόν αδύνατη.

Οι μύκητες προκαλούν μακράν τις περισσότερες ασθένειες στα φυτά και έτσι θεωρούνται η πιο σημαντική ομάδα παθογόνων. Οι μύκητες του εδάφους που προσβάλλουν τα φυτά μπορούν να χωριστούν σε 5 κύριες ταξινομικές κατηγορίες με βάση μορφολογικά και βιολογικά χαρακτηριστικά. Αυτές είναι:

- Πλασμοδιοφόροι Μύκητες (Plasmodiophoromycetes). Τα κυριότερα πλασμοδιοφόρα παθογόνα εδάφους είναι ο *Plasmodiophora brassicae* (αιτιολογικός παράγοντας ασθένειας των ριζών των κλαμβών) και ο *Spongospora subterranea* (αιτιολογικός παράγοντας της ξήρανσης της πατάτας)
- Ζυγομύκητες (Zygomycetes)
- Οομύκητες (Oomycetes): Σημαντικά παθογόνα εδάφους που ανήκουν σε αυτή τη κατηγορία περιλαμβάνουν τα γένη *Aphanomyces*, *Bremia*, *Phytophthora*, και *Pythium*
- Ασκομύκητες (Ascomycetes): Σημαντικοί ασκομύκητες - φυτοπαθογόνα είναι οι *Monosporascus*, και *Sclerotinia*
- Βασιδιομύκητες (Basidiomycetes): Περιλαμβάνει κυρίως σαπροφυτικούς μύκητες αλλά και παθογόνα που ανήκουν στο γένος *Ustilago*.

Κάποια είδη Ασκομυκητών και των Βασιδιομυκητών σχηματίζουν ένα δεύτερο τύπο σπόρων οι οποίοι παράγονται ασεξουαλικά. Αυτά τα ασεξουαλικά στάδια εντάσσονται σε μια επιπλέον, ξεχωριστή τάξη, τους Ατελείς Μύκητες. Παραδείγματα ατελών μυκήτων είναι οι μύκητες που ανήκουν στα γένη *Fusarium*, *Rhizoctonia*, και *Verticillium*.

Γενικά μπορούν να προσδιοριστούν δυο διαφορετικοί τύποι φυτοπαθογόνων μυκήτων του εδάφους: τους κατοίκους του εδάφους και τους εισβολείς του εδάφους. Τα παθογόνα που κατοικούν στο έδαφος έχουν την ικανότητα να επιβιώνουν εκεί για σχετικά μεγάλο χρονικό διάστημα. Θεωρούνται ως πρωτόγονα, μη εξειδικευμένα παράσιτα που μολύνουν φυτάρια και ιστούς νεαρών ριζών (π.χ.

τα είδη των *Rhizoctonia* & *Pythium*) και για τα οποία ο παρασιτισμός είναι μια τυχαία κατάσταση σε μια σαπροφυτική ύπαρξη στο έδαφος (Lockwood 1988). Από την άλλη τα παθογόνα που θεωρούνται εισβολείς του εδάφους μπορούν να επιβιώσουν στο έδαφος μόνο για μια σχετικά μικρή περίοδο, θεωρούνται πιο εξειδικευμένοι ως προς συγκεκριμένα φυτά-ξενιστές και η εμφάνιση παθογένειας στο φυτό-ξενιστή έρχεται με βραδύτητα. (Lockwood 1988). Πολλά παθογόνα εδάφους μπορούν να λειτουργήσουν και να επιβιώσουν ως μη-παθογόνα κάτω από συγκεκριμένες προϋποθέσεις. Αν αυτά τα παθογόνα είναι σε επαφή με νεκρούς ή σάπιους φυτικούς ιστούς, μπορούν να αναπτυχθούν και να επιβιώσουν με αυτά τα υποστρώματα και συνεπώς εμφανίζονται ως σαπρόφυτα (οργανισμοί που ζουν από την αποσυντιθέμενη οργανική ύλη).

1.1.1. Χαρακτηριστικά παθογένειας

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

1.2. Φυτοπαθογόνα που προσβάλλουν κηπευτικά υπό κάλυψη

Οι καλλιέργειες κηπευτικών υπό κάλυψη αναφέρεται κυρίως στην εκτός εποχής παραγωγή κηπευτικών σε θερμοκήπια (Σάββας 2009). Στην Ελλάδα η παραγωγή κηπευτικών υπό κάλυψη περιορίζεται στα λαχανικά που απεικονίζονται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 1 Κηπευτικά που καλλιεργούνται υπό κάλυψη στην Ελλάδα και, ενδεικτικά, τα πιο κοινά παθογόνα που τα προσβάλλουν

Είδος κηπευτικού	Παθογόνα εδάφους	Αναφορά
Ντομάτα	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i> , race 1 and race2 (Μύκητας)	(Besri 2001)
	<i>Verticillium dahliae</i> , races 1 and 2 (Μύκητας)	
	<i>Clavibacter michiganense</i> (Βακτήριο)	
	<i>Pseudomonas syringae</i> p.v <i>tomato</i> (Βακτήριο)	
	<i>Orobanche crenata</i> (Βακτήριο)	
	<i>Meloidogyne</i> spp. (Νηματώδες)	
Αγγούρι	<i>Pythium ultimum</i> (Μύκητας)	(Roberts et al. 2005)
	<i>Rhizoctonia solani</i> Μύκητας)	

	<i>Meloidogyne incognita</i> (Νηματούδες)	
Κολοκυθάκι	<i>Alternaria alternata</i> (Μύκητας)	(Jamiołkowska and Sawicki 2011)
	<i>Rhizoctonia solani</i> (Μύκητας)	
	<i>Fusarium spp.</i> (Μύκητας)	
Μελιτζάνα	<i>Verticillium dahliae</i> (Μύκητας)	(Bogoescua, Doltu, and Sora 2014)
	<i>Fusarium oxysporum f. sp. Melongenae</i> (Μύκητας)	
	<i>Meloidogyne spp.</i> (Νηματούδες)	
Πιπεριά	<i>Phytophthora capsici</i> (Μύκητας)	(Gilardi et al. 2014)
	<i>Verticillium dahliae</i> (Μύκητας)	
	<i>Rhizoctonia solani</i> (Μύκητας)	
	<i>Colletotrichum coccodes</i> (Μύκητας)	
Φασολάκι νωπό	<i>Fusarium oxysporum f. sp. Phaseoli</i> (Μύκητας)	(El-Mougy, El-Gamal, and Abdel-Kader 2007)
	<i>Rhizoctonia solani</i> (Μύκητας)	
Μαρούλι	<i>Fusarium oxysporum f. sp. Lactucum</i> (Μύκητας)	(Hubbard 1993)
	<i>Pythium ultimum var ultimum</i> (Μήκυτας)	(Sutton et al. 2006)
	<i>Rhizoctonia solani</i> (Μύκητας)	(Wood 1951)
Πεπόνι	<i>Fusarium oxysporum f. sp. Melonis</i> (Μύκητας)	(Gordon, Okamoto, and Jacobson 1989)
	<i>Macrophomina phaseolina</i> (Μύκητας)	(Salari et al. 2012)
	<i>Monosporascus cannonballus</i> (Μύκητας)	
	<i>Rhizoctonia solani</i> (Μήκυτας)	
Φράουλα	<i>Fusarium oxysporum f.sp. fragariae</i> (Μύκητας)	(Suga et al. 2013)
	<i>Rhizoctonia spp.</i> (Μύκητας)	(Martin 1988; Yildiz and Benlioğlu 2014)
	<i>Macrophomina phaseolina</i> (Μήκυτας)	(Yildiz and Benlioğlu 2014)

Κάθε κηπευτικό προσβάλλεται από μια ποικιλία παθογόνων τα οποία μπορούν να προκαλέσουν σοβαρές απώλειες στην παραγωγή.

1.3. Φυτοπαθογόνοι μύκητες εδάφους που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία

Οι μύκητες που μελετήθηκαν στη παρούσα πτυχιακή εργασία επιλέχθηκαν λόγω της μεγάλης τους αφθονίας στο έδαφος του αγρού όπου έγινε το πείραμα και λόγω της σοβαρότητας των ασθενειών που προκαλούν στα φυτά.

1.3.1. *Fusarium oxysporum*

Οι μύκητες που ανήκουν στο είδος *Fusarium oxysporum* είναι ευρέως διαδεδομένοι σε όλο τον κόσμο σε όλους τους τύπους χώματος. Αναπαράγονται ασεξουαλικά, δρουν ως σαπρόφυτα και έχουν την ικανότητα να αναπτύσσονται και να επιβιώνουν για μεγάλες περιόδους στο έδαφος. Οι μύκητες του συγκεκριμένου είδους εκδηλώνουν ένα υψηλό επίπεδο εξειδίκευσης ως προς τον ξενιστή που θα

προσβάλλουν και κατηγοριοποιούνται με βάση τα είδη των ξενιστών στα οποία μπορούν να προκαλέσουν παθογένεια (Edel et al. 2001). Μπορούν να προκαλέσουν σοβαρές απώλειες σε καλλιέργειες πολλών λαχανικών και φρούτων, όπως η ντομάτα, το πεπόνι και το φασόλι (Michielse and Rep 2009). Τα μέλη του είδους *Fusarium oxysporum* εισέρχονται στο φυτό μέσω των ριζών και αποικίζουν το φυτό μέσω του ξηλώματος. Η κύρια ασθένεια που προκαλούν είναι ο μαρασμός των αγγείων του φυτού (αδρομύκωση) με συμπτώματα όπως επιναστία και μεσονεύριες χλωρώσεις των φύλλων που ακολουθούνται από νανισμό, κιτρίνισμα των χαμηλότερων φύλλων, προοδευτικό μαρασμό, αποφύλλωση και τελικά θάνατο του φυτού (Michielse and Rep 2009).

1.3.2. Cladosporium

Το *Cladosporium* είναι ένα γένος ασκομυκήτων που περιλαμβάνει μερικές από τις πιο κοινές μούχλες εσωτερικού και εξωτερικού χώρου. Τα είδη του *Cladosporium* είναι ευρέως διαδεδομένα και συχνά απομονώνονται από το έδαφος, το φαγητό και άλλα οργανικά υποστρώματα. Μερικά είδη του γένους *Cladosporium* προκαλούν δευτερογενείς προσβολές και αποικίζουν τα φύλλα διαφόρων φυτών που είναι ήδη προσβεβλημένα από άλλους φυτοπαθογόνους μύκητες (Bensch et al. 2012). Τα σπόρια του *Cladosporium* μεταφέρονται με τον αέρα και εισέρχονται στα φυτά - ξενιστές μέσω ανοιγμάτων των φύλλων, όπως τα στόματα (Bensch et al. 2012). Οι μύκητες αυτού του είδους μπορούν να προσβάλλουν μια μεγάλη ποικιλία κηπευτικών όπως ντομάτες, αγγούρια, πράσα, κρεμμύδι και άλλα κηπευτικά υπό κάλυψη αλλά και δημητριακά (Ogórek et al. 2012). Ο πιο ευρέως μελετημένος εκπρόσωπος του είδους είναι το είδος *Cladosporium fulvum* το οποίο προκαλεί κλαδοσπορίωση στις ντομάτες, μια ασθένεια με κύριο σύμπτωμα τον μαρασμό των φύλλων η οποία μπορεί να καταλήξει στη νέκρωση του φυτού (Rivas and Thomas 2005).

1.3.3. Rhizoctonia solani

Το *Rhizoctonia solani* (Τελεόμορφο: *Thanatephorus cucumeris*) είναι ένας βασιδιομύκητας και αποτελεί την κύρια αιτία ασθενειών των ριζών πολλών οικονομικά σημαντικών φυτών. (Lakshman et al. 2008). Μια ιδιαιτερότητα των μυκήτων που ανήκουν στο συγκεκριμένο είδος είναι ότι διακρίνονται περαιτέρω σε ομάδες αναστόμωσης (AG) (Anderson 1982). Αναστόμωση είναι η συνένωση των μυκηλίων δύο μυκήτων όταν αυτά βρεθούν πλησίον και λαμβάνει χώρα μόνο μεταξύ συγκεκριμένων ατόμων του είδους. (Anderson 1982). Έτσι οι μύκητες του είδους *R. solani* διακρίνονται σε 13 ομάδες αναστόμωσης μερικές από τις οποίες περιλαμβάνουν πολλές υποομάδες. Κάθε υποομάδα μπορεί να προσβάλει συγκεκριμένα φυτά-ξενιστές ανάμεσα στα οποία και πολλά κηπευτικά υπό κάλυψη (Yang and Li 2012). Οι υφές του μύκητα εισέρχονται στο φυτό μέσω απευθείας διείσδυσης διαμέσου της επιδερμίδας ή μέσω φυσικών ανοιγμάτων του φυτού. (Brown and Guest 1997). Κυρίως επιτίθεται στους σπόρους των φυτών που βρίσκονται κάτω από την επιφάνεια του εδάφους, αλλά μπορεί επίσης να προσβάλλει το περικάρπιο του σπόρου, τις ρίζες, τα φύλλα και τον μίσχο. Το πιο

κοινό σύμπτωμα του μύκητα ονομάζεται *ριζοκτονία* και χαρακτηρίζεται από μη βλάστηση των σπόρων που είναι σοβαρά μολυσμένοι ή νέκρωση των φυτών είτε πριν είτε μετά την εμφάνιση τους από το χώμα. (Parmeter 1970). Τα μολυσμένα φυτά που δεν έχουν νεκρωθεί από τον μύκητα συχνά εμφανίζουν καφέ-κόκκινες πληγές στο μίσχο και στις ρίζες. Το *R.solani* μπορεί να επιβιώσει πολλά χρόνια στο έδαφος με τη μορφή των ανθεκτικών σκληρωτίων κάτι που κάνει την αντιμετώπιση του ακόμα πιο δύσκολη (Sneh 1996).

1.4. Μέθοδοι καταπολέμησης

Η διαχείριση των εδαφογενών ασθενειών εξαρτάται από την εις βάθος γνώση του παθογόνου, του φυτού-ξενιστή και των περιβαλλοντικών συνθηκών που ευνοούν την μόλυνση. Προκειμένου να αναπτυχθεί μια ασθένεια, πρέπει να είναι ευνοϊκοί και οι τρεις παραπάνω παράγοντες. Το παθογόνο πρέπει να σχηματίζει ένα βιώσιμο μόλυσμα το οποίο να είναι ικανό να μολύνει τον ξενιστή. Ο ξενιστής πρέπει να εκτεθεί στο παθογόνο εμβόλιο και να είναι φυσιολογικά ευάλωτος στην μόλυνση. Τέλος, οι περιβαλλοντικές συνθήκες πρέπει να ευνοούν την μόλυνση του φυτού και την ανάπτυξη του παθογόνου. Για παράδειγμα το έδαφος πρέπει να είναι υγρό για μια συγκεκριμένη χρονική περίοδο έτσι ώστε να μπορέσουν να αναπτυχθούν οι μύκητες που θα μολύνουν το φυτό. Η κατανόηση των δυναμικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ παθογόνου, ξενιστή και περιβάλλοντος βοηθά στην ανάπτυξη στρατηγικών αντιμετώπισης των εδαφογενών ασθενειών.

Μια αποτελεσματική στρατηγική αντιμετώπισης εδαφογενών ασθενειών πρέπει να είναι οικονομική στην αγορά και στην εφαρμογή, απλή, ασφαλής, και επαρκώς αποτελεσματική έτσι ώστε να μειώνει την ασθένεια σε ανεκτά επίπεδα. Τέλος ο καλύτερος τρόπος αντιμετώπισης των εδαφογενών ασθενειών είναι η πρόληψη με προσεκτική και συχνή επιθεώρηση των καλλιεργειών και ενδελεχή έλεγχο των συμπτωματικών φυτών.

1.4.1. Είδη μεθόδων καταπολέμησης των εδαφογενών παθογόνων

Με τη πάροδο των χρόνων έχουν αναπτυχθεί αρκετές μέθοδοι πρόληψης και καταπολέμησης των ασθενειών που προκαλούνται από παθογόνα εδάφους.

1. Αμειψισπορά- Η εναλλαγή καλλιεργειών διαφόρων κηπευτικών στο ίδιο εδαφικό περιβάλλον.

Η αμειψισπορά μπορεί να οριστεί ως η καλλιέργεια διαφόρων κηπευτικών με επαναλαμβανόμενη διαδοχή και καθορισμένη ακολουθία στο ίδιο έδαφος (Katan 2000). Η αμειψισπορά μπορεί να περιέχει περιόδους αγρανάπαυσης ή και όχι. Η αγρανάπαυση συνήθως συμβάλλει στη μείωση των περιστατικών ασθενειών των φυτών στο συγκεκριμένο έδαφος αν και σε ορισμένες περιπτώσεις σε αυτό το αποτέλεσμα οδηγεί και η συνεχόμενη καλλιέργεια (Katan 2000). Η καλλιέργεια κάποιων συγκεκριμένων φυτών όπως φυτά που ανήκουν στην οικογένεια Brassicaceae βοηθά στην μείωση των πληθυσμών των παθογόνων εδάφους. Όταν

τα υπολείμματα των συγκεκριμένων καλλιεργειών ενσωματωθούν στο έδαφος με την ολοκλήρωση της καλλιέργειας απελευθερώνουν γλυκοσινολικά οξέα τα οποία υδρολύονται από ένζυμα που περιέχονται στην φυτική μάζα σε ισοθεικυανιούχα που έχουν βιοκτόνο - καπνιστική δράση και περιορίζουν τους πληθυσμούς των φυτοπαθογόνων μυκήτων.

2. Σωστή μεταχείριση του γεωργικού χώρου και της παραγωγής.

Αυτό μπορεί να επιτευχθεί, για παράδειγμα, με τη παρουσία καλού συστήματος άρδευσης, με την ορθή τοποθέτηση των φυτών μέσα στο χώρο και διαχείριση του εδάφους, έκθεση του εδάφους στον ήλιο. Η άρδευση παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην αποφυγή ανάπτυξης των παθογόνων του εδάφους. Ο χρόνος, η συχνότητα, η ποσότητα και ο τρόπος άρδευσης του εδάφους είναι παράμετροι τις οποίες ο καλλιεργητής μπορεί να προσαρμόσει ανάλογα με τα κηπευτικά που καλλιεργεί και τα παθογόνα που έχει να αντιμετωπίσει. Σε πολλές περιπτώσεις η κατανόηση των απαιτήσεων σε υγρασία και αερισμό του παθογόνου του εδάφους έχει καταστήσει δυνατό το σχεδιασμό ενός πρωτοκόλλου άρδευσης το οποίο επιτρέπει μια καλή ή ακόμα και βέλτιστη παραγωγή με ταυτόχρονη μείωση της ανάπτυξης του παθογόνου. (Katan 2000). Επιπλέον, όπως ήδη προαναφέρθηκε, η πυκνότητα των φυτών παίζει εξίσου σημαντικό ρόλο. Μελέτες σχετικές με την πυκνότητα διαφόρων κηπευτικών σε σχέση με την εμφάνιση της ασθένειας (Burdon and Chilvers 1975; V. L. Smith 1988; Scott 1956) έδειξαν πως η πυκνότητα της σοδειάς είναι ανάλογη με την εμφάνιση της ασθένειας και κατά συνέπεια ανάπτυξη και ευημερία του παθογόνου του εδάφους. Η ορθή μεταχείριση του εδάφους παίζει επίσης σημαντικό ρόλο στην αποφυγή της ανάπτυξης των παθογόνων. Το εις βάθος όργωμα του εδάφους σε συνδυασμό με άλλες μεθόδους όπως η έκθεση στον ήλιο (ιδιαίτερα κατά τη θερινή περίοδο) οδήγησε σε μείωση της εμφάνισης περιστατικών ασθενειών από φυτοπαθογόνα του εδάφους (Newhall 1955).

3. Απολύμανση του εδάφους με χρήση θερμότητας

Η απολύμανση με ατμό είναι μια γεωργική τεχνική η οποία απολυμαίνει με ατμό το έδαφος κυρίως θερμοκηπίων. Σύμφωνα με αυτή τη τεχνική, στο έδαφος εφαρμόζεται ατμός και διατηρείται σ' αυτή την κατάσταση για ορισμένο χρονικό διάστημα με την ανάπτυξη θερμοκρασιών που φτάνουν τους 75°C σκοτώνοντας την πλειοψηφία των μικροοργανισμών του εδάφους συμπεριλαμβανομένων και των φυτοπαθογόνων μυκήτων. Η διαδικασία αυτή ονομάζεται αποστείρωση και εφαρμόζεται σε ορισμένες μόνο περιπτώσεις (Κουμπάκης 2005). Η εφαρμογή ατμού χρησιμοποιείται ως μια εναλλακτική λύση στο βρωμιούχο μεθύλιο του οποίου η παραγωγή και χρήση απαγορεύτηκε λόγω του πρωτόκολλου του Μόντρεαλ.

4. Δημιουργία διαγονιδικών φυτών ανθεκτικών σε συγκεκριμένα παθογόνα εδάφους

Η ανάπτυξη φυτών ανθεκτικών σε ασθένειες είναι ένα αποτελεσματικό μέτρο καθώς η αντοχή σε πολλά παθογόνα μπορεί να είναι ολοκληρωτική και διαρκείας.

Ένα φυτό μπορεί να εκφράσει αντοχή μέσω της δράσης ενός μόνο γονιδίου που προσδίδει ανθεκτικότητα (για παράδειγμα ανθεκτικότητα ενάντια συγκεκριμένων ομάδων του *Fusarium*) ή πολλών γονιδίων ως αποτέλεσμα μιας ευρείας ανθεκτικότητας σε πολλά παθογόνα.

5. Χρήση φυτών εμβολιασμένων σε ανθεκτικά υποκείμενα

Τα τελευταία έτη και ειδικότερα σε καλλιέργειες κηπευτικών έχει αξιοποιηθεί η χρήση φυτών εμβολιασμένων σε υποκείμενα ανθεκτικά πλήρως ή μερικώς σε φυτοπαθογόνους μύκητες. Η χρήση εμβολιασμένων φυτών έχει δώσει σημαντικές λύσεις στην καταπολέμηση των εδαφογενών φυτοπαθογόνων μυκήτων αλλά η διατήρηση της ανθεκτικότητας πολλές φορές επηρεάζεται και από τις περιβαλλοντικές συνθήκες και εμφανίζει προβλήματα όταν τα φυτά εκτίθενται σε ιδιαίτερα υψηλές θερμοκρασίες για μεγάλο χρονικό διάστημα.

6. Βιολογικός έλεγχος των παθογόνων

Είναι η χρήση ανταγωνιστικών ζωντανών μικροοργανισμών ενάντια σε ένα συγκεκριμένο παθογόνο-στόχο. Ήδη από τη δεκαετία του '90 έχει αρχίσει να γίνεται λόγος για την εύρεση εναλλακτικών μεθόδων καταπολέμησης των φυτοπαθογόνων που θα αντικαταστήσουν τη χρήση φυτοφαρμάκων (Becker and Schwinn 1993). Παρά το μεγάλο ενδιαφέρον, η μέθοδος αυτή είναι ακόμα υπό ανάπτυξη και δεν είναι ακόμα αποτελεσματική για τις περισσότερες ασθένειες που προκαλούνται από παθογόνα εδάφους. Αυτό γιατί υπάρχουν πολλές παράμετροι οι οποίες πρέπει να μελετηθούν έτσι ώστε να επιτευχθεί η επιτυχή εφαρμογή τους, όπως για παράδειγμα η αιτιολογία και επιδημιολογία του παθογόνου, ο τρόπος καλλιέργειας και ανάπτυξη του κηπευτικού το φυσικο-χημικό και μικροβιολογικό περιβάλλον όπου θα εφαρμοστεί ο παράγοντας βιολογικού ελέγχου. (Whipps 1997). Παρόλα αυτά κάποια προϊόντα κυκλοφορούν ήδη στην αγορά με ποικίλη αποτελεσματικότητα (Koch 1999).

5. Χρήση συνθετικών χημικών γεωργικών φαρμάκων

Τα συνθετικά γεωργικά φάρμακα αποτελούν ακόμη και σήμερα το κύριο τρόπο καταπολέμησης των φυτοπαθογόνων εδάφους. Τα μυκητοκτόνα μπορούν να χρησιμοποιηθούν στο έδαφος ή απευθείας στα φυτά. Όμως για τα περισσότερα παθογόνα εδάφους η εφαρμογή των μυκητοκτόνων σε επίπεδο αγρού δεν είναι ιδιαίτερα αποτελεσματική. Εδώ και αρκετά χρόνια η πιο παραδοσιακή μέθοδος για την καταπολέμηση των εδαφογενών φυτοπαθογόνων μυκήτων είναι η χρήση καπνιστικών σκευασμάτων πριν τη εγκατάσταση της καλλιέργειας. Ο καπνισμός του εδάφους είναι συνήθως πολύ αποτελεσματική μέθοδος και οδηγεί σε σημαντική μείωση του πληθυσμού των παθογόνων του εδάφους αν και η χρήση της είναι πολυδάπανη και αυστηρά ελεγχόμενη.

Από τη δεκαετία του 1960 το βρωμιούχο μεθύλιο χρησιμοποιούταν εκτενώς ως ένα καπνιστικό ευρείας δράσης ενάντια σε παθογόνα εδάφους, νηματώδεις, ζιζάνια και, σε μικρότερο βαθμό, ενάντια σε έντομα εδάφους (Noling and Becker 1994). Μετά

από έρευνες, αποδείχτηκε ότι το βρώμιο που παράγεται από τις εφαρμογές του βρωμιούχου μεθυλίου αποτελούσε κύριο παράγοντα απομείωσης του όζοντος της στρατόσφαιρας. (Noling and Becker 1994). Γι' αυτό το λόγο, από το 1992 υποβλήθηκε σε σταδιακή κατάργηση σύμφωνα με τις απαιτήσεις του πρωτόκολλου του Μόντρεαλ για ουσίες οι οποίες μειώνουν το στρώμα του όζοντος. Με την απόσυρση του βρωμιούχου μεθυλίου από την αγορά δημιουργήθηκε ένα σημαντικό κενό στην καταπολέμηση των εδαφογενών παθογόνων στις κηπευτικές υπό κάλυψη καλλιέργειες. Στο πλαίσιο της ανεύρεσης εναλλακτικών γεωργικών φαρμάκων που θα μπορούσαν να καλύψουν το κενό του βρωμιούχου μεθυλίου δοκιμάστηκαν διάφορα καπνιστικά γεωργικά φάρμακα όπως τα dazomet, 1,3-dichlorpropene, metham sodium (π.χ. Varan[®]) και chloropicrin που είχαν ικανοποιητική αποτελεσματικότητα αλλά μικρότερο φάσμα δράσης από το βρωμιούχο μεθύλιο. (Giannakou and Karpouzas 2003; Duniway 2002).

Εκτός των συνθετικών χημικών που χρησιμοποιούνται για τον υποκαπνισμό του εδάφους τα τελευταία 20 έτη έχουν αξιολογηθεί και εναλλακτικές πρακτικές όπως η βιολογικός υποκαπνισμός (biofumigation) που περιλαμβάνει την ενσωμάτωση στο έδαφος βιομάζας φυτών της οικογένειας *Brassicaceae* τα οποία περιέχουν υψηλές συγκεντρώσεις γλυκοσινολικών οξέων (Omirou et al. 2011). Τα τελευταία με την ρήξη των φυτικών ιστών υδρολύονται προς ισοθειοκυανιούχα παράγωγα τα οποία μπορούν να περιορίσουν τους πληθυσμούς εδαφογενών φυτοπαθογόνων και νηματωδών. (Omirou et al. 2013). Εκτός των ισοθειοκυανιούχων κατά την υδρόλυση των γλυκοσινολικών οξέων παράγονται και πτητικές θειούχες ενώσεις μικρού μοριακού βάρους όπως το *dimethyl disulfide* (DMDS) το οποίο οι Bending and Lincoln (2000) υποστήριξαν ότι παίζει σημαντικό ρόλο στην βιολογική δράση που παρουσιάζουν τα φυτικά υπολείμματα των *Brassicaceae*. Το DMDS παράγεται σε σημαντικές ποσότητες και από φυτά του γένους *Allium* sp. (κρεμμύδι) και πρόσφατα πειράματα έδειξαν ότι η ενσωμάτωση στο έδαφος φυτικών υπολειμμάτων της οικογένειας *Alliaceae* οδήγησαν σε περιορισμό των εδαφογενών φυτοπαθογόνων με την αποτελεσματικότητα της συγκεκριμένης πρακτικής να αποδίδεται στην παραγωγή DMDS. (Arnault et al. 2013).

1.4.2. PALADIN[®] και DMDS

Το PALADIN[®] είναι ένα καπνιστικό εδάφους του οποίου ενεργό συστατικό αποτελεί το DMDS. Σήμερα στις ΗΠΑ το καπνιστικό PALADIN[®] έχει ήδη πάρει έγκριση χρήσης για την καταπολέμηση νηματωδών και φυτοπαθογόνων μυκήτων εδάφους σε καλλιέργειες κηπευτικών. Το DMDS δεν εμφανίζει να έχει κάποια επίδραση στο όζον της ατμόσφαιρας (όπως το έτερο καπνιστικό βρωμιούχο μεθύλιο) και δρα αναστέλλοντας την λειτουργία των μιτοχονδρίων και ειδικότερα των κυτοχρωμικών οξειδασών (Auger and Charles 2003). Προηγούμενες μελέτες έδειξαν ότι εφαρμογή του DMDS σε καλλιέργειες τομάτας περιορίσει αποτελεσματικά του πληθυσμούς των ριζόκομβων νηματωδών (*Meloidogyne incognita*) (Faruk et al. 2011), αλλά δεν είχε ικανοποιητική αποτελεσματικότητα έναντι των εδαφογενών φυτοπαθογόνων *Pythium ultimum* και *Fusarium oxysporum* (Gerik 2005; Cabrera et al. 2014). Αντίθετα, οι Wang et al. (2009) παρατήρησαν ότι η ενσωμάτωση διαφορετικών

φυτών Brassica οδήγησε σε ελευθέρωση στο έδαφος σημαντικών ποσοτήτων DMDS και methylsulfide, η παρουσία των οποίων συσχετίστηκε με σημαντική μείωση του πληθυσμού του *Verticillium dahliae* και *Fusarium oxysporum* ενώ δεν παρατηρήθηκε αντίστοιχη μείωση του πληθυσμού μυκήτων του γένους *Pythium*. Επίσης ο Fritsch (2004) έδειξε ότι καπνισμός του εδάφους με DMDS περιόρισε αποτελεσματικά τους πληθυσμούς εδαφογενών παθογόνων όπως *Sclerotinia rolfsii*, *Verticillium dahliae*, *Rhizoctonia solani*. Πιο πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι το DMDS είτε μόνο του είτε σε συνδυασμό με chloropicrin προκάλεσε σημαντική μείωση του πληθυσμού του *F. oxysporum* και παρείχε ικανοποιητική προστασία σε φυτά φράουλας (Li et al. 2014).

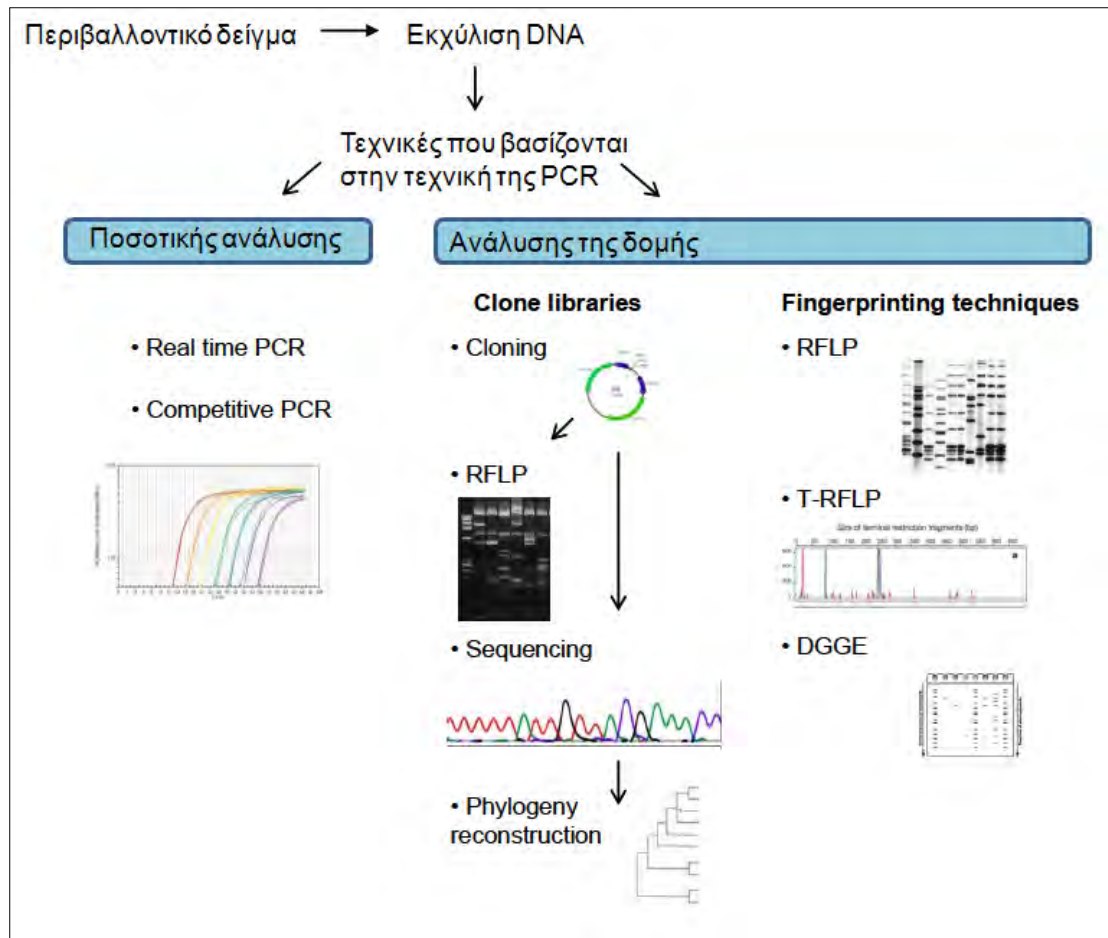
1.5. Τεχνικές για την μελέτη της μικροβιακής κοινότητας του εδάφους

Διάφορες μέθοδοι χρησιμοποιούνται για τη μελέτη της μικροβιακής κοινότητας του εδάφους. Αυτές μπορούν να ταξινομηθούν σε δύο κύριες κατηγορίες:

- i. στις μεθόδους που βασίζονται στην καλλιέργεια των μικροοργανισμών και
- ii. στις μη εξαρτώμενες από την καλλιέργεια μεθόδους.

Στο παρελθόν, οι μέθοδοι ανάλυσης των μικροοργανισμών του εδάφους βασίζονταν στην καλλιέργεια και στην απομόνωση (van Elsas et al. 1998). Μια μεγάλη ποικιλία θρεπτικών μέσων καλλιέργειας έχει αναπτυχθεί για να μεγιστοποιήσει την ανίχνευση ποικίλων μικροβιακών ομάδων (Balestra and Misaghi 1997; Sait, Hugenholtz, and Janssen 2002). Το κυριότερο μειονέκτημα των μεθόδων που στηρίζονται στην καλλιέργεια είναι ότι οι περισσότεροι μικροοργανισμοί δεν μπορούν να καλλιεργηθούν στο εργαστήριο. Έχει προταθεί ότι τουλάχιστον το 95-99% των βακτηρίων που παρατηρούνται στο μικροσκόπιο δεν μπορούν να καλλιεργηθούν με συμβατικές μικροβιολογικές μεθόδους (Borneman et al. 1996). Επίσης, πολλοί μύκητες είναι δύσκολο να καλλιεργηθούν στο εργαστήριο (van Elsas et al. 1998).

Η ανάπτυξη των μοριακών βιολογικών μεθόδων, οι οποίες δεν βασίζονται στην καλλιέργεια μικροοργανισμών, προσφέρει νέες δυνατότητες στην ανάλυση της μικροβιακής κοινότητας του εδάφους. Οι μοριακές αυτές τεχνικές μπορεί να δώσουν πληροφορίες για τη δομή (π.χ. βιβλιοθήκες κλώνων, T-RFLP, DGGE) ή για την αφθονία των μικροβιακών κοινοτήτων (real-time PCR, competitive PCR) (Εικόνα 1).



Εικόνα 1. Συχνά χρησιμοποιούμενες μοριακές τεχνικές για τη μελέτη της δομής και της πυκνότητας των μικροβιακών κοινοτήτων.

Η δημιουργία βιβλιοθηκών κλώνων παρέχει λεπτομερείς φυλογενετικές πληροφορίες για την μικροβιακή κοινότητα ενός περιβαλλοντικού δείγματος, αρκεί να ελεγχθεί επαρκής αριθμός κλώνων. Τα μειονεκτήματα της μεθόδου αυτής είναι ότι είναι επίπονη και χρονοβόρα διαδικασία και επομένως δεν είναι κατάλληλη για τις μελέτες που απαιτείται ανάλυση πολλών περιβαλλοντικών δειγμάτων.

Η PCR πραγματικού χρόνου (real time PCR) χρησιμοποιείται στη μικροβιακή οικολογία για την ποσοτικοποίηση των μικροοργανισμών σε ένα περιβαλλοντικό δείγμα μέσω της μέτρησης του αριθμού αντιγράφων ενός γονιδίου. Στην απλή PCR, ελέγχεται μόνο η τελική συγκέντρωση των προϊόντων ενίσχυσης μέσω φθορίζουσας χρωστικής που προσδένεται στο DNA. Στην PCR πραγματικού χρόνου η συγκέντρωση των προϊόντων ενίσχυσης ελέγχεται σε όλους τους κύκλους ενίσχυσης με την χρήση φθορίζουσων χρωστικών. Αυτές οι χρωστικές προσδένονται με τα προϊόντα ενίσχυσης χωρίς να τα καταστρέφουν έτσι ώστε η ενίσχυση τους να μπορεί να συνεχιστεί. Η ένταση του φθορισμού που εκπέμπεται κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας αντανακλά τη συγκέντρωση των προϊόντων ενίσχυσης σε πραγματικό χρόνο. Υπάρχουν αρκετές μέθοδοι για τη σήμανση και την ανίχνευση των προϊόντων της PCR πραγματικού χρόνου, οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενες είναι η μη ειδική παρεμβαλλόμενη χρωστική SYBR green (Wittwer et al. 1997) και οι

ειδικοί σημασμένοι ανιχνευτές TaqMan (Holland et al. 1991). Ο προσδιορισμός της ποσότητας των παραγόμενων προϊόντων μπορεί να γίνει με απόλυτο ή σχετικό υπολογισμό. Στην απόλυτη ποσοτικοποίηση ο αριθμός των αντιγράφων του αρχικού δείγματος προσδιορίζεται με τη χρήση καμπύλης αναφοράς ενώ στη σχετική ποσοτικοποίηση οι αλλαγές του αριθμού αντιγράφων του γονιδίου-στόχου εκφράζονται σχετικά με τον αριθμό αντιγράφων ενός γονιδίου αναφοράς.

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

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

1.6. Στόχος της παρούσας πτυχιακής εργασίας

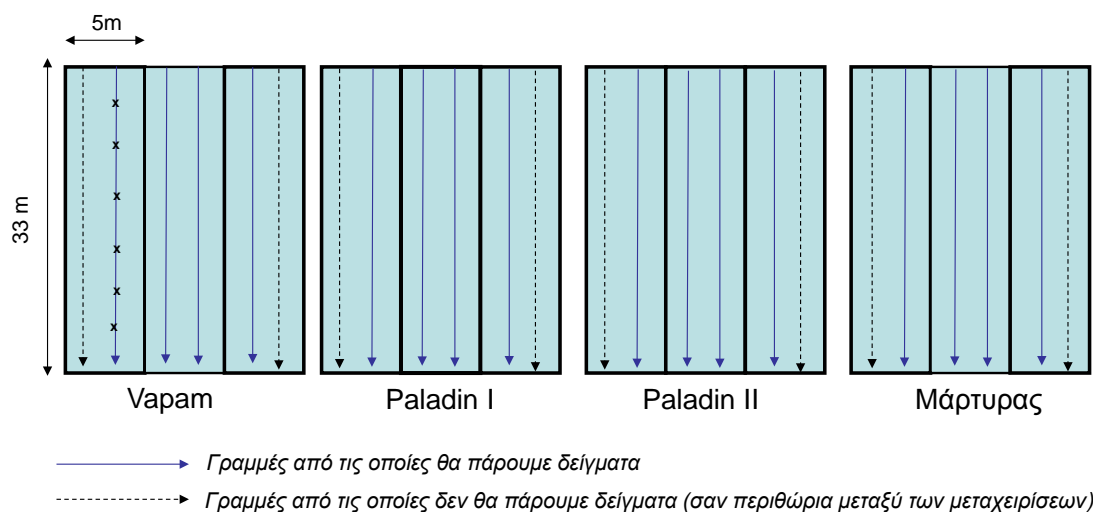
Στόχος της παρούσας πτυχιακής εργασίας είναι η εκτίμηση και αξιολόγηση της επίδρασης του καπνιστικού σκευάσματος PALADIN® ενάντια των πληθυσμών φυτοπαθολόγων μυκήτων εδάφους σε καλλιέργειες ντομάτας θερμοκηπίου. Για την πραγματοποίηση αυτής της μελέτης έγινε εφαρμογή της μεθόδου αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου σε δείγματα DNA τα οποία εκχυλίστηκαν από το έδαφος του αγρού όπου έλαβε χώρα το πείραμα.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Πείραμα αγρού

Στη παρούσα εργασία αξιολογήθηκε η επίδραση του καπνιστικού σκευάσματος PALADIN® στους πληθυσμούς επιλεγμένων εδαφογενών φυτοπαθολόγων μυκητών. Αρχικά πραγματοποιήθηκε πείραμα αγρού σε θερμοκήπιο στην περιοχή της Κυπαρισσίας που, σύμφωνα με αναφορές του παραγωγού, παρουσίαζε σοβαρά μυκητολογικά προβλήματα. Το έδαφος στο θερμοκήπιο προετοιμάστηκε και διαχωρίστηκε σε τέσσερα πειραματικά τεμάχια (5m x 22 m) καθένα εκ των οποίων

αποτελούνταν από 6 γραμμές φύτευσης (Εικόνα 2). Στις 22 Ιουλίου πραγματοποιήθηκαν οι εφαρμογές των γεωργικών καπνιστικών φαρμάκων ως εξής: Στο πρώτο τεμάχιο έγινε εφαρμογή του καπνιστικού εδάφους VAPAM στην συνιστάμενη δόση για καλλιέργεια τομάτας θερμοκηπίου μέσω του συστήματος άρδευσης και η συγκεκριμένη μεταχείριση χρησιμοποιήθηκε ως χημικός μάρτυρας αναφοράς. Στο δεύτερο και τρίτο τεμάχιο κατά σειρά έγινε εφαρμογή PALADIN® σε δοσολογίες 60 και 80 kg/ha αντίστοιχα μέσω του συστήματος στάγδην άρδευσης. Τέλος το τελευταίο τεμάχιο δέχτηκε άρδευση με νερό χωρίς κανένα καπνιστικό φάρμακο και χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας. Αμέσως μετά την εφαρμογή τα εδάφη καλύφθηκαν με κατάλληλο πλαστικό το οποίο διατηρήθηκε για διάστημα 20 ημερών. Με το πέρασμα των 20 ημερών το πλαστικό κάλυμμα απομακρύνθηκε και αφού έγινε αναμόχλευση του εδάφους και αερισμός ακολούθησε την επόμενη μέρα μεταφύτευση φυτών τομάτας. Η φύτευση και η περαιτέρω καλλιέργεια ακολούθησε τις συνήθεις αγροτικές πρακτικές που ακολουθούν οι παραγωγοί της περιοχής.



Εικόνα 2 Σχηματική αναπαράσταση της διαμόρφωσης των πειραματικών τεμαχίων με τις μεταχειρίσεις στον αγρό όπου πραγματοποιήθηκε το πείραμα.

Δείγματα εδάφους συλλέχθηκαν και από τα τέσσερα τεμάχια λίγο πριν την εφαρμογή των καπνιστικών (χρόνος 0 ημέρες), αμέσως μετά το ξεσκέπασμα του εδάφους (20 ημέρες) και στις 60 και 120 ημέρες μετά την εφαρμογή όπως περιγράφεται παρακάτω. Από κάθε πειραματικό τεμάχιο εξαιρέθηκαν από την δειγματοληψία οι δύο εξωτερικές σειρές φύτευσης ώστε να αποκλειστούν πιθανές επιδράσεις από την γειτονική μεταχείριση. Συνολικά από κάθε γραμμή φύτευσης συλλέχθηκαν 6 δείγματα εδάφους (Εικόνα 2) και ομογενοποιήθηκαν. Στο τέλος τα ομογενοποιημένα δείγματα από κάθε μεταχείριση και χρόνο αναμίχθηκαν και διαχωρίστηκαν σε υποδείγματα (50 g το καθένα) τα οποία αποθηκεύτηκαν στους -20°C μέχρι να χρησιμοποιηθούν για εξαγωγή DNA και περαιτέρω αναλύσεις.

2.2. Καλλιέργεια φυτοπαθογών μυκητών και εκχύλιση του DNA τους για χρήση ως θετικό μάρτυρα

2.2.1. Θεωρητικό Μέρος

Τα θρεπτικά μέσα είναι στερεά ή υγρά διαλύματα τα οποία χρησιμοποιούνται για την ανάπτυξη μικροοργανισμών σε εργαστηριακό επίπεδο. Για την καλλιέργεια μυκητών έχει δημιουργηθεί μια πληθώρα θρεπτικών μέσων τα οποία προσφέρουν το κατάλληλο περιβάλλον για την ανάπτυξη των μυκήτων (Ikechi–Nwogu 2012; Senthamizhselvan et al 2010). Στη παρούσα εργασία για την καλλιέργεια των μυκήτων χρησιμοποιήσαμε το θρεπτικό υπόστρωμα Potato Dextrose Agar (PDB) το οποίο δεν είναι εκλεκτικό και χρησιμοποιείται για την ανάπτυξη ενός μεγάλου εύρους μυκητών.

Για την εξαγωγή του DNA ακολουθήσαμε τη μέθοδο CTAB τροποποιημένη για την εκχύλιση DNA μυκητών (Stewart and Via 1993; Stewart 1997)

2.2.2. Υλικά και αντιδραστήρια

- Θρεπτικό μέσο PDB: 24 g λυοφιλοποιημένου PDB διαλύονται σε 1L ddH₂O και αποστειρώνονται
- Διάλυμα εκχύλισης DNA CTAB: Για 10ml διαλύματος CTAB αναμειγνύονται: 1ml Tris-Cl (1M), 0,4 ml EDTA (0,5M), NaCl 0,818 g, CTAB 0,2 g και PVP 0,1 g. Στην αρχή της πειραματικής διαδικασίας θερμαίνεται σε υδατόλουτρο στους 65°C
- Διάλυμα SEVAG: 10ml ισοαμυλικής αλκοόλης διαλύονται σε 240 μl χλωροφορμίου
- Διάλυμα 70% αιθανόλης: Παράγεται εκείνη τη στιγμή.
- 1% διάλυμα RNAσης: Σε 99μl αποστειρωμένου υπερκάθαρου ύδατος προστίθεται 1 μl RNAσης.

2.2.3. Πειραματική διαδικασία

Δύο κωνικές φιάλες με 50 ml θρεπτικού υποστρώματος PDB εμβολιάστηκαν με τους μύκητες *Fusarium oxysporum f. sp. radicis lycopersici (FORL)* και *Rhizoctonia solani*. Ακολούθησε επώαση υπό ανάδευση στους 25°C. Μετά από επώαση 3 ημερών εκχυλίστηκε το DNA του μύκητα FORL και μετά από 6 ημέρες του *Rhizoctonia solani*. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για την εκχύλιση του DNA περιγράφεται παρακάτω. Ο μύκητας συλλέχθηκε μετά από απόχυση της καλλιέργειας σε δοχείο συλλογής μέσα από ένα χωνί με γάζα. Στη συνέχεια μεταφέρθηκε σε γουδί όπου κονιοροποιήθηκε με τη χρήση υγρού αζώτου. Μέρος του δείγματος ιστού αποθηκεύτηκε στους -80°C. Στο υπόλοιπο προστέθηκαν 200ml διαλύματος CTAB και αναδεύτηκε μέχρι να διαλυθεί ο μύκητας. Στη συνέχεια προστέθηκε 1ml μερκαπτοαιθανόλης και ακολούθησε επώαση στους 65°C για 30 λεπτά με ενδιάμεσες αναδεύσεις κάθε 10 λεπτά. Μετά το πέρας της επώασης, προστέθηκαν 200 μl διαλύματος SEVAG, αναδεύτηκε επιμελώς για τουλάχιστον 30 δευτερόλεπτα και φυγοκεντρίθηκε στη μέγιστη ταχύτητα για 2 λεπτά. Σε αυτή τη φάση είχαν δημιουργηθεί 3 φάσεις: (1) DNA, (2) πρωτεΐνες και (3) οργανική φάση με τα

συστατικά του κυττάρου. Η πρώτη φάση απομονώθηκε και σε αυτή προστέθηκαν 160 μl ισοπροπανόλης. Ακολούθησε επώαση για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια φυγοκέντριση σε μέγιστη ταχύτητα για 10 λεπτά. Έπειτα το υπερκείμενο απομακρύνθηκε, το ίζημα επαναδιαλυτοποιήθηκε με 500 μl κρύας 70% αιθανόλης, και ακολούθησε ξανά φυγοκέντριση σε μέγιστη ταχύτητα για 5 λεπτά. Τέλος, το υπερκείμενο απορρίφθηκε και το ίζημα επαναδιαλυτοποιήθηκε με 35μl 1% διαλύματος RNAσης. Τέλος ηλεκτροφορήθηκαν 5μl από κάθε δείγμα DNA σε 0,8% ηλεκτρική αгарόζη.

2.3. Εκχύλιση του ολικού DNA από τα δείγματα των εδαφών

2.3.1. Θεωρητικό Μέρος

Το πρώτο βήμα για τον χαρακτηρισμό της μικροβιακής κοινότητας του εδάφους με μοριακές μεθόδους είναι η εξαγωγή του DNA από το έδαφος. Δύο μέθοδοι έχουν αναπτυχθεί για την απομόνωση του DNA:

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

Η πρώτη μέθοδος βασίζεται στην άμεση λύση των κυττάρων στο έδαφος η οποία μπορεί να γίνει με μηχανικό, χημικό ή ενζυμικό τρόπο ή και με συνδυασμό τους. Μετά τη λύση το DNA εκχυλίζεται και καθαρίζεται. Ενώ στη δεύτερη μέθοδο πριν τη λύση των κυττάρων και την ανάκτηση του DNA γίνεται διαχωρισμός των κυττάρων από τα σωματίδια του εδάφους. Για την περαιτέρω ανάλυση του εκχυλισμένου DNA με μοριακές τεχνικές όπως είναι η PCR είναι απαραίτητο το DNA να είναι ελεύθερο προσμίξεων όπως πολυφαινολικά, χουμικά οξέα ή πολυσακχαρίδια και πρωτεΐνες. Η παρουσία τέτοιων ουσιών στο εκχυλισμένο DNA του εδάφους μπορούν να προκαλέσουν αναστολή της δράσης της πολυμεράσης κατά την PCR. Και για τις δύο μεθόδους ένας μεγάλος αριθμός πρωτοκόλλων έχει δημοσιευτεί με διάφορες τροποποιήσεις που αποσκοπούν στη βελτίωση της ποιότητας και της ποσότητας του DNA που εκχυλίζεται. Επίσης, διάφορα εμπορικά kit είναι διαθέσιμα για την εκχύλιση DNA από το έδαφος.

Από μελέτες σύγκρισης των δύο μεθόδων έχει βρεθεί ότι με την μέθοδο της άμεσης λύσης εξάγεται μεγαλύτερη ποσότητα DNA ενώ με τη μέθοδο απομόνωσης κυττάρων παραλαμβάνεται DNA μεγαλύτερου μοριακού βάρους και υψηλότερης καθαρότητας. Επίσης, το DNA που εξάγεται από απομονωμένα κύτταρα προέρχεται κυρίως από βακτήρια ενώ με την μέθοδο άμεσης λύσης εξάγεται βακτηριακό και ευκαρυωτικό DNA (Roose-Amsaleg, Garnier-Sillam, and Harry 2001; Gabor, de Vries, and Janssen 2003; Robe et al. 2003).

2.3.2. Πειραματικό Μέρος

Αρχικά ζυγίστηκαν τρεις επαναλήψεις των 0,5 g η καθεμία από κάθε δείγμα εδάφους. Στη συνέχεια το ολικό DNA κάθε δείγματος εκχυλίστηκε με χρήση του Power Soil DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories, Inc.) και σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή. Το kit χρησιμοποιεί τη μέθοδο της άμεσης λύσης

των κυττάρων αξιοποιώντας συνδυασμό μηχανικών και χημικών μεθόδων. Για να επιβεβαιωθεί η ποιότητα και η ποσότητα των προϊόντων της εκχύλισης πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση σε πήκτη αγαρόζης 0,8%.

2.4. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτη αγαρόζης

2.4.1. Θεωρητικό Μέρος

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

2.4.2. Υλικά και αντιδραστήρια

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

2.4.3. Πειραματικό Μέρος

Τα δείγματα DNA που εκχυλίστηκαν από το έδαφος ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτη αγαρόζης 0,8% προκειμένου να επιβεβαιωθεί η απόδοση της εκχύλισης. Αρχικά η

πηκτή παρασκευάστηκε με διάλυση σε βρασμό της κατάλληλης ποσότητας αγαρόζης σε 1xTAE. Έπειτα στο διάλυμα προστέθηκε βρωμιούχο αιθίδιο με τελική συγκέντρωση 0,5μg/ml και μεταφέρθηκε σε ειδικά καλούπια προκειμένου να στερεοποιηθεί. Μετά τη στερεοποίηση του διαλύματος, η πηκτή εμβαπτίστηκε σε διάλυμα 1x TAE και φορτώθηκαν 5μl δείγματος αναμειγμένα με 1μl διάλυμα φόρτωσης. Επίσης στη πηκτή φορτώθηκαν και 2,5μl από τον μάρτυρα μοριακών μεγεθών.

2.5. Εκτίμηση της ποικιλότητας των εδαφογενών φυτοπαθογόνων μυκήτων στο έδαφος μέσω δημιουργίας βιβλιοθηκών κλώνων

Αρχικά έγινε μια προκαταρκτική αξιολόγηση της σύστασης της κοινότητας των μυκήτων στο έδαφος όπου πραγματοποιήθηκε το πείραμα ώστε να διαπιστωθεί ποια εδαφογενή παθογόνα είναι παρόντα και ανιχνεύσιμα στο συγκεκριμένο έδαφος.

2.5.1. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης του γονιδίου ITS

2.5.1.1. Θεωρητικό Μέρος

Η τεχνική της PCR (Polymerase Chain Reaction) επιτρέπει τον ενζυμικό πολλαπλασιασμό *in vitro* επιλεγμένων αλληλουχιών DNA από ελάχιστες αρχικές ποσότητες δείγματος.

Η αρχή λειτουργίας της μεθόδου στηρίζεται στη χρήση:

- 1) Ειδικής DNA πολυμεράσης η οποία είναι θερμοσταθερή και διατηρεί τη δραστηριότητά της σε θερμοκρασίες έως και 95°C.
- 2) Ενός ζεύγους συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων (συνήθως 15 - 30 βάσεων), τα οποία ονομάζονται εκκινητές (primers).
- 3) Κατάλληλου διαλύματος ελεύθερων 5' τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs).
- 4) Κατάλληλης συγκέντρωσης διαλύματος MgCl₂.
- 5) Ειδικού ρυθμιστικού διαλύματος για την πολυμεράση.
- 6) Μικρής ποσότητας DNA που παίζει το ρόλο του μορίου-μήτρας.

Η τεχνική της PCR πραγματοποιείται σε κύκλους. Κάθε κύκλος πραγματοποιείται σε τρία στάδια και αποφέρει εκθετικό πολλαπλασιασμό του DNA στόχου. Στο πρώτο στάδιο της PCR, το δίκλωνο DNA αποδιατάσσεται με θέρμανση στους 92-95°C. Στο δεύτερο στάδιο, οι εκκινητές που βρίσκονται σε μεγάλη περίσσεια υβριδίζονται με τις συμπληρωματικές προς αυτούς αλληλουχίες στους δύο κλώνους του DNA στους 50-65°C. Κατά το τρίτο στάδιο, το οποίο πραγματοποιείται στους 70-78°C, συντίθεται DNA αρχίζοντας από τους δύο εκκινητές. Ο άριστος αριθμός κύκλων εξαρτάται από την συγκέντρωση του DNA-στόχου και την απόδοση της PCR σε κάθε κύκλο. Μετά από μερικούς κύκλους το επικρατές προϊόν είναι δίκλωνο DNA, τα 5' άκρα του οποίου καθορίζονται από τους εκκινητές.

2.5.1.2. Πειραματικό Μέρος

Αρχικά DNA από τα δείγματα εδάφους που συλλέχθηκαν στο χρόνο 0 ημέρες και από τις 4 μεταχειρίσεις αναμίχθηκαν ισομερώς και χρησιμοποιήθηκαν ως εκμαγείο για την PCR ενίσχυση της ITS περιοχής του γονιδιώματος των μυκήτων του εδάφους με την χρήση των παγκόσμιων εκκινητών ITS1F – ITS4 (Karpouzas et al. 2011; White et al. 1990).

Πίνακας 2 Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση της περιοχής ITS του γονιδιώματος των μυκήτων του εδάφους

Όνομα εκκινητή	Αλληλουχία	Αναφορά
ITS1F	5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'	(White et al. 1990)
ITS4	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'	(White et al. 1990)

Το προϊόν ενίσχυσης είναι μεγέθους 600-700 bp, περιλαμβάνει το σύνολο της ITS περιοχής του γονιδιώματος των μυκήτων και αποτελεί barcoding περιοχή για την ταυτοποίηση των μυκήτων (Schoch et al. 2012).

Τα περιεχόμενα της αντίδρασης PCR και οι συνθήκες πραγματοποίησης παραθέτονται στους παρακάτω πίνακες:

Πίνακας 3 Αντίδραση PCR για την ενίσχυση της ITS περιοχής του γονιδιώματος των μυκήτων που βρίσκονται στα δείγματα εδάφους

Αντιδραστήρια	Όγκος (μl)	Τελική συγκέντρωση
Buffer (10x)	2,5	1X
dNTPs (10mM each)	0,5	0,2mM each
ITS1F (20μM)	0,5	0,4μM
ITS4 (20μM)	0,5	0,4μM
BSA (10μg/μl)	1	400ng/μl
KAPATaq (5u/μl)	0,1	0,02u/μl
Template	1	
dH ₂ O	18,9	
Τελικός όγκος	25	

Πίνακας 4 Συνθήκες πραγματοποίησης της αντίδρασης PCR για την ενίσχυση της ITS περιοχής του γονιδιώματος των μυκήτων που βρίσκονται στα δείγματα εδάφους

	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος	Κύκλοι
Ενεργοποίηση ενζύμου	95	5min	1
Αποδιάταξη	95	30sec	35
Υβριδοποίηση	55	30sec	
Επιμήκυνση	72	60sec	
Τελική επιμήκυνση	72	10min	1

Τέλος τα προϊόντα της αντίδρασης ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης 1,2% προκειμένου να επιβεβαιωθεί η ενίσχυση του κατάλληλου προϊόντος.

2.5.2. Κλωνοποίηση

2.5.2.1. Υλικά

- kit NucleoSpin Extract II (Macherey-Nagel)
- pGEM-T Easy vector systems (Promega)
- NucleoSpin Plasmid Kit (MACHEREY-NAGEL)
- Δεκτικά *E.coli* κύτταρα
- Θρεπτικό μέσο LB: 10 g NaCl, 10gCasein, 5 g Yeast extract και 15 g άγαρ (για την παρασκευή τριβλίων LB) διαλύονται σε 1L dH₂O και αποστειρώνονται
- Αμπικιλίνη: συγκέντρωση πρότυπου διαλύματος 100 mg/ml σε νερό, αποστείρωση με φίλτρο σύριγγας. Χρησιμοποιείται σε τελική συγκέντρωση 100μg/ml υπο αποστειρωμένες συνθήκες (φυλάσσεται στους -20°C)
- IPTG (0.1M): 0.238 g IPTG διαλύονται σε 10 mL ddH₂O και το διάλυμα αποστειρώνεται με φίλτρο (φυλάσσεται στους 4°C)
- X-GAL (2%): 0.2g X-GAL διαλύονται σε 10ml διμεθυλοφορμαμίδιο και το διάλυμα αποστειρώνεται (φυλάσσεται στους -20°C)

2.5.2.2. Πειραματικό Μέρος

Το PCR προϊόν που παραλήφθηκε καθαρίστηκε με το kit NucleoSpin Extract II της Macherey-Nagel σύμφωνα με το πρωτόκολλο του παρασκευαστή. Έπειτα ακολούθησε ένθεση του προϊόντος PCR σε πλασμιδιακό φορέα pGEM-TEasy (Promega) σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή. Η αντίδραση ανασυνδυασμού περιλάμβανε:

Αντιδραστήρια	Όγκος (μl)
Rapid Ligation Buffer (2x)	5
pGEM [®] -T Easy Vector (50ng)	0,5
Προϊόν PCR	*
T4 DNA Ligase (3u/μl)	1
H ₂ O	Συμπληρώνουμε μέχρι τελικού όγκου 10μl

Πίνακας 5 Προκειμένου να υπολογίσουμε την απαραίτητη ποσότητα του PCR προϊόντος που χρειάζεται, χρησιμοποιήσαμε τον τύπο:

$$\frac{\text{ng of vector} \times \text{kb size of insert}}{\text{kb size of vector}} \times \text{insert:vector molar ratio} = \text{ng of insert}$$

Στη συνέχεια ο πλασμιδιακός φορέας μετασηματίστηκε σε δεκτικά κύτταρα *E.coli* DH5α. Συνοπτικά σε 80 μl δεκτικών κυττάρων προστέθηκαν 2μl από την αντίδραση της λιγάσης (ligase) και πραγματοποιήθηκε μικρή ανακίνηση του δείγματος. Ακολούθησε επώαση στον πάγο για 30min και στη συνέχεια προκλήθηκε θερμικό σοκ στους 42°C για 50sec. Τα κύτταρα επανατοποθετήθηκαν στον πάγο για 2min και προστέθηκαν 200μlLB. Έγινε επώαση στους 37°C για 60min. Στη συνέχεια, προστέθηκαν στα κύτταρα 50μlX-GAL (2%) και 10μl IPTG (0,1M) και το διάλυμα απλώθηκε σε τριβλία LB με αμπικιλίνη (100μg/ml). Τα τριβλία επώαστηκαν στους 37°C για 16 ώρες. Ακολούθησε επιλογή λευκών αποικιών (που θεωρητικά περιέχουν το ένθεμα σε αντίθεση με μπλε αποικίες που δεν περιέχουν το ένθεμα) και

εμβολιασμός σε 5ml θρεπτικού διαλύματος LB με αμπικιλίνη και colonyPCR προκειμένου να επιβεβαιωθεί ότι τα βακτήρια περιέχουν όντως το ένθεμα.

Τα περιεχόμενα της αντίδρασης της colony PCR και οι συνθήκες πραγματοποίησης παρατίθενται στους παρακάτω πίνακες:

Πίνακας 6 Συστατικά της colony PCR

Αντιδραστήρια	Όγκος (μl)	Τελική συγκέντρωση
Buffer (10xMg ⁺² free)	2	1X
MgCl ₂ (25mM)	1,2	1,5mM
dNTPs (10mM each)	0,4	0,2mM each
ITS1F (20μM)	0,4	0,4μM
ITS4 (20μM)	0,4	0,4μM
KAPA Taq (5u/μl)	0,08	0,02 U/μl
Template	1 αποικία	
dH ₂ O	15,52	
Τελικός όγκος	20	

Πίνακας 7 Συνθήκες πραγματοποίησης της αντίδρασης colony PCR

	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος	Κύκλοι
Ενεργοποίηση ενζύμου	95	5min	1
Αποδιάταξη	95	30sec	35
Υβριδοποίηση	55	30sec	
Επιμήκυνση	72	60sec	
Τελική επιμήκυνση	72	10min	1

Μετά το πέρας της αντίδρασης, τα προϊόντα της PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αгарόζης 1,2%.

Οι υγρές καλλιέργειες των μετασχηματισμένων βακτηρίων επωάστηκαν με συνεχή ανάδευση στους 37°C για 16 ώρες. Μετά τις 16 ώρες έγινε απομόνωση του πλασμιδιακού DNA με το kit NucleoSpinPlasmid (Macherey-Nagel, Germany) και σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή. Τα πλασμίδια απεστάλησαν στο εργαστήριο Ανοσολογίας του Τμήματος Ιατρικής για αλληλούχιση του ενθέματος σε αυτόματο σύστημα αλληλούχισης. Συνολικά επιλέχθηκαν 130 περίπου κλώνοι.

2.5.3. Αλυσιδωτές αντίδρασεις πολυμεράσης της ITS περιοχής των μυκητών που ανήκουν στο είδος *Rhizoctonia solani* και του γονιδίου της ενδοπολυγακτουρονάσης (rg1) των μυκήτων του είδους *Fusarium oxysporum*.

2.5.3.1. Θεωρητικό Μέρος

Από τα αποτελέσματα της αρχικής βιβλιοθήκης κλώνων προέκυψε ότι μύκητες που ανήκουν στα είδη *Rhizoctonia solani* και *Fusarium oxysporum* αποτέλεσαν τα πιο συχνά απαντούμενα εδαφογενή φυτοπαθογόνα στο έδαφος. Λόγω της μεγάλης ποικιλομορφίας παθοτύπων που υπάρχουν για τα συγκεκριμένα δύο παθογόνα (Budge et al. 2009; Edel et al. 2001), επιλέχθηκε να πραγματοποιηθούν δύο νέες βιβλιοθήκες κλώνων στοχεύοντας αυτή την φορά στην αξιολόγηση της ποικιλότητας

των μυκήτων που ανήκουν σε αυτά τα δυο είδη. Για τον λόγο αυτό τα ίδια δείγματα εδάφους όπως και παραπάνω χρησιμοποιήθηκαν ως εκμαγείο για την ενίσχυση της ITS περιοχής του γονιδιώματος των μυκήτων που ανήκουν στο είδος *Rhizoctonia solani* (Lievens et al. 2005) καθώς και του γονιδίου της ενδοπολυγακτουρονάσης (pg1) των μυκήτων του είδους *Fusarium oxysporum*.

Για το *R. solani* χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές ST-RS1(for) (εξειδικευμένος για μύκητες του είδους *R. solani*) και ITS4 (rev) (παγκόσμιος εκκινητής για της ITS2 περιοχή όλων των μυκήτων) (Lievens et al. 2005; White et al. 1990)

Πίνακας 8 Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση της περιοχής ITS του γονιδιώματος των μυκήτων που ανήκουν στο είδος *Rhizoctonia solani*

Όνομα εκκινητή	Αλληλουχία	Αναφορά
ST-RS1(for)	5'-AGTGTATGCTTGGTTCCACT-3'	(Lievens et al. 2005)
ITS4 (rev)	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'	(White et al. 1990)

Για το *F. oxysporum* χρησιμοποιήθηκε το ζεύγος εκκινητών un1 που ενισχύουν το γονίδιο pg1 των παθοτύπων του είδους *F. oxysporum* που προσβάλλουν την τομάτα όπως *F. oxysporum f.sp lycopersici*, *F. oxysporum f.sp. radicle-lycopersici* ενώ φαίνεται ότι ενισχύει και άλλους παθότυπους του συγκεκριμένου είδους όπως *F. oxysporum f.sp. melonis*, *f.sp. tulipae*, *f.sp. conglutinans* (Hirano and Arie 2006).

Πίνακας 9 Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση του γονιδίου της ενδοπολυγακτουρονάσης (pg1) των μυκήτων του είδους *Fusarium oxysporum*

Όνομα εκκινητή	Αλληλουχία	Αναφορά
unif	5'-ATCATCTTGTGCCAACTTCAG-3'	(Hirano and Arie 2006)
unir	5'- GTTTGTGATCTTTGAGTTGCCA – 3'	(Hirano and Arie 2006)

2.5.3.2. Πειραματικό Μέρος

Τα περιεχόμενα των αντιδράσεων PCR και οι συνθήκες πραγματοποίησης παραθέτονται στους παρακάτω πίνακες:

Πίνακας 10 Αντίδραση PCR για την ενίσχυση της ITS περιοχής του γονιδιώματος των μυκήτων που ανήκουν στο είδος *Rhizoctonia solani*

Αντιδραστήρια	Όγκος (μl)	Τελική συγκέντρωση
Buffer (10x)	2,5	1X
dNTPs (10mM each)	0,5	0,2mM each
ST-RS1 (20μM)	0,5	0,4μM
ITS4 (20μM)	0,5	0,4μM
BSA (10μg/μl)	1	400ng/μl
KAPA Taq (5u/μl)	0,1	0,02u/μl
Template	1	
dH2O	18,9	
Τελικός όγκος	25	

Πίνακας 11 Συνθήκες πραγματοποίησης της αντίδρασης PCR για την ενίσχυση της ITS περιοχής του γονιδιώματος των μυκήτων που ανήκουν στο είδος *Rhizoctonia solani*

	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος	Κύκλοι
Ενεργοποίηση ενζύμου	95	5min	1
Αποδιάταξη	95	30sec	40
Υβριδοποίηση	52	30sec	
Επιμήκυνση	72	30sec	
Τελική επιμήκυνση	72	10min	1

Πίνακας 12 Αντίδραση PCR για την ενίσχυση του γονιδίου της ενδοπολυγακτουρονάσης (*pg1*) των μυκήτων του είδους *Fusarium oxysporum*.

Αντιδραστήρια	Όγκος (μl)	Τελική συγκέντρωση
Buffer (10x)	2,5	1X
dNTPs (10mM each)	0,5	0,2mM each
unif (20μM)	0,5	0,4μM
unir (20μM)	0,5	0,4μM
BSA (10μg/μl)	1	400ng/μl
KAPA Taq (5u/μl)	0,1	0,02 U/μl
Template	1	
dH2O	18,9	
Τελικός όγκος	25	

Πίνακας 13 Συνθήκες πραγματοποίησης της αντίδρασης PCR για την ενίσχυση του γονιδίου της ενδοπολυγακτουρονάσης (*pg1*) των μυκήτων του είδους *Fusarium oxysporum*.

	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος	Κύκλοι
Ενεργοποίηση ενζύμου	95	5min	1
Αποδιάταξη	95	30sec	40
Υβριδοποίηση	52	60sec	
Επιμήκυνση	72	60sec	
Τελική επιμήκυνση	72	10min	1

2.5.4. Κλωνοποίηση των προϊόντων PCR

Πραγματοποιήθηκαν όλα τα βήματα που περιγράφηκαν παραπάνω για την δημιουργία βιβλιοθήκης κλώνων με την διαφορά ότι επιλέχθηκαν αυτή την φορά 33 κλώνοι για κάθε μια από τις δύο βιβλιοθήκες και απεστάλησαν για αλληλούχηση.

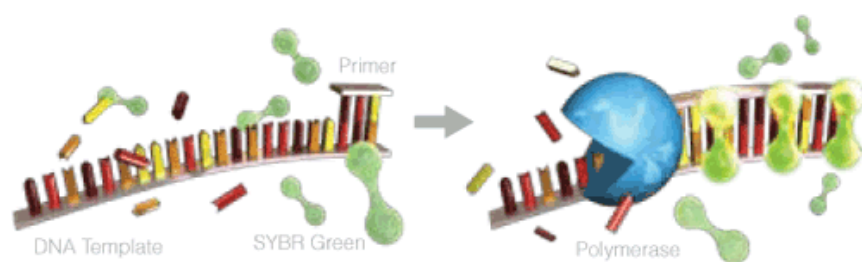
2.6. PCR πραγματικού χρόνου για την εκτίμηση του πληθυσμού των εδαφογενών μυκήτων *Fusarium oxysporum*, *Cladosporium sp.*, και *Rhizoctonia solani*

2.6.1. Θεωρητικό Μέρος

Η PCR πραγματικού χρόνου αποτελεί παραλλαγή της συμβατικής PCR και χρησιμοποιείται για τον πολλαπλασιασμό, την ανίχνευση και την ποσοτικοποίηση ενός συγκεκριμένου τμήματος DNA σε πραγματικό χρόνο. Η ιδιαιτερότητα της PCR

πραγματικού χρόνου έγκειται στη δυνατότητα παρακολούθησης και καταγραφής της ενίσχυσης του DNA σε όλη τη διάρκεια της αντίδρασης με τη χρήση φθορίζοντων χρωστικών.

Στη συγκεκριμένη μελέτη τα προϊόντα της PCR ανιχνεύτηκαν με την βοήθεια της χρωστικής SYBR Green, η οποία προσδέεται στο DNA και εκπέμπει φθορισμό μόνο όταν παρεμβάλλεται στην διπλή έλικα (Εικόνα 2). Η χρωστική SYBR Green δεν είναι ειδική για τη συγκεκριμένη αλληλουχία που πολλαπλασιάζεται. Αντίθετα, δεσμεύεται σε οποιοδήποτε δίκλωνο τμήμα DNA υπάρχει στο διάλυμα. Συνεπώς, η διαφοροποίηση μεταξύ του φθορισμού που εκπέμπεται από το μόριο-στόχο από τον φθορισμό άλλων δίκλωνων τμημάτων DNA που είναι δυνατόν να υπάρχουν στο διάλυμα, είναι αναγκαία. Για το λόγο αυτό μετά την ολοκλήρωση της ενίσχυσης είναι απαραίτητη η ανάλυση καμπύλης αποδιάταξης (dissociation curve), η οποία διευκολύνει την διαδικασία βελτιστοποίησης των συνθηκών. Η καμπύλη αποδιάταξης δίνει τη δυνατότητα διαχωρισμού του φθορισμού που προκύπτει από την ενίσχυση της αλληλουχίας-στόχου από τους φθορισμούς που οφείλονται στα διμερή των εκκινητών ή σε μη ειδικά προϊόντα.



Εικόνα 3 Λειτουργία χρωστικής SYBR Green. Όταν η χρωστική βρίσκεται ελεύθερη στο διάλυμα δεν παράγεται φθορισμός (αριστερά). Η ενσωμάτωσή της στο DNA κατά τη σύνθεσή του σε συνδυασμό με τη διέγερσή της με ακτινοβολία κατάλληλου μήκους κύματος, έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή φθορισμού (δεξιά). Η ένταση του φθορισμού αυτού είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του παραγόμενου προϊόντος

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

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

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

Στην πράξη, μία αξιόπιστη καμπύλη αναφοράς πρέπει να έχει τα εξής χαρακτηριστικά: τιμή R2 > 0.95, κλίση που να κυμαίνεται από -3.0 έως -3.9 και αποτελεσματικότητα της αντίδρασης PCR, μεταξύ 80-115% (Zhang and Fang 2006)

2.6.2. Πειραματικό Μέρος - *Fusarium oxysporum*

Προκειμένου να εκτιμηθεί η επίδραση του PALADIN® στους πληθυσμούς των μυκήτων του είδους *F. oxysporum* στο έδαφος πραγματοποιήθηκε PCR πραγματικού χρόνου στα δείγματα DNA από το πείραμα αγρού που περιγράφηκε παραπάνω. Στην περίπτωση αυτή χρησιμοποιήθηκαν το ζευγάρι εκκινητών FOW1F & FOW4R (Li et al. 2014) για την ενίσχυση του γονιδίου FOW1.

Πίνακας 14 Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση του γονιδίου FOW των μυκήτων που ανήκουν στο είδος Fusariumoxysporum

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

Το συγκεκριμένο γονίδιο κωδικοποιεί μια μιτοχονδριακή πρωτεΐνη-μεταφορέα και παίζει σημαντικό ρόλο στην έκφραση παθογένειας από τους μύκητες του είδους *F. oxysporum* και ειδικότερα στον αποικισμό των ριζών από τους συγκεκριμένους μύκητες (Li et al. 2014).

2.6.2.1. Κατασκευή της πρότυπης καμπύλης αναφοράς.

Για την απόλυτη ποσοτικοποίηση του αριθμού των αντιγράφων του γονιδίου FOW1 στα περιβαλλοντικά δείγματα, κατασκευάστηκαν καμπύλες αναφοράς. Για την κατασκευή τους χρησιμοποιήθηκαν αραιώσεις πλασμιδίων γνωστής συγκέντρωσης που περιείχαν ως ένθεμα το γονίδιο FOW1.

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε PCR ενίσχυση του FOW1 γονιδίου από ένα περιβαλλοντικό δείγμα. Ακολούθησε καθαρισμός των προϊόντων της PCR αντίδρασης με το kit NucleoSpin Extract II της Macherey-Nagel. Στη συνέχεια

ακολούθησε ένθεση του καθαρού τμήματος DNA στον πλασμιδιακό φορέα pGEM-TEasy (Promega) σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή. Ακολούθησε εισαγωγή του πλασμιδιακού φορέα με μετασχηματισμό σε δεκτικά κύτταρα E.coli DH5α. Συγκεκριμένα, σε 90μl δεκτικών κυττάρων προστέθηκαν 5μl από την αντίδραση της λιγάσης και το μίγμα ανακινήθηκε ελαφρά. Ακολούθησε επώαση στον πάγο για 30min και στη συνέχεια προκλήθηκε θερμικό σοκ στους 42°C για 55sec. Τα κύτταρα επανατοποθετήθηκαν στον πάγο για 2min και προστέθηκαν 200μl LB. Ακολούθησε επώαση στους 37°C για 60min. Στη συνέχεια, προστέθηκαν στα κύτταρα 50μl X-GAL (2%) και 10μl IPTG (0,1M) και ο συνολικός όγκος της καλλιέργειας επιστρώθηκε σε τρυβλία θρεπτικού υποστρώματος LB με αμπικιλίνη (100μgml⁻¹). Τα τρυβλία επώαστηκαν στους 37°C για 16 ώρες. Μετά την ανάπτυξη των αποικιών, πραγματοποιήθηκε επιλογή λευκών αποικιών και εμβολιασμός τους σε 5ml θρεπτικού διαλύματος LB με αμπικιλίνη. Ακολούθησε επώαση με συνεχή ανάδευση στους 37°C για 16 ώρες. Μετά το πέρας των 16 ωρών, πραγματοποιήθηκε απομόνωση του πλασμιδιακού DNA με το kit NucleoSpinPlasmid (MACHERY-NAGEL) και σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή.

Στα πλασμίδια που απομονώθηκαν εφαρμόστηκε PCR με το ζεύγος εκκινητών FOW1F-FOW4R για την επιβεβαίωση της ύπαρξης του FOW1 γονιδίου. Ακολούθησε φωτομέτρηση (260nm) των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων (Eppendorf Biophotometer) και μετατροπή της συγκέντρωσης σε αριθμό αντιγράφων σύμφωνα με τον τύπο (Whelan et al., 2003):

$$DNA(copy) = \frac{6.02 * 10^{23} (copiesmol^{-1}) * DNAamount (g)}{DNAlength(bp) * 660 (gmol^{-1}bp^{-1})}$$

$$FOW1 DNA copies = \frac{6.02 * 10^{23} (copiesmol^{-1}) * 438 * 10^{-9} (g)}{3240 (bp) * 660 (g * mol^{-1}bp^{-1})}$$

$$\approx 1,23 * 10^{11} copies$$

Τέλος, έγιναν διαδοχικές αραιώσεις για την κατασκευή των καμπυλών αναφοράς. Κατά την PCR πραγματικού χρόνου χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 3 επαναλήψεις από τις αραιώσεις 1,23x10⁷ έως 1,23x10⁰.

2.6.2.2. PCR πραγματικού χρόνου των μύκητων που ανήκουν στο είδος *Fusarium oxysporum*

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

Τα περιεχόμενα της αντίδρασης PCR πραγματικού χρόνου και οι συνθήκες πραγματοποίησης παραθέτονται στους παρακάτω πίνακες:

Πίνακας 15 Αντίδραση PCR πραγματικού χρόνου για τους μύκητες που ανήκουν στο είδος *Fusarium oxysporum*

Αντιδραστήρια	Όγκος (μl)	Τελική συγκέντρωση
KAPA SYBR® FAST qPCR Master Mix (2x)	5	1x
FOW1F (20μM)	0,1	0,2μM
FOW4R (20μM)	0,1	0,2μM
Rox Low (50x)	0,2	1x
BSA (10μg/μl)	0,4	400ng/μl
Template	3	
dH2O	1,2	
Τελικός όγκος	10	

Πίνακας 16 Συνθήκες πραγματοποίησης της αντίδρασης PCR πραγματικού χρόνου για τους μύκητες που ανήκουν στο είδος *Fusarium oxysporum*

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

2.6.3. Πειραματικό Μέρος - *Cladosporium sp.*

Προκειμένου να εκτιμηθεί η επίδραση του PALADIN® στους πληθυσμούς των μυκήτων του γένους *Cladosporium sp.* στο έδαφος πραγματοποιήθηκε PCR πραγματικού χρόνου στα δείγματα DNA από το πείραμα αγρού που περιγράφηκε παραπάνω. Στην περίπτωση αυτή χρησιμοποιήθηκε το ζευγάρι εκκινητών Clado-SYBRG-PF: 5'-TACTCCAATGGTCTAATATTTTCTCTC-3' and Clado-SYBRG-PR: 5'-GGGTACCTAGACA GTATTTCTAGCCT-3') (Zeng et al. 2006) για την ενίσχυση της μικρής μιτοχονδριακής rDNA υπομονάδας των μυκήτων. Η εξειδίκευση των συγκεκριμένων εκκινητών περιλαμβάνει τα κυριότερα φυτοπαθογόνα είδη που ανήκουν στο γένος *Cladosporium* όπως *C. cladosporioides*, *C. fulvum*, *C. cucumerinum*.

2.6.3.1. Κατασκευή της πρότυπης καμπύλης αναφοράς.

Για την απόλυτη ποσοτικοποίηση του αριθμού των αντιγράφων του γονιδιακού τόπου της μικρής μιτοχονδριακής rDNA υπομονάδας στα περιβαλλοντικά δείγματα, κατασκευάστηκαν καμπύλες αναφοράς όπως περιγράφηκε παραπάνω για το *F. oxysporum*.

$$\text{mt SSU rDNA copies} = \frac{6.02 * 10^{23} (\text{copies mol}^{-1}) * 358 * 10^{-9} (g)}{3015 (bp) * 660 (g * \text{mol}^{-1} bp^{-1})} \approx 10^{11} \text{ copies}$$

Τέλος, έγιναν διαδοχικές αραιώσεις για την κατασκευή των καμπυλών αναφοράς. Κατά την PCR πραγματικού χρόνου χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 3 επαναλήψεις από τις αραιώσεις 10^7 έως 10^0 .

2.6.3.2. PCR πραγματικού χρόνου του φυτοπαθογόνου μύκητα *Cladosporium*

Η PCR πραγματικού χρόνου πραγματοποιήθηκε σε σύστημα Mx3000P qPCR (Stratagen, UK) σε όλα τα περιβαλλοντικά δείγματα DNA καθώς και στη πρότυπη καμπύλη αναφοράς. Το τελικό προϊόν της ενίσχυσης που προέκυψε από την αντίδραση είχε μέγεθος 87 bp.

Τα περιεχόμενα της αντίδρασης PCR πραγματικού χρόνου και οι συνθήκες πραγματοποίησης παραθέτονται στους παρακάτω πίνακες:

Πίνακας 17 Αντίδραση PCR πραγματικού χρόνου για τους μύκητες που ανήκουν στο γένος *Cladosporium*

Αντιδραστήρια	Όγκος (μl)	Τελική συγκέντρωση
KAPA SYBR® FAST qPCR Master Mix (2x)	5	1x
CladoSYBRG-P F (20μM)	0,2	0,4μM
CladoSYBRG-P R (20μM)	0,2	0,4μM
Rox Low (50x)	0,2	1x
BSA (10μg/μl)	0,4	400ng/μl
Template	1	
dH2O	3	
Τελικός όγκος	10	

Πίνακας 18 Συνθήκες πραγματοποίησης της αντίδρασης PCR πραγματικού χρόνου για τους μύκητες που ανήκουν στο γένος *Cladosporium*

	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος	Κύκλοι
Ενεργοποίηση ενζύμου	95	3min	1
Αποδιάταξη	95	15sec	40
Υβριδοποίηση/Επιμήκυνση	68	30sec	
Καμπύλη Αποδιάταξης	95	1min	1
	55	30sec	
	95	30sec	

2.6.4. Πειραματικό Μέρος - *Rhizoctonia solani*

Προκειμένου να εκτιμηθεί η επίδραση του PALADIN® στους πληθυσμούς των μυκήτων του είδους *R. solani* στο έδαφος πραγματοποιήθηκε PCR πραγματικού χρόνου στα δείγματα DNA από το πείραμα αγρού που περιγράφηκε παραπάνω. Στην περίπτωση αυτή χρησιμοποιήθηκαν το ζευγάρι εκκινητών ST-RS1 – ITS4 για την ενίσχυση του γονιδιακού τύπου ITS (Lievens et al. 2005).

2.6.4.1. Κατασκευή της πρότυπης καμπύλης αναφοράς.

Για την απόλυτη ποσοτικοποίηση του αριθμού των αντιγράφων του γονιδιακού τύπου ITS του *R. solani* στα περιβαλλοντικά δείγματα κατασκευάστηκαν καμπύλες αναφοράς όπως έχει ήδη περιγραφεί αναλυτικά παραπάνω για το *F. oxysporum*.

$$ITS \text{ DNA copies} = \frac{6.02 * 10^{23} (\text{copies mol}^{-1}) * 320 * 10^{-9} (\text{g})}{3202 (\text{bp}) * 660 (\text{g} * \text{mol}^{-1} \text{bp}^{-1})} \approx 10^{11} \text{copies}$$

Τέλος, έγιναν διαδοχικές αραιώσεις για την κατασκευή των καμπυλών αναφοράς. Κατά την PCR πραγματικού χρόνου χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 3 επαναλήψεις από τις αραιώσεις 10^8 έως 10^0 .

2.6.4.2. PCR πραγματικού χρόνου των μυκητών που ανήκουν στο είδος *Rhizoctonia solani*

Η PCR πραγματικού χρόνου πραγματοποιήθηκε σε σύστημα Mx3000P qPCR (Stratagen, UK) σε όλα τα περιβαλλοντικά δείγματα καθώς και στη πρότυπη καμπύλη αναφοράς. Το τελικό προϊόν της ενίσχυσης που προέκυψε από την αντίδραση είχε μέγεθος 145 bp.

Τα περιεχόμενα PCR πραγματικού χρόνου και οι συνθήκες πραγματοποίησης παραθέτονται στους παρακάτω πίνακες:

Πίνακας 19 Αντίδραση PCR πραγματικού χρόνου για τους μύκητες που ανήκουν στο είδος *Rhizoctonia solani*

Αντιδραστήρια	Όγκος (μl)	Τελική συγκέντρωση
KAPASYBR® FASTqPCRMasterMix (2x)	5	1x
ST-RS1 (20μM)	0,1	0,2μM
ITS4 (20μM)	0,1	0,2μM
RoxLow (50x)	0,2	1x
BSA (10μg/μl)	0,4	400ng/μl
Template	3	
dH2O	1,2	
Τελικός όγκος	10	

Πίνακας 20 Συνθήκες πραγματοποίησης της αντίδρασης PCR πραγματικού χρόνου για τους μύκητες που ανήκουν στο είδος *Rhizoctonia solani*

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

2.7. Στατιστική επεξεργασία των δεδομένων

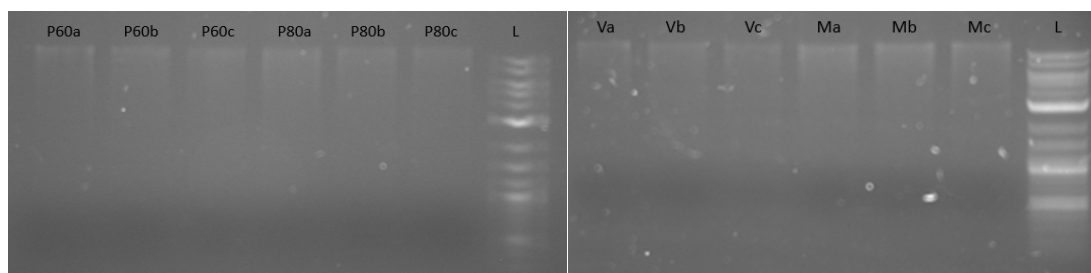
Τα δεδομένα από την εκτίμηση του πληθυσμού των τριών φυτοπαθόνων μυκήτων στο έδαφος αναλύθηκαν με Ανάλυση Παραλλακτικότητας Δύο Μεταβλητών (Two-WayANOVA) όπου ο χρόνος και η μεταχείριση αποτελούσαν τις δύο ανεξάρτητες μεταβλητές. Σε περιπτώσεις όπου εντοπίστηκε στατιστικά σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο ανεξάρτητων μεταβλητών πραγματοποιήθηκε PostHoc Duncan Test ώστε να διερευνηθούν σημαντικές

διαφορές μεταξύ των μεταχειρίσεων σε κάθε χρονικό σημείο. Για την στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πακέτο SPSS 20v.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

3.1. Εκχύλιση ολικού DNA από δείγματα εδαφών

Αρχικά πραγματοποιήθηκε εξαγωγή DNA από τα δείγματα εδάφους. Για τον έλεγχο της απόδοσης της εξαγωγής, μια ποσότητα από τα δείγματα DNA ηλεκτροφορήθηκε σε πηκτή αγαρόζης 0.7% (Εικόνα 44,5)Εικόνα 4



Εικόνα 4,5 Ενδεικτικές εικόνες ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αγαρόζης 0,8% του εκχυλισμένου DNA από δείγματα εδάφους (120 ημέρες μετά την εφαρμογή των καπνιστικών), L: 10kb DNA Ladder, DNA από δείγματα εδάφους με (P60a,b,c): εφαρμογή του σκευάσματος PALADIN® σε δοσολογία 60 kg/ha, (P80a,b,c): εφαρμογή του σκευάσματος PALADIN® σε δοσολογία 80 kg/ha, (Va,b,c): εφαρμογή του σκευάσματος Varam στην συνστώμενη δόση, (Ma,b,c): χωρίς γεωργικό φάρμακο/μάρτυρας

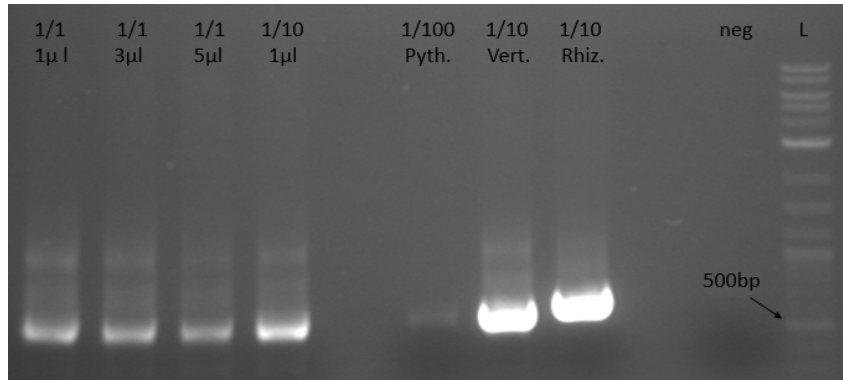
Η συγκέντρωση του εκχυλισμένου DNA κάθε δείγματος χώματος μετρήθηκε με φωτομέτρηση στα 260nm (Πίνακας 21)

Πίνακας 21 Συγκεντρώσεις των DNA (ng/μl) που εκχυλίστηκαν από τα δείγματα εδάφους

Μεταχειρίσεις	Χρόνος (ημέρες)			
	0	20	60	120
Μάρτυρας	6,35	3,35	1,61	7,69
PALADIN® 60	1,99	1,61	1,14	3,43
PALADIN® 80	1,81	1,20	1,08	3,21
VAPAM	1,65	0,96	1,19	3,19

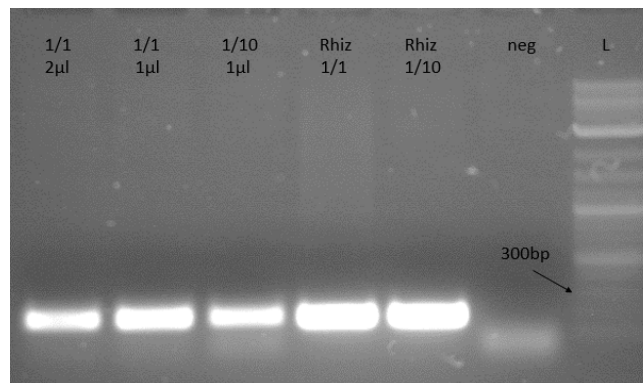
3.2. Αποτελέσματα PCR για το σχηματισμό των βιβλιοθηκών κλώνων

Για την ενίσχυση της ITS περιοχής του γονιδιώματος των μυκήτων του εδάφους χρησιμοποιήθηκαν οι παγκόσμιοι εκκνητές ITS1F – ITS4. Το προϊόν αυτής της ενίσχυσης είναι 600-700 bp. (Εικόνα 6)



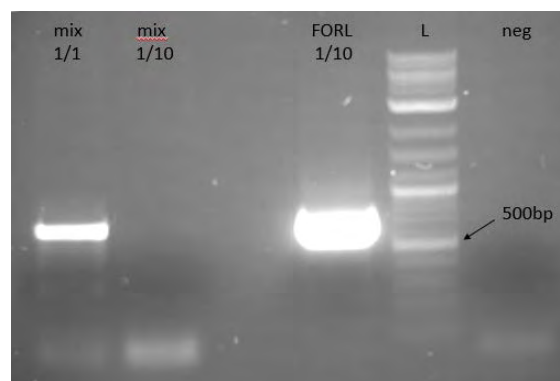
Εικόνα 6 Ενδεικτική εικόνα ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αγαρόζης 1% των PCR προϊόντων της ITS περιοχής του γονιδιώματος των μυκήτων του εδάφους. L: 10kb DNA Ladder, 1/1 1μl - 1/1 5μl: PCR προϊόν από διαφορετικές ποσότητες του μείγματος DNA του χρόνου 0 ημέρες, 1/10 1μl: PCR προϊόν από το μείγμα DNA αραιωμένο δέκα φορές, 1/100 Pyth, 1/10 Vert, 1/10 Rhiz: PCR προϊόντα του DNA των μυκήτων *Pythiumultimum*, *Verticilliumdahliae* και *Rhizoctoniasolani*. neg: Αρνητικός μάρτυρας

Για την ενίσχυση της ITS περιοχής του γονιδιώματος των μυκήτων που ανήκουν στο είδος *Rhizoctonia solani* χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές ST-RS1 και ITS4. Το προϊόν αυτής της ενίσχυσης είναι 200-300bp. (Εικόνα 7)



Εικόνα 7 Ενδεικτική εικόνα ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αγαρόζης 1,2% των PCR προϊόντων ITS περιοχής του γονιδιώματος των μυκήτων που ανήκουν στο είδος *Rhizoctonia solani*. L: 10kb DNA Ladder, 1/1 2μl και 1/1 1μl: PCR προϊόν από διαφορετικές ποσότητες του μείγματος DNA του χρόνου 0 ημέρες, 1/10 1μl: PCR προϊόν από το μείγμα DNA του χρόνου 0 ημέρες αραιωμένο δέκα φορές, Rhiz1/1 και 1/10: PCR προϊόντα του DNA του μύκητα *Rhizoctonia solani* στην αρχική του ποσότητα και αραιωμένο δέκα φορές, neg: Αρνητικός μάρτυρας

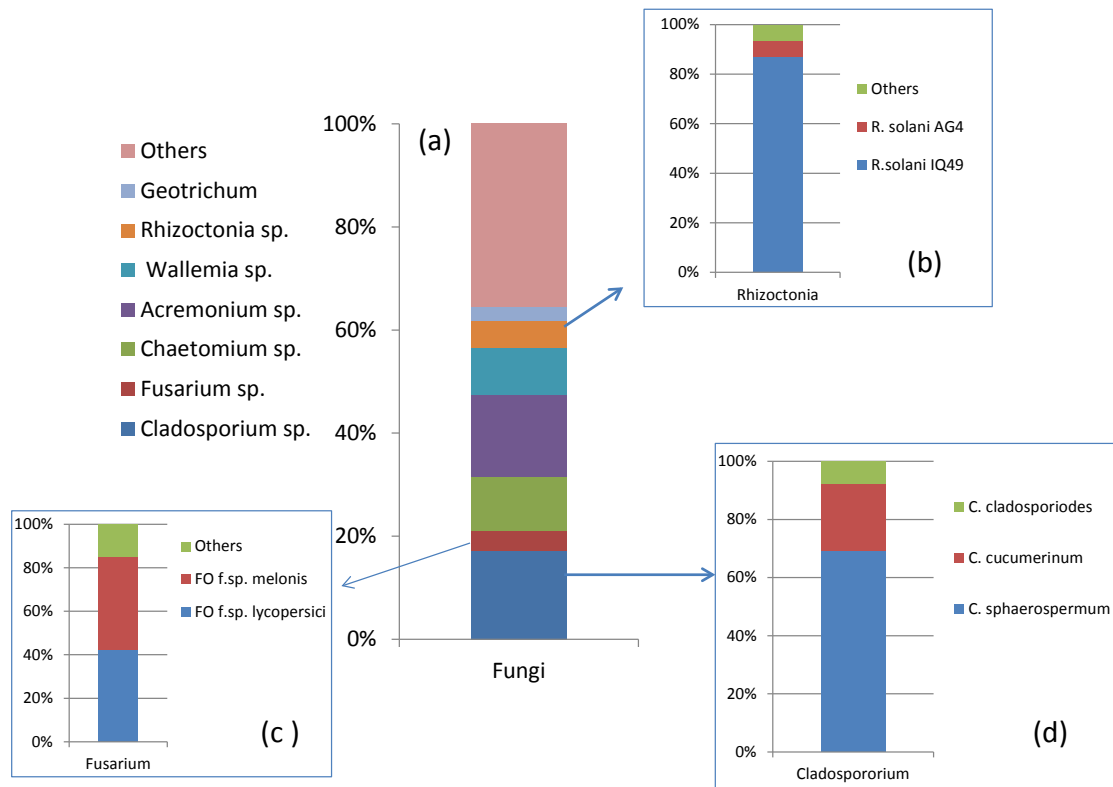
Για την ενίσχυση του γονιδίου της ενδοπολυγακτουρονάσης (rg1) των μυκήτων του είδους *Fusarium oxysporum* χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές unif και unir. Το προϊόν αυτής της ενίσχυσης είναι 670 bp. (Εικόνα 8)



Εικόνα 8 Ενδεικτική εικόνα ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αгарόζης 1,2% των PCR προϊόντων γονιδίου της *rg1* των μυκήτων του είδους *Fusarium oxysporum*. L: 10kb DNA Ladder, mix1/1 και 1/10: PCR προϊόν από διαφορετικές αραιώσεις του μείγματος DNA του χρόνου 0 ημέρες, FORL 1/10: PCR προϊόν του DNA του μύκητα FORLαραιωμένο δέκα φορές, neg: Αρνητικός μάρτυρας

3.3. Εκτίμηση της ποικιλότητας των εδαφογενών φυτοπαθογόνων μυκήτων στο έδαφος

Από τα αποτελέσματα της βιβλιοθήκης κλώνων προέκυψε ότι η κοινότητα των μυκήτων στο έδαφος του αγρού όπου πραγματοποιήθηκε το πείραμα αποτελείται κυρίως από διάφορους σαπροφυτικούς μύκητες που δεν αποτελούν φυτοπαθογόνα όπως *Acremonium*, *Chaetomium* ενώ μύκητες που παρουσιάζουν φυτοπαθογόνες ιδιότητες και ανιχνεύθηκαν έστω και με χαμηλή συχνότητα ανήκουν στα γένη *Fusarium* (κυρίως *F. oxysporum*), *Rhizoctonia* sp. και *Cladosporium* με κυρίαρχο είδος το *C. sphaerospermum*, που δεν παρουσιάζει φυτοπαθογόνο δράση, αλλά και ανίχνευση των φυτοπαθογόνων ειδών *C. cucumerinum* και *C. cladosporioides* (Γράφημα 1 α και d)



Γράφημα 1 Εκτίμηση της συνολικής ποικιλότητας των μυκήτων στο έδαφος από το θερμοκήπιο όπου πραγματοποιήθηκε το πείραμα (α) και της ποικιλότητας επιλεγμένων εδαφογενών φυτοπαθογόνων μυκήτων όπως *Rhizoctonia solani* (b), *Fusarium oxysporum* (c), *Cladosporium* sp. (d)

Οι επόμενες βιβλιοθήκες κλώνων που δημιουργήθηκαν στοχεύοντας στα είδη *R. solani* και *F. oxysporum* έδειξαν ότι στα δύο εδάφη κυριαρχούσαν συγκεκριμένα στελέχη – παθότυποι. Έτσι μεταξύ των *Rhizoctonia* sp. κυρίαρχο ήταν το στέλεχος *R. solani* IQ49 που είχε απομονωθεί από καλλιέργεια τομάτας σε περιοχή του Ιράν (Γράφημα 1b), ενώ μεταξύ των *F. oxysporum* κυρίαρχοι παθότυποι που ανιχνεύτηκαν ήταν τα *F.oxysporum* f.sp. *melonis* και *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*

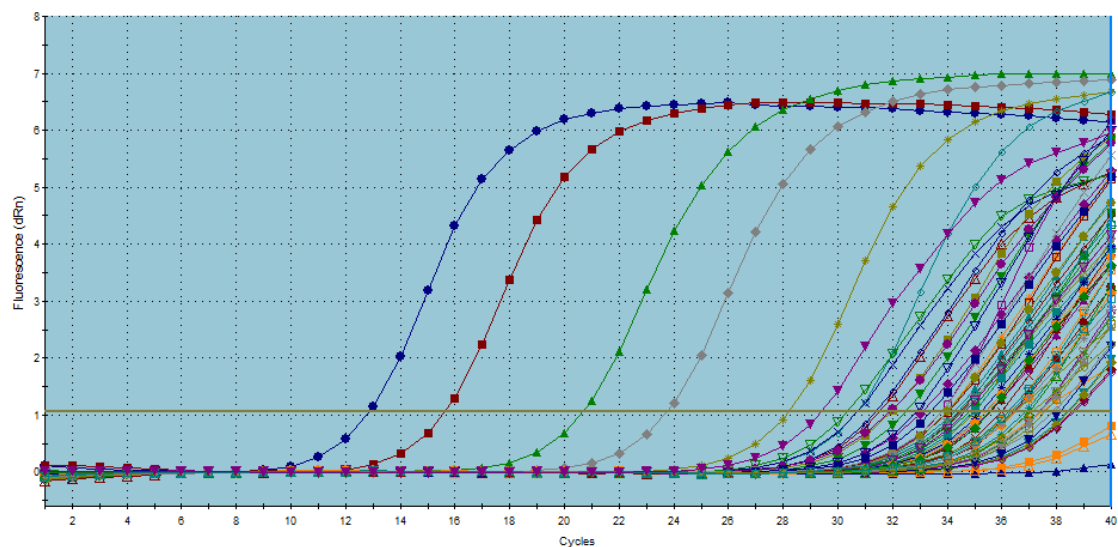
που αποτελούν φυτοπαθογόνα του πεπονιού (Mirtalebi, Banhashemi, and Linde 2013) και της τομάτας αντίστοιχα (Cai et al. 2003)(Γράφημα 1c). Η ανίχνευση του παθότυπου *F. oxysporum f.sp. melonis* δεν είναι έκπληξη καθώς οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή της βιβλιοθήκης κλώνων μπορούσαν να ενισχύσουν και τους συγκεκριμένους παθότυπους εκτός αυτών που προσβάλλουν τη τομάτα (Hirano and Arie 2006). Η παρουσία τους όμως γενικότερα μπορεί να αποδοθεί σε προηγούμενες καλλιέργειες πεπονιού ή άλλων κολοκυνθοειδών στο συγκεκριμένο θερμοκήπιο.

3.4. Επίδραση του PALLADIN^(R) στον πληθυσμό των εδαφογενών φυτοπαθογόνων μυκήτων

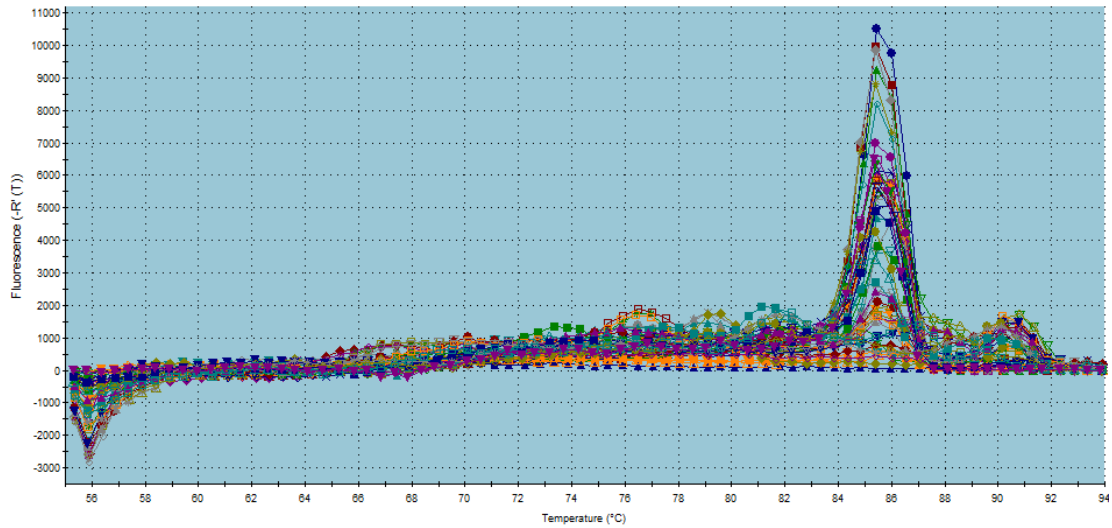
3.4.1. Επίδραση του PALADIN[®] στον πληθυσμό του μύκητα *Fusarium oxysporum* στο έδαφος

Η ποσοτικοποίηση του πληθυσμού των μυκήτων που ανήκουν στο είδος *Fusarium oxysporum* στα περιβαλλοντικά δείγματα έγινε με PCR πραγματικού χρόνου στοχεύοντας στο γονίδιο FOW1. Ο προσδιορισμός του αριθμού των αντιγράφων του γονιδίου FOW1 στα δείγματα έγινε με την χρήση καμπύλης αναφοράς που κατασκευάστηκε από τις διαδοχικές αραιώσεις $1,23 \times 10^7$ έως $1,23 \times 10^0$ των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων που περιέχουν το γονίδιο FOW1.

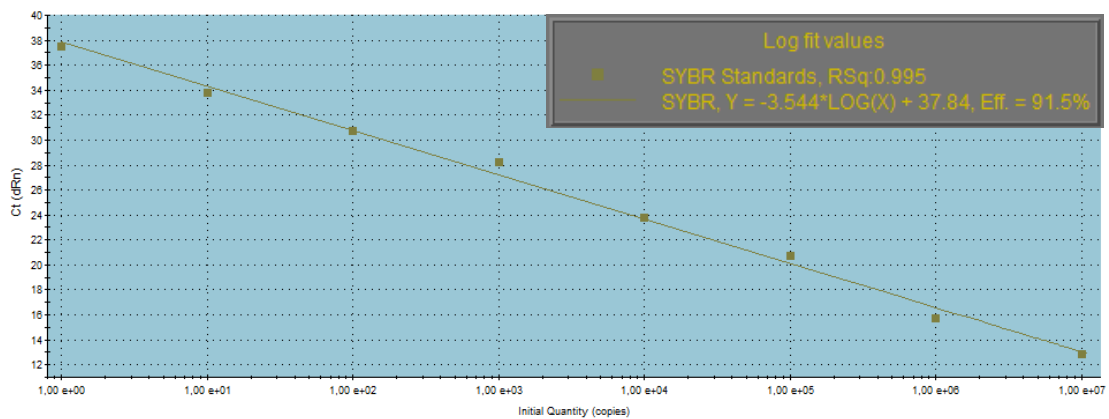
Ακολουθούν οι καμπύλες ενίσχυσης, αποδιάταξης και αναφοράς της PCR πραγματικού χρόνου για την εκτίμηση του πληθυσμού του *F. oxysporum* στο έδαφος (Εικόνα 9 Εικόνα 10 Εικόνα 11)



Εικόνα 9 Καμπύλη ενίσχυσης του γονιδίου FOW1



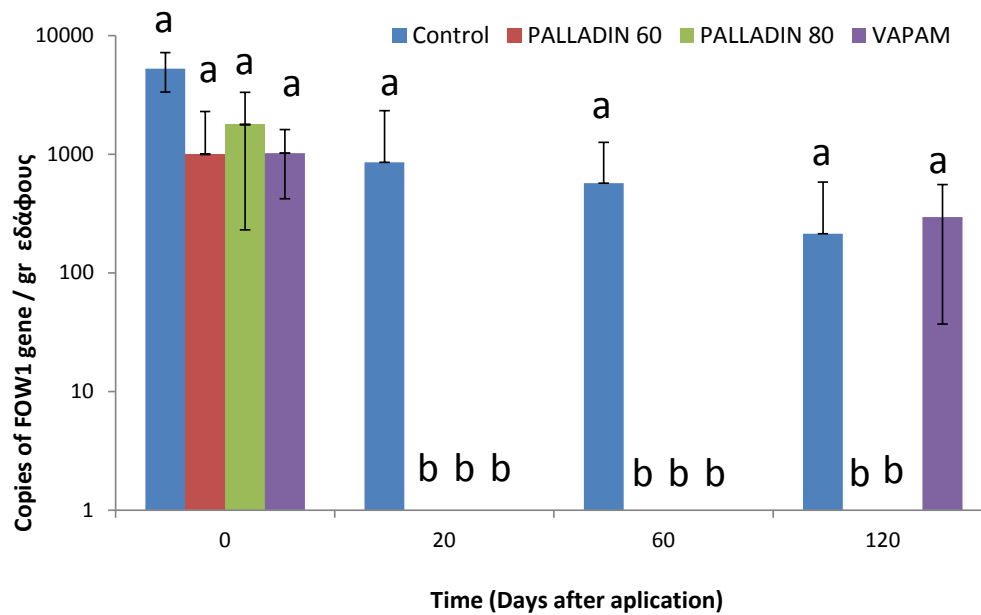
Εικόνα 10 Καμπύλη αποδιάταξης του γονιδίου FOW1



Εικόνα 11 Καμπύλη αναφοράς του γονιδίου FOW1

Η καμπύλη αναφοράς παρουσίασε γραμμικότητα ($r^2 = 0.995$) στο εύρος $1 - 10^7$ αντίγραφα του γονιδίου FOW1/μl DNA με αποτελεσματικότητα 91,5% και συντελεστή $\alpha = -3.544$. (Εικόνα 11)

Στην Γράφημα 2 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από την εκτίμηση του πληθυσμού των μυκήτων του είδους *F. oxysporum* στο έδαφος ύστερα από την εφαρμογή των καπνιστικών.



Γράφημα 2 Η επίδραση των PALADIN® και VAPAM στον πληθυσμό μυκήτων που ανήκουν στο είδος *Fusarium oxysporum*. Κάθε μέτρηση είναι ο μέσος όρος τεσσάρων επαναλήψεων + την τυπική απόκλιση. Σε κάθε χρόνο, μεταχειρίσεις που έχουν το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν σημαντικά ($p > 0.05$).

Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έδειξε ότι υπήρχαν σημαντικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μεταχειρίσεων, ως κύριες μεταβλητές, στον πληθυσμό του *F. oxysporum*. Συγκεκριμένα παρατηρήθηκε σημαντική μείωση ($p < 0.05$) του πληθυσμού του *F. oxysporum* στις μεταχειρίσεις PALADIN® 60, PALADIN® 80 και VAPAM σε σχέση με τον μάρτυρα ανεξάρτητα από τον χρόνο δειγματοληψίας. Παρατηρήθηκαν επίσης και σημαντικές αλληλεπιδράσεις ($p < 0.05$) μεταξύ των δύο κυρίων μεταβλητών και περαιτέρω ανάλυση μεταξύ μεταχειρίσεων σε κάθε χρόνο ανέδειξε μια σημαντική μείωση του πληθυσμού του *F. oxysporum* μετά την εφαρμογή των καπνιστικών PALADIN® (και στις δύο δόσεις) και VAPAM σε σχέση με τον μάρτυρα. Η μείωση που επήλθε από την εφαρμογή του PALADIN® ήταν καθολική και περιορίσε τον πληθυσμό του *F. oxysporum* σε επίπεδα χαμηλότερα από το όριο ανίχνευσης της μεθόδου για όλη την διάρκεια του πειράματος, δηλαδή 120 ημέρες μετά την εφαρμογή του φαρμάκου. Αντίθετα, η ανασταλτική επίδραση του VAPAM διήρκεσε τουλάχιστον 60 ημέρες και ο πληθυσμός του *F. oxysporum* επανήλθε σε επίπεδα παρόμοια με του μάρτυρα στις 120 ημέρες.

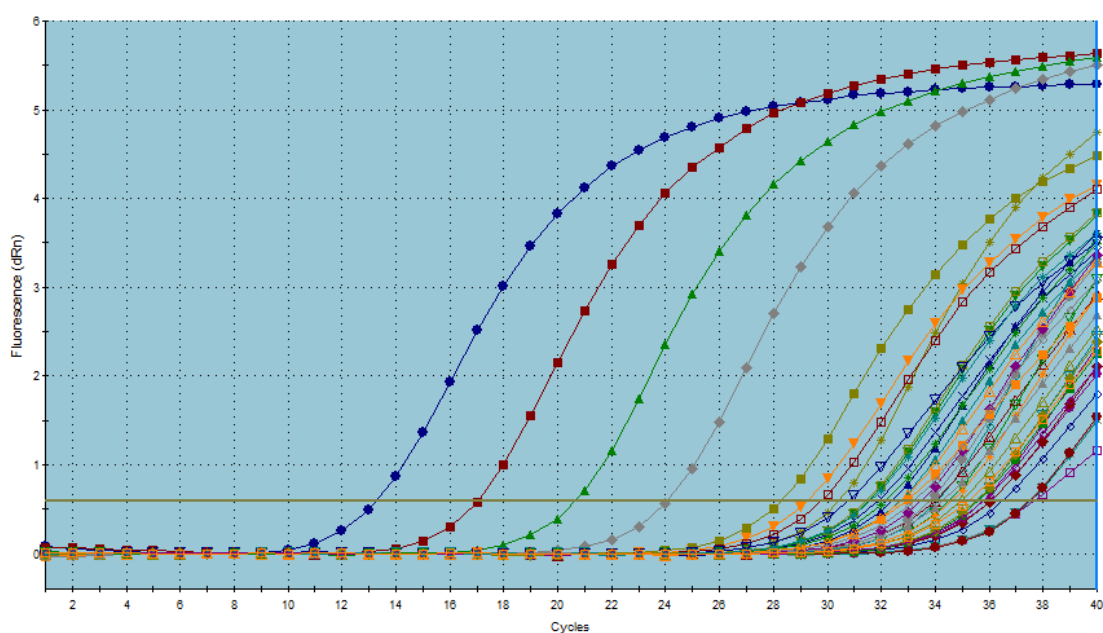
Το είδος *F. oxysporum* περιλαμβάνει ιδιαίτερα καταστρεπτικά φυτοπαθογόνα εδάφους (Li et al. 2014) και ο περιορισμός του πληθυσμού τους σε επίπεδα που δεν προκαλούν σημαντικά προβλήματα στις καλλιέργειες κηπευτικών αποτελεί ένα σημαντικό φυτοπροστατευτικό στόχο. Στο έδαφος όπου πραγματοποιήθηκε το πείραμα κυρίαρχοι παθότυποι του είδους *F. oxysporum* ήταν τα *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* και *F. oxysporum* f.sp. *melonis* παθογόνα της τομάτας και του πεπονιού αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα μας έδειξαν ότι το PALLADIN, ακόμη και στην χαμηλή δόση, ήταν ικανό να περιορίσει καθολικά και για το μεγαλύτερο τμήμα της καλλιεργητικής περιόδου τον πληθυσμό του *F. oxysporum* στο έδαφος. Είναι μάλιστα αξιοσημείωτο ότι το PALLADIN παρουσίασε μεγαλύτερη διάρκεια στην

δράση του έναντι του έτερου καπνιστικού που αξιολογήθηκε του VAPAM. Τα παραπάνω αποτελέσματα είναι σύμφωνα με πρόσφατα ευρήματα των Li et al (2014) που έδειξαν ότι το PALLADIN είτε μόνο του αλλά ειδικότερα σε συνδυασμό με chloropicrin κατάφερε ικανοποιητικό έλεγχο του *F. oxysporum* με τα επίπεδα αποτελεσματικότητας να είναι 54-58% (DMDS), 77-79% (DMDS:Chloropicrin 2:1) και 87-88% (DMDS:Chloropicrin 1:2). Αντίθετα, πειράματα αγρού από τον Gerik, (2005) έδειξαν ότι το DMDS είτε μόνο είτε σε συνδυασμό με chloropicrin δεν προκάλεσε σημαντική μείωση του πληθυσμού του *F. oxysporum*. Θα πρέπει να τονιστεί βέβαια ότι στην συγκεκριμένη μελέτη καμία από τις μεταχειρίσεις συμπεριλαμβανομένου και άλλων καπνιστικών όπως chloropicrin, metham sodium και συνδυασμοί αυτών δεν μείωσαν αποτελεσματικά τους πληθυσμούς του συγκεκριμένου παθογόνου.

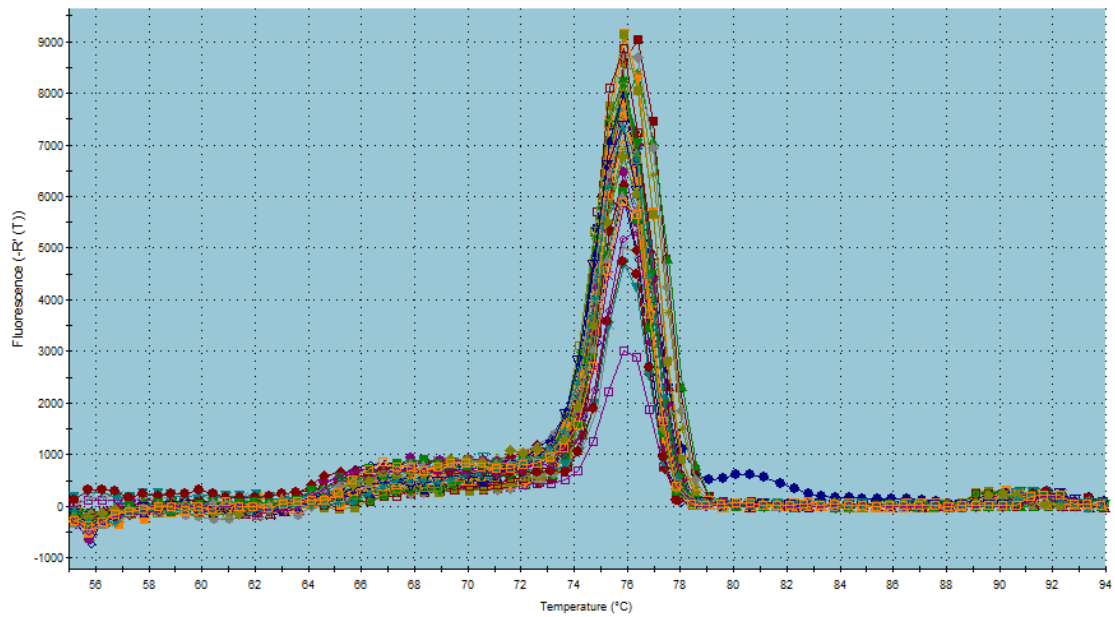
3.4.2. Επίδραση του PALADIN® στον πληθυσμό του μύκητα *Cladosporium* sp. στο έδαφος

Η ποσοτικοποίηση του πληθυσμού των μυκήτων που ανήκουν στο γένος *Cladosporium* sp. στα περιβαλλοντικά δείγματα έγινε με PCR πραγματικού χρόνου στοχεύοντας στη μικρή μιτοχονδριακή rDNA υπομονάδα (mtSSUrDNA) των μυκήτων του γένους *Cladosporium* sp. Ο προσδιορισμός του αριθμού των αντιγράφων του γονιδιακού τόπου mtSSUrDNA στα δείγματα έγινε με την χρήση καμπύλης αναφοράς που κατασκευάστηκε από τις διαδοχικές αραιώσεις 10^7 έως 10^0 των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων που περιέχουν τον γονιδιακό τόπο mtSSUrDNA.

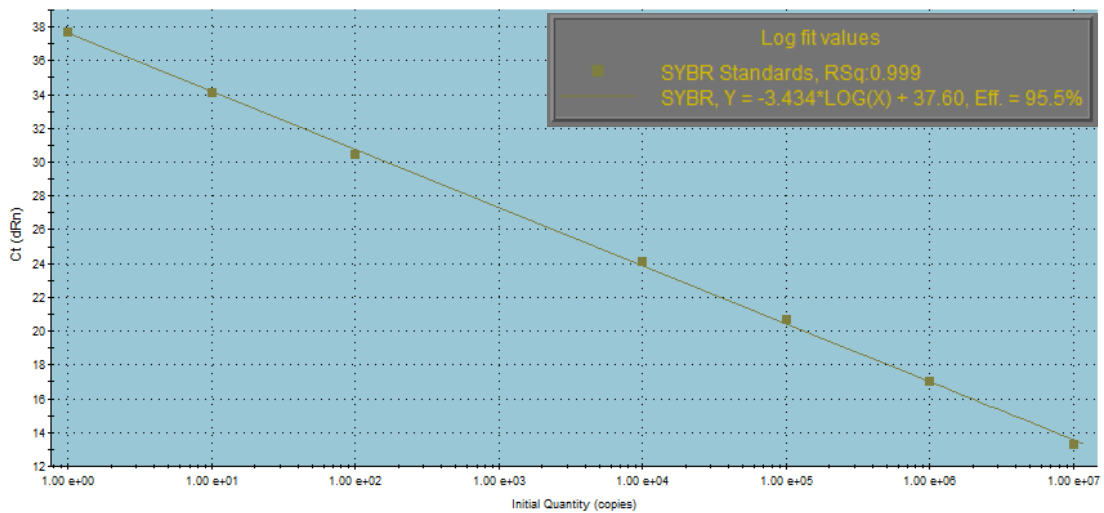
Ακολουθούν οι καμπύλες ενίσχυσης, αποδιάταξης και αναφοράς της PCR πραγματικού χρόνου για την εκτίμηση του πληθυσμού του των μυκήτων του γένους *Cladosporium* sp. στο έδαφος. (Εικόνα 12 Εικόνα 13 Εικόνα 14)



Εικόνα 12 Καμπύλη ενίσχυσης του γενετικού τόπου mtSSUrDNA των μυκήτων που ανήκουν στο γένος *Cladosporium* sp.



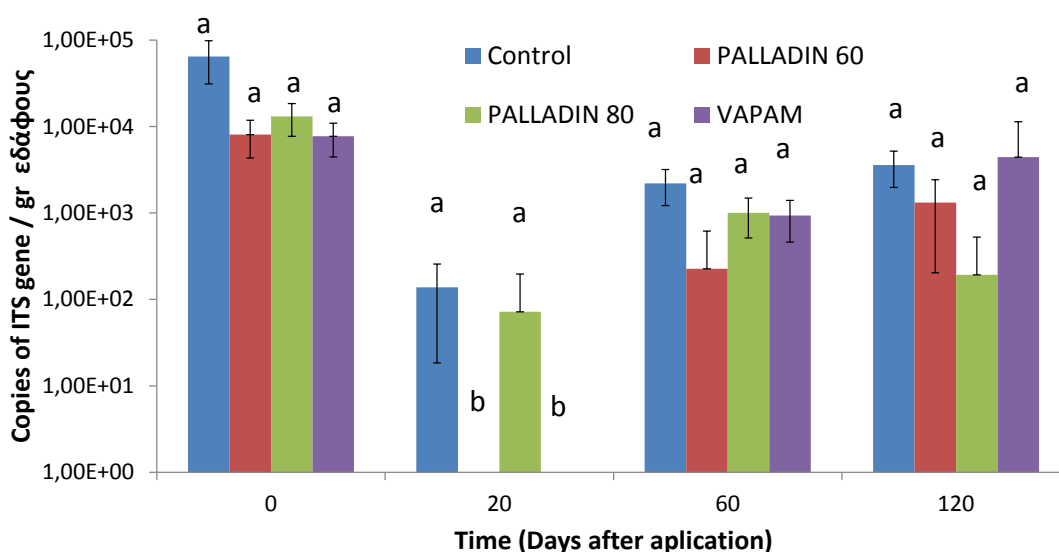
Εικόνα 13 Καμπύλη αποδιάταξης του γενετικού τύπου *mtSSU rDNA* των μυκητών που ανήκουν στο γένος *Cladosporium sp.*



Εικόνα 14 Καμπύλη αναφοράς του γενετικού τύπου *mtSSU rDNA* των μυκητών που ανήκουν στο γένος *Cladosporium sp.*

Η καμπύλη αναφοράς παρουσίασε γραμμικότητα ($r^2 = 0.999$) στο εύρος $1 - 10^7$ αντίγραφα *mtSSU rDNA* / μ l DNA με αποτελεσματικότητα = 95.5% και συντελεστή $\alpha = -3.434$.

Στην Γράφημα 3 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από την εκτίμηση του πληθυσμού των μυκήτων του γένους *Cladosporium* στο έδαφος ύστερα από την εφαρμογή των καπνιστικών.



Γράφημα 3 Η επίδραση των PALADIN® και VAPAM στον πληθυσμό μυκήτων που ανήκουν στο γένος *Cladosporium* συμπεριλαμβανομένων των *C. fulvum*, *C. cladosporioides*, *C. cucumerinum*. Κάθε μέτρηση είναι ο μέσος όρος τεσσάρων επαναλήψεων + την τυπική απόκλιση. Σε κάθε χρόνο, μεταχειρίσεις που έχουν το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν σημαντικά ($p > 0.05$).

Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έδειξε ότι υπήρχαν σημαντικές επιδράσεις τόσο του χρόνου όσο και των μεταχειρίσεων, ως κύριες μεταβλητές, στον πληθυσμό των μυκήτων του γένους *Cladosporium*. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε μια σημαντική μείωση ($p < 0.05$) του πληθυσμού των *Cladosporium* σε όλες τις μεταχειρίσεις με την πάροδο του χρόνου. Επίσης παρατηρήθηκε σημαντική μείωση ($p < 0.05$) του πληθυσμού των *Cladosporium* στην μεταχείριση PALADIN® 60 σε σχέση με τον μάρτυρα ανεξάρτητα από τον χρόνο δειγματοληψίας. Παρατηρήθηκαν επίσης και σημαντικές αλληλεπιδράσεις ($p < 0.05$) μεταξύ των δύο κυρίων μεταβλητών και περαιτέρω ανάλυση μεταξύ μεταχειρίσεων σε κάθε χρόνο ανέδειξε μια σημαντική μείωση του πληθυσμού του *Cladosporium* στις 20 ημέρες μετά την εφαρμογή του PALADIN® στην χαμηλή δόση και του VAPAM σε σχέση με τον μάρτυρα και το PALADIN® όταν εφαρμόστηκε στην υψηλή δόση. Η μείωση αυτή όμως ήταν παροδική και οι πληθυσμοί του *Cladosporium* επανήλθαν σε επίπεδα αντίστοιχα με αυτά του μάρτυρα σε όλες τις μεταχειρίσεις στις 60 και 120 ημέρες.

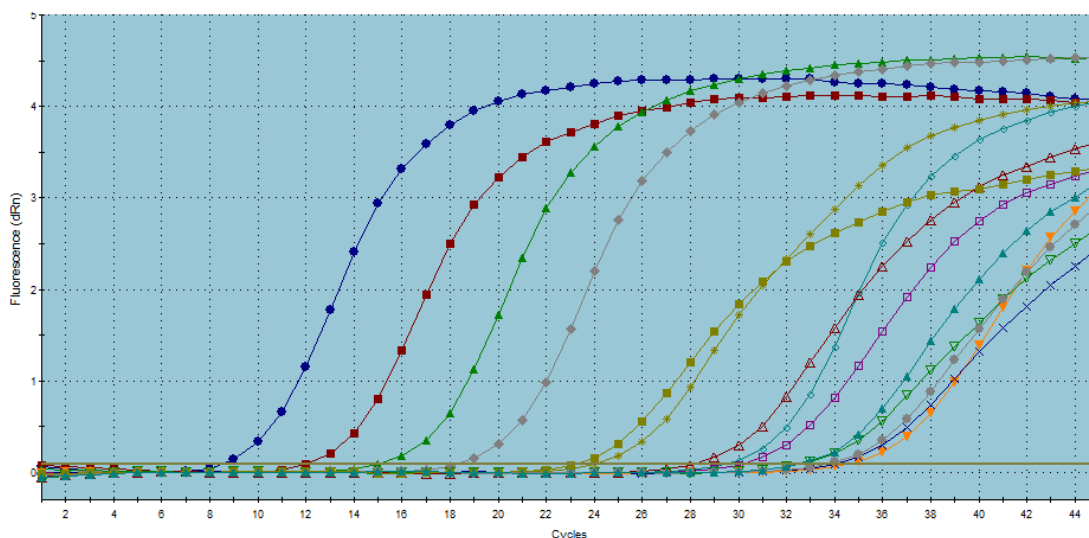
Τα συγκεκριμένα αποτελέσματα δείχνουν ότι το PALADIN® στην χαμηλότερη δόση προκάλεσε μια σημαντική μείωση του πληθυσμού των μυκήτων του γένους *Cladosporium* συμπεριλαμβανομένων και των φυτοπαθογόνων ειδών *C. fulvum*, *C. cladosporioides*, *C. cucumerinum* (Zeng et al. 2006) η οποία όμως ήταν παροδική αλλά πιθανότατα αρκετή ώστε να προστατεύσει τα φυτά τομάτας από προσβολές κατά τα πρώτα στάδια ανάπτυξης τους μετά την μεταφύτευση. Μύκητες του γένους *Cladosporium* προσβάλλουν το φύλλωμα διαφόρων οπωροκηπευτικών όπως τομάτα (*C. fulvum*), αγγούρι (*C. cucumerinum*) ενώ κάποια από αυτά όπως *C. cladosporioides*, *C. sphaerospermum* προσβάλλουν δευτερογενώς φυτά προσβεβλημένα από άλλους εχθρούς (Bensch et al. 2010). Αυτή είναι και η πρώτη

καταγραφή της επίδρασης του PALADIN® στους μύκητες του γένους *Cladosporium* sp.

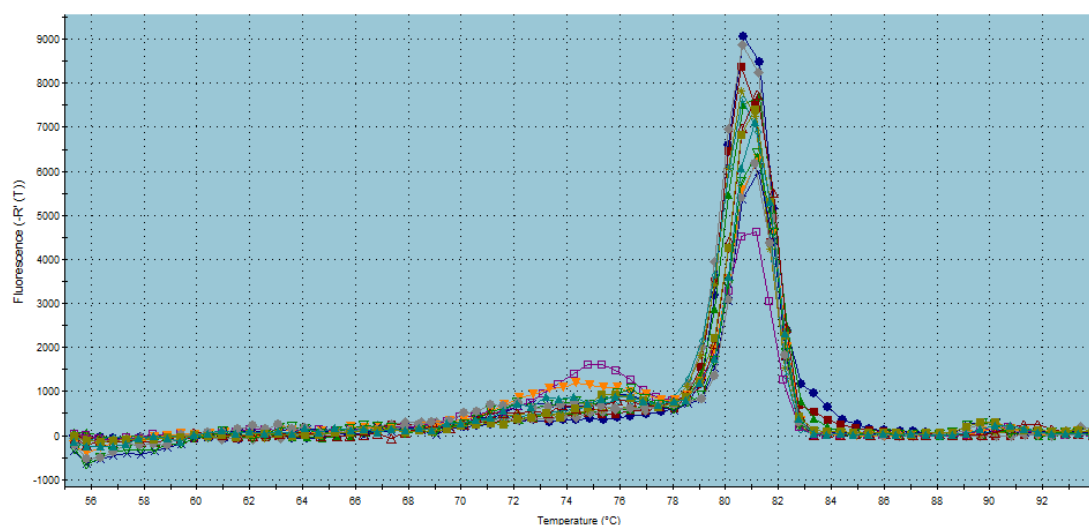
3.4.3. Επίδραση του PALADIN® στον πληθυσμό του μύκητα *Rhizoctonia solani* στο έδαφος

Η ποσοτικοποίηση του πληθυσμού των μυκήτων που ανήκουν στο είδος *Rhizoctonia solani* στα περιβαλλοντικά δείγματα έγινε με PCR πραγματικού χρόνου στοχεύοντας τη γενετική περιοχή ITS των μυκήτων που ανήκουν στο είδος *R. solani*. Ο προσδιορισμός του αριθμού των αντιγράφων του γονιδιακού τόπου ITS στα δείγματα έγινε με την χρήση καμπύλης αναφοράς που κατασκευάστηκε από τις διαδοχικές αραιώσεις 10^8 έως 10^0 των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων που περιέχουν τον γενετικό τόπο ITS.

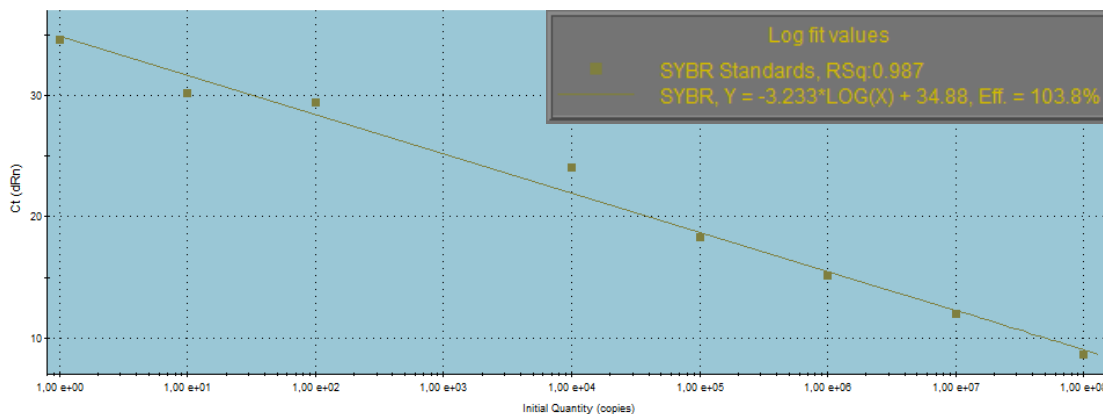
Ακολουθούν οι καμπύλες ενίσχυσης, αποδιάταξης και αναφοράς της PCR πραγματικού χρόνου για την εκτίμηση του πληθυσμού του *R. solani* στο έδαφος. (Εικόνα 15, Εικόνα 16, Εικόνα 17)



Εικόνα 15 Καμπύλη ενίσχυσης του γενετικού τόπου ITS των μυκήτων που ανήκουν στο είδος *R. solani*



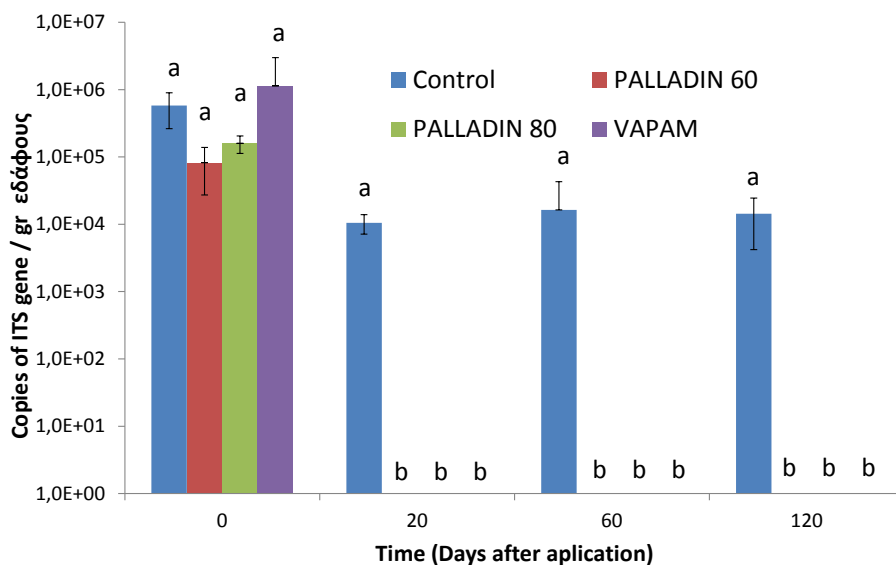
Εικόνα 16 Καμπύλη αποδιάταξης του γενετικού τόπου ITS των μυκήτων που ανήκουν στο είδος *R. solani*



Εικόνα 17 Καμπύλη αναφοράς του γενετικού τόπου ITS των μυκητών που ανήκουν στο είδος *R.solani*

Η καμπύλη αναφοράς παρουσίασε γραμμικότητα ($r^2 = 0.987$) στο εύρος $1 - 10^8$ αντίγραφα του γονιδιακού τόπου ITS/μl DNA με συντελεστή αποτελεσματικότητας = 103.8% και συντελεστή $\alpha = -3.233$.

Στο Γράφημα 4 παρουσιάζεται η επίδραση των καπνιστικών PALLADIN και VAPAM στον πληθυσμό του μύκητα *Rhizoctonia solani* στο έδαφος όπως προσδιορίστηκε με PCR πραγματικού χρόνου.



Γράφημα 4 Η επίδραση των PALLADIN® και VAPAM στον πληθυσμό του φυτοπαθογόνου μύκητα *Rhizoctonia solani*. Κάθε μέτρηση είναι ο μέσος όρος τεσσάρων επαναλήψεων + την τυπική απόκλιση. Σε κάθε χρόνο, μεταχειρίσεις που έχουν το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν σημαντικά ($p > 0.05$)

Συνολικά η εφαρμογή του PALLADIN® και στις δύο δόσεις αλλά και του VAPAM μείωσε δραστικά τον πληθυσμό του *Rhizoctonia solani* σε επίπεδα χαμηλότερα από το όριο ανίχνευσης της μεθόδου. Η μείωση που επέφεραν τα καπνιστικά εδάφους ήταν έμμονη και διήρκησε μέχρι τις 120 ημέρες από την εφαρμογή τους. Τα συγκεκριμένα αποτελέσματα καταδεικνύουν την αποτελεσματικότητα του PALLADIN® ακόμη και στην χαμηλή δοσολογία έναντι του φυτοπαθογόνου μύκητα *Rhizoctonia solani*.

Τα συγκεκριμένα αποτελέσματα είναι σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες από τον Fritsch (2004) που κατέγραψε 100% μείωση του πληθυσμού του *Rhizoctonia solani* ύστερα από την εφαρμογή DMDS. Μύκητες του είδους *Rhizoctonia solani* προσβάλλουν μεγάλο αριθμό φυτών που ανήκουν στις οικογένειες *Chinopodiaceae*, *Solanaceae*, *Cruciferae*, *Gramineae* και διαχωρίζονται σε 13 ομάδες αναστόμωσης (AG1-13) εκ των οποίων κάποιες από αυτές παρουσιάζουν εξειδίκευση ως προς το φυτό-ξενιστή που προσβάλλουν με τους μύκητες της ομάδας AG3 να προσβάλλουν τομάτα και άλλα *Solanaceae* (Tsror 2010).

4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στη παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της PCR πραγματικού χρόνου για τη μελέτη της επίδρασης του καπνιστικού σκευάσματος PALADIN® στους πληθυσμούς των εδαφογενών παθογόνων *Fusarium oxysporum*, *Cladosporium* sp. και *Rhizoctonia solani*. Προκειμένου να γίνει αυτό αναπτύχθηκαν τεχνικές PCR πραγματικού χρόνου όπου χρησιμοποιήθηκαν τα ζεύγη εκκινήτων FOW για τους μύκητες του είδους *F. oxysporum*, Clado-SYBRG-P για τους μύκητες του γένους *Cladosporium* και ST-RS1/ITS4 για τους μύκητες του είδους *Rhizoctonia solani*.

Το PALADIN® και στις δύο δόσεις που αξιολογήθηκαν παρουσίασε υψηλή αποτελεσματικότητα έναντι μυκήτων του είδους *F. oxysporum*. Η δραστηριότητα του καπνιστικού διήρκησε για το μεγαλύτερο μέρος της καλλιεργητικής περιόδου και διατήρησε του πληθυσμούς των συγκεκριμένων φυτοπαθογόνων μυκήτων σε χαμηλά επίπεδα για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα (120 ημέρες μετά την εφαρμογή) σε αντίθεση με το VAPAM του οποίου η δράση περιορίστηκε μετά τις πρώτες 60 ημέρες. Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται να προστεθούν στα αποτελέσματα προηγούμενων μελετών σχετικά με την επίδραση του DMDS στους μύκητες *F. oxysporum* (Li et al. 2014) η οποία φαίνεται να είναι θετική ως προς καταπολέμηση του παθογόνου.

Όσον αφορά τους μύκητες του γένους *Cladosporium*, παρούσα μελέτη είναι και η πρώτη που εξετάζει την επίδραση του DMDS σε μύκητες αυτού του γένους. Το PALADIN®, στην χαμηλότερη δόση που δοκιμάστηκε, περιόρισε πρόσκαιρα αλλά σε σημαντικό βαθμό τους πληθυσμούς των μυκήτων του γένους *Cladosporium* που προσβάλλουν το φύλλωμα κηπευτικών όπως η τομάτα και εμφάνισε αποτελεσματικότητα ανάλογη του VAPAM. Η παροδική αυτή μείωση που επέφερε το PALADIN® πιθανό να είναι ικανή να προστατεύσει τα φυτά τομάτας από προσβολές από τους συγκεκριμένους μύκητες κατά τα αρχικά στάδια ανάπτυξης τους αμέσως μετά την μεταφύτευση.

Το καπνιστικό PALADIN®, στην χαμηλότερη δόση που δοκιμάστηκε, περιόρισε δραστηρικά, σε όλη τη διάρκεια της καλλιεργητικής περιόδου τους πληθυσμούς του εδαφογενούς παθογόνου μύκητα *Rhizoctonia solani* παρουσιάζοντας αποτελεσματικότητα ανάλογη του καπνιστικού VAPAM. Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται να προστεθούν στα αποτελέσματα που αφορούν την επίδραση του DMDS

σε μύκητες του είδους *R. solani* (Fritsch 2004) η οποία φαίνεται να είναι θετική όσον αφορά την καταπολέμηση του συγκεκριμένου μύκητα.

4.1. Μελλοντικές μελέτες

Σε συνέχεια της μελέτης θα μπορούσε να εξεταστεί η επίδραση του κανπνιστικού σκευάσματος σε καλλιέργειες διαφόρων κηπευτικών υπό κάλυψη, όπως για παράδειγμα διαφόρων κολοκυνθοειδών, και σε εδάφη με υψηλή πίεση πληθυσμού ποικίλων εδαφογενών φυτοπαθογόνων μυκήτων όπως *Verticillium*, *Pythium*, *Sclerotinia* τα οποία δεν ανιχνεύθηκαν στο έδαφος του αγρού που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Aaij, C., and P. Borst. 1972. "The Gel Electrophoresis of DNA." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Nucleic Acids and Protein Synthesis* 269 (2): 192–200. doi:10.1016/0005-2787(72)90426-1.
- Anderson, N A. 1982. "The Genetics and Pathology of Rhizoctonia Solani." *Annual Review of Phytopathology* 20 (1): 329–47. doi:10.1146/annurev.py.20.090182.001553.
- Arnault, Ingrid, Christophe Fleurance, Frédéric Vey, Gaël Du Fretay, and Jacques Auger. 2013. "Use of Alliaceae Residues to Control Soil-Borne Pathogens." *Industrial Crops and Products* 49 (August): 265–72. doi:10.1016/j.indcrop.2013.05.007.
- Auger, J., and P. Charles. 2003. "Biogenic Emission, Biological Origin, and Mode of Action of DMDS, a Natural Ubiquitous Fumigant." In . The DoubleTree Hotel Mission Valley 7450 Hazard Center Drive San Diego, California 92108. <http://www.mbao.org/2003/138%20augerjmbao%20poster%20auger.pdf>.
- Balestra, G. M, and I. J Misaghi. 1997. "Increasing the Efficiency of the Plate Counting Method for Estimating Bacterial Diversity." *Journal of Microbiological Methods* 30 (2): 111–17. doi:10.1016/S0167-7012(97)00056-0.
- Becker, J. Ole, and Franz J. Schwinn. 1993. "Control of Soil-Borne Pathogens with Living Bacteria and Fungi: Status and Outlook." *Pesticide Science* 37 (4): 355–63. doi:10.1002/ps.2780370408.
- Becker, Sven, Peter Böger, Ralfh Oehlmann, and Anneliese Ernst. 2000. "PCR Bias in Ecological Analysis: A Case Study for Quantitative Taq Nuclease Assays in Analyses of Microbial Communities." *Applied and Environmental Microbiology* 66 (11): 4945–53. doi:10.1128/AEM.66.11.4945-4953.2000.
- Bending, Gary D., and Suzanne D. Lincoln. 2000. "Inhibition of Soil Nitrifying Bacteria Communities and Their Activities by Glucosinolate Hydrolysis Products." *Soil Biology and Biochemistry* 32 (8–9): 1261–69. doi:10.1016/S0038-0717(00)00043-2.
- Bensch, K., U. Braun, J.Z. Groenewald, and P.W. Crous. 2012. "The Genus *Cladosporium*." *Studies in Mycology* 72 (1): 1–401. doi:10.3114/sim0003.
- Bensch, K., J. Z. Groenewald, J. Dijksterhuis, M. Starink-Willemse, B. Andersen, B. A. Summerell, H. -D. Shin, et al. 2010. "Species and Ecological Diversity within

- the Cladosporium Cladosporioides Complex (Davidiellaceae, Capnodiales)." *Studies in Mycology* 67: 1–94. doi:10.3114/sim.2010.67.01.
- Besri, Mohamed. 2001. "NEW DEVELOPMENTS OF ALTERNATIVES TO METHYL BROMIDE FOR THE CONTROL OF TOMATO SOIL BORNE PATHOGENS IN COVERED CULTIVATION IN A DEVELOPING COUNTRY : MOROCCO." Rabat, Morocco: Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II. <http://mbao.org/2001proc/009%20Besri%20M%20MBAOSD2001.pdf>.
- Bogoescua, M., M. Doltu, and D. Sora. 2014. "Prevention and Control of Soilborne Diseases and Nematodes in Eggplants Crop by Grafting Plants Combined with Soil Fumigation." *ISHS Acta Horticulturae*. <http://www.actahort.org/members/showpdf?session=26944>.
- Borneman, J., P. W. Skroch, K. M. O'Sullivan, J. A. Palus, N. G. Rumjanek, J. L. Jansen, J. Nienhuis, and E. W. Triplett. 1996. "Molecular Microbial Diversity of an Agricultural Soil in Wisconsin." *Applied and Environmental Microbiology* 62 (6): 1935–43.
- Brody, Jonathan R., and Scott E. Kern. 2004. "History and Principles of Conductive Media for Standard DNA Electrophoresis." *Analytical Biochemistry* 333 (1): 1–13. doi:10.1016/j.ab.2004.05.054.
- Brown, John, and David Guest. 1997. "Infection Processes." In *Plant Pathogens and Plant Diseases*. Vol. Part III. Australasian Plant Pathology Society. [http://www.appsnet.org/Publications/Brown_Ogle/16%20Infection%20processes%20\(DIG&JFB\).pdf](http://www.appsnet.org/Publications/Brown_Ogle/16%20Infection%20processes%20(DIG&JFB).pdf).
- Brunk, Clifford F., and Larry Simpson. 1977. "Comparison of Various Ultraviolet Sources for Fluorescent Detection of Ethidium Bromide-DNA Complexes in Polyacrylamide Gels." *Analytical Biochemistry* 82 (2): 455–62. doi:10.1016/0003-2697(77)90183-X.
- Budge, G. E., M. W. Shaw, A. Colyer, S. Pietravalle, and N. Boonham. 2009. "Molecular Tools to Investigate Rhizoctonia Solani Distribution in Soil." *Plant Pathology* 58 (6): 1071–80. doi:10.1111/j.1365-3059.2009.02139.x.
- Burdon, JJ, and GA Chilvers. 1975. "A Comparison Between Host Density and Inoculum Density Effects on the Frequency of Primary Infection Foci in Pythium-Induced Damping-Off Disease." *Australian Journal of Botany* 23 (6): 899–904.
- Cai, G., L. Rosewich Gale, R. W. Schneider, H. C. Kistler, R. M. Davis, K. S. Elias, and E. M. Miyao. 2003. "Origin of Race 3 of Fusarium Oxysporum F. Sp. Lycopersici at a Single Site in California." *Phytopathology* 93 (8): 1014–22. doi:10.1094/PHYTO.2003.93.8.1014.
- Duniway, J. M. 2002. "Status of Chemical Alternatives to Methyl Bromide for Pre-Plant Fumigation of Soil." *Phytopathology* 92 (12): 1337–43. doi:10.1094/PHYTO.2002.92.12.1337.
- Edel, Véronique, Christian Steinberg, Nadine Gautheron, Ghislaine Recorbet, and Claude Alabouvette. 2001. "Genetic Diversity of Fusarium Oxysporum Populations Isolated from Different Soils in France." *FEMS Microbiology Ecology* 36 (1): 61–71. doi:10.1111/j.1574-6941.2001.tb00826.x.
- El-Mougy, Nehal S., Nadia G. El-Gamal, and Mokhtar M. Abdel-Kader. 2007. "CONTROL OF WILT AND ROOT ROT INCIDENCE IN PHASEOLUS VULGARIS L.

- BY SOME PLANT VOLATILE COMPOUNDS." *JOURNAL OF PLANT PROTECTION RESEARCH* 47 (3): 255–65.
- FARUK, M. I., M. L. RAHMAN, M. M. H. MUSTAFA, and IR. J. COOSEMANS. 2011. "DIMETHYL DISULFIDE- A POTENTIAL BIOPESTICIDE AGAINST ROOT-KNOT NEMATODE OF TOMATO (*Lycopersicon Esculentum* L.)." *Bangladesh J. Agril. Res.* 36 (4): 685–95.
- Fritsch, J. 2004. "Dimethyl Disulfide as a New Chemical Potential Alternative to Methyl Bromide in Soil Disinfestation in France." *International Society for Horticultural Science*.
<http://www.actahort.org/members/showpdf?session=11225>.
- Gabor, Esther M, Erik J de Vries, and Dick B Janssen. 2003. "Efficient Recovery of Environmental DNA for Expression Cloning by Indirect Extraction Methods." *FEMS Microbiology Ecology* 44 (2): 153–63. doi:10.1016/S0168-6496(02)00462-2.
- Gerik, J. S. 2005. "Evaluation of Soil Fumigants Applied by Drip Irrigation for Liatris Production." *Plant Disease* 89 (8): 883–87. doi:10.1094/PD-89-0883.
- Giannakou, Ioannis O, and Dimitrios G Karpouzias. 2003. "Evaluation of Chemical and Integrated Strategies as Alternatives to Methyl Bromide for the Control of Root-Knot Nematodes in Greece." *Pest Management Science* 59 (8): 883–92. doi:10.1002/ps.692.
- Gilardi, G., S. Demarchi, G. Martano, M.L. Gullino, and A. Garibaldi. 2014. "Success and Failures of Grafting Pepper against Soil-Borne Pathogens." *ISHS Acta Horticulturae*. <http://www.actahort.org/members/showpdf?session=2630>.
- Gordon, T. R., D. Okamoto, and D. J. Jacobson. 1989. "Colonization of Muskmelon and Nonsusceptible Crops by *Fusarium Oxysporum* F. Sp. *Melonis* and Other Species of *Fusarium*." *Ecology and Epidemiology* 79 (10): 1095–1100.
- Hirano, Yasushi, and Tsutomu Arie. 2006. "PCR-Based Differentiation of *Fusarium Oxysporum* Ff. Sp. *Lycopersici* and *Radici-Lycopersici* and Races of *F. Oxysporum* F. Sp. *Lycopersici*." *Journal of General Plant Pathology* 72 (5): 273–83. doi:10.1007/s10327-006-0287-7.
- Holland, P. M., R. D. Abramson, R. Watson, and D. H. Gelfand. 1991. "Detection of Specific Polymerase Chain Reaction Product by Utilizing the 5'----3' Exonuclease Activity of *Thermus Aquaticus* DNA Polymerase." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 88 (16): 7276–80. doi:10.1073/pnas.88.16.7276.
- Hubbard, J. C. 1993. "A New Wilt Disease of Lettuce Incited by *Fusarium Oxysporum* F. Sp. *lactucum* Forma *Specialis* Nov." *Plant Disease* 77 (7): 750. doi:10.1094/PD-77-0750.
- Ikechi–Nwogu, Chinyerum Gloria. 2012. "Comparative Evaluation of Growth Media for the Cultivation of Fungal Cultures." *Journal of Plant Pathology & Microbiology* 03 (06). doi:10.4172/2157-7471.1000139.
- Jamiołkowska, Agnieszka, and Krzysztof Sawicki. 2011. "Biodiversity of Fungi Colonising Aboveground Parts of Zucchini (*Cucurbita Pepo* L. Var. *Giromontina*)." *Folia Horticulturae* 23 (1): 29–35. doi:10.2478/v10245-011-0005-6.
- Johnson, Paul H., and Lawrence I. Grossman. 1977. "Electrophoresis of DNA in Agarose Gels. Optimizing Separations of Conformational Isomers of Double-

- and Single-Stranded DNAs." *Biochemistry* 16 (19): 4217–25. doi:10.1021/bi00638a014.
- Karpouzias, Dimitrios G., Anastasios Karatasas, Evangelia Spiridaki, Constantina Rousidou, Fotios Bekris, Michalis Omirou, Constantinos Ehaliotis, and Kalliope K. Papadopoulou. 2011. "Impact of a Beneficial and of a Pathogenic Fusarium Strain on the Fingerprinting-Based Structure of Microbial Communities in Tomato (*Lycopersicon Esculentum* Mill.) Rhizosphere." *European Journal of Soil Biology* 47 (6): 400–408. doi:10.1016/j.ejsobi.2011.07.011.
- Katan, Jaacov. 2000. "Physical and Cultural Methods for the Management of Soil-Borne Pathogens." *Crop Protection*, XIVth International Plant Protection Congress, 19 (8–10): 725–31. doi:10.1016/S0261-2194(00)00096-X.
- Klappenbach, Joel A., John M. Dunbar, and Thomas M. Schmidt. 2000. "rRNA Operon Copy Number Reflects Ecological Strategies of Bacteria." *Applied and Environmental Microbiology* 66 (4): 1328–33. doi:10.1128/AEM.66.4.1328-1333.2000.
- Koch, E. 1999. "Evaluation of Commercial Products for Microbial Control of Soil-Borne Plant Diseases." *Crop Protection* 18 (2): 119–25. doi:10.1016/S0261-2194(98)00102-1.
- Lakshman, Dilip K., Savithiry S. Natarajan, Sukla Lakshman, Wesley M. Garrett, and Arun K. Dhar. 2008. "Optimized Protein Extraction Methods for Proteomic Analysis of *Rhizoctonia Solani*." *Mycologia* 100 (6): 867–75. doi:10.3852/08-065.
- Leininger, S., T. Urich, M. Schloter, L. Schwark, J. Qi, G. W. Nicol, J. I. Prosser, S. C. Schuster, and C. Schleper. 2006. "Archaea Predominate among Ammonia-Oxidizing Prokaryotes in Soils." *Nature* 442 (7104): 806–9. doi:10.1038/nature04983.
- Lievens, Bart, Margreet Brouwer, Alfons C. R. C. Vanachter, C. André Lévesque, Bruno P. A. Cammue, and Bart P. H. J. Thomma. 2005. "Quantitative Assessment of Phytopathogenic Fungi in Various Substrates Using a DNA Macroarray." *Environmental Microbiology* 7 (11): 1698–1710. doi:10.1111/j.1462-2920.2005.00816.x.
- Li, Yuan, Liangang Mao, Dongdong Yan, Taotao Ma, Jin Shen, Meixia Guo, Qixia Wang, Canbin Ouyang, and Aocheng Cao. 2014. "Quantification of *Fusarium Oxysporum* in Fumigated Soils by a Newly Developed Real-Time PCR Assay to Assess the Efficacy of Fumigants for *Fusarium* Wilt Disease in Strawberry Plants." *Pest Management Science* 70 (11): 1669–75. doi:10.1002/ps.3700.
- Lockwood, J L. 1988. "Evolution of Concepts Associated with Soilborne Plant Pathogens." *Annual Review of Phytopathology* 26 (1): 93–121. doi:10.1146/annurev.py.26.090188.000521.
- Martin, S. B. 1988. "Identification, Isolation Frequency, and Pathogenicity of Anastomosis Groups of Binucleate *Rhizoctonia*) Spp. from Strawberry Roots." *Phytopathology* 78 (4): 379. doi:10.1094/Phyto-78-379.
- Michielse, Caroline B., and Martijn Rep. 2009. "Pathogen Profile Update: *Fusarium Oxysporum*." *Molecular Plant Pathology* 10 (3): 311–24. doi:10.1111/j.1364-3703.2009.00538.x.

- Mirtalebi, Maryam, Zia Banihashemi, and Celeste C. Linde. 2013. "Phylogenetic Relationships of *Fusarium Oxysporum* F. Sp. *Melonis* in Iran." *European Journal of Plant Pathology* 136 (4): 749–62. doi:10.1007/s10658-013-0204-9.
- Newhall, A. G. 1955. "Disinfestation of Soil by Heat, Flooding and Fumigation." *The Botanical Review* 21 (4): 189–250. doi:10.1007/BF02872412.
- Noling, J. W., and J. O. Becker. 1994. "The Challenge of Research and Extension to Define and Implement Alternatives to Methyl Bromide." *Journal of Nematology* 26 (4S): 573–86.
- Ogórek, Rafał, Agnieszka Lejman, Wojciech Pusz, Anna Miłuch, and Paulina Miodyńska. 2012. "Characteristics and Taxonomy of *Cladosporium* Fungi." *Mikologia Lekarska* 19 (2): 80–85.
- Ogram, Andrew, Gary S. Sayler, and Tamar Barkay. 1987. "The Extraction and Purification of Microbial DNA from Sediments." *Journal of Microbiological Methods* 7 (2–3): 57–66. doi:10.1016/0167-7012(87)90025-X.
- Okano, Yutaka, Krassimira R. Hristova, Christian M. Leutenegger, Louise E. Jackson, R. Ford Denison, Binyam Gebreyesus, David Lebauer, and Kate M. Scow. 2004. "Application of Real-Time PCR To Study Effects of Ammonium on Population Size of Ammonia-Oxidizing Bacteria in Soil." *Applied and Environmental Microbiology* 70 (2): 1008–16. doi:10.1128/AEM.70.2.1008-1016.2004.
- Omirou, Michalis, Dimitrios G. Karpouzias, Kalliope K. Papadopoulou, and Constantinos Ehaliotis. 2013. "Dissipation of Pure and Broccoli-Released Glucosinolates in Soil under High and Low Moisture Content." *European Journal of Soil Biology* 56 (May): 49–55. doi:10.1016/j.ejsobi.2013.01.005.
- Omirou, Michalis, Constantina Rousidou, Fotios Bekris, Kalliope K. Papadopoulou, Urania Menkissoglou-Spiroudi, Constantinos Ehaliotis, and Dimitrios G. Karpouzias. 2011. "The Impact of Biofumigation and Chemical Fumigation Methods on the Structure and Function of the Soil Microbial Community." *Microbial Ecology* 61 (1): 201–13. doi:10.1007/s00248-010-9740-4.
- Parmeter, J. R. 1970. *Rhizoctonia Solani, Biology and Pathology*. University of California Press.
- Rivas, Susana, and Colwyn M. Thomas. 2005. "Molecular Interactions Between Tomato and the Leaf Mold Pathogen *Cladosporium Fulvum*." *Annual Review of Phytopathology* 43 (1): 395–436. doi:10.1146/annurev.phyto.43.040204.140224.
- Robe, Patrick, Renaud Nalin, Carmela Capellano, Timothy M. Vogel, and Pascal Simonet. 2003. "Extraction of DNA from Soil." *European Journal of Soil Biology* 39 (4): 183–90. doi:10.1016/S1164-5563(03)00033-5.
- Roberts, Daniel P., Scott M. Lohrke, Susan L. F. Meyer, Jeffrey S. Buyer, John H. Bowers, C. Jacyn Baker, Wei Li, Jorge T. de Souza, Jack A. Lewis, and Soohie Chung. 2005. "Biocontrol Agents Applied Individually and in Combination for Suppression of Soilborne Diseases of Cucumber." *Crop Protection* 24 (2): 141–55. doi:10.1016/j.cropro.2004.07.004.
- Roose-Amsaleg, C. L, E Garnier-Sillam, and M Harry. 2001. "Extraction and Purification of Microbial DNA from Soil and Sediment Samples." *Applied Soil Ecology* 18 (1): 47–60. doi:10.1016/S0929-1393(01)00149-4.
- Sait, Michelle, Philip Hugenholtz, and Peter H. Janssen. 2002. "Cultivation of Globally Distributed Soil Bacteria from Phylogenetic Lineages Previously Only

- Detected in Cultivation-Independent Surveys." *Environmental Microbiology* 4 (11): 654–66. doi:10.1046/j.1462-2920.2002.00352.x.
- Salari, Mohammad, Naser Panjehkeh, Zahra Nasirpoor, and Javad Abkhoo. 2012. "Screening of Cucumis Melo L. Cultivars from Iran for Resistance against Soil-Borne Fungal Pathogens." *Journal of Plant Pathology & Microbiology* 03 (06). doi:10.4172/2157-7471.1000138.
- Schoch, Conrad L., Keith A. Seifert, Sabine Huhndorf, Vincent Robert, John L. Spouge, C. André Levesque, Wen Chen, et al. 2012. "Nuclear Ribosomal Internal Transcribed Spacer (ITS) Region as a Universal DNA Barcode Marker for Fungi." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109 (16): 6241–46. doi:10.1073/pnas.1117018109.
- Scott, M. R. 1956. "Studies of the Biology of Sclerotium Cepivorum Berk." *Annals of Applied Biology* 44 (4): 584–89. doi:10.1111/j.1744-7348.1956.tb02156.x.
- Senthamizhselvan, P., C. Jeyalakshmi, and J. Alice R.P.Sujeetha. 2010. "Growth, Sporulation and Biomass Production of Native Entomopathogenic Fungal Isolates on a Suitable Medium." *Journal of Biopesticides* 3 (2): 466–69.
- Smith, Duncan R. 1996. "Agarose Gel Electrophoresis." In *Basic DNA and RNA Protocols*, edited by Adrian J. Harwood, 17–21. Methods in Molecular Biology™ 58. Humana Press. <http://link.springer.com/protocol/10.1385/0-89603-402-X%3A17>.
- Smith, V. L. 1988. "Effects of Host Density and Number of Disease Foci on Epidemics of Southern Blight of Processing Carrot." *Phytopathology* 78 (5): 595. doi:10.1094/Phyto-78-595.
- Sneh, B. 1996. *Rhizoctonia Species: Taxonomy, Molecular Biology, Ecology, Pathology and Disease Control*. Springer Science & Business Media.
- Stellwagen, Nancy C. 2009. "Electrophoresis of DNA in Agarose Gels, Polyacrylamide Gels and in Free Solution." *Electrophoresis* 30 (Suppl 1): S188–95. doi:10.1002/elps.200900052.
- STEWART, C. NEAL, JR. 1997. "Rapid DNA Extraction from Plants." In *Fingerprinting Methods Based on Arbitrarily Primed PCR*, 25–28. Springer Lab Manuals. Springer Berlin Heidelberg. <http://plantsciences.utk.edu/pdf/rapiddnaextractionfromplants.pdf>.
- Stewart, C. Neal Jr., and Laura E. Via. 1993. "A Rapid CTAB DNA Isolation Technique Useful for RAPD Fingerprinting and Other PCR Applications." *BioTechniques* 14 (5): 748–49.
- Suga, H., Y. Hirayama, M. Morishima, T. Suzuki, K. Kageyama, and M. Hyakumachi. 2013. "Development of PCR Primers to Identify Fusarium Oxysporum F. Sp. Fragariae." *Plant Disease* 97 (5): 619–25. doi:10.1094/PDIS-07-12-0663-RE.
- Sutton, John Clifford, Coralie Rachelle Sopher, Tony Nathaniel Owen-Going, Weizhong Liu, Bernard Grodzinski, John Christopher Hall, and Ruth Linda Benchimol. 2006. "Etiology and Epidemiology of Pythium Root Rot in Hydroponic Crops: Current Knowledge and Perspectives." *Summa Phytopathologica* 32 (4): 307–21. doi:10.1590/S0100-54052006000400001.
- Suzuki, Marcelino T., Lance T. Taylor, and Edward F. DeLong. 2000. "Quantitative Analysis of Small-Subunit rRNA Genes in Mixed Microbial Populations via 5'-Nuclease Assays." *Applied and Environmental Microbiology* 66 (11): 4605–14.

- Takai, Ken, and Koki Horikoshi. 2000. "Rapid Detection and Quantification of Members of the Archaeal Community by Quantitative PCR Using Fluorogenic Probes." *Applied and Environmental Microbiology* 66 (11): 5066–72. doi:10.1128/AEM.66.11.5066-5072.2000.
- Torsvik, Vigdis Lid. 1980. "Isolation of Bacterial DNA from Soil." *Soil Biology and Biochemistry* 12 (1): 15–21. doi:10.1016/0038-0717(80)90097-8.
- Treusch, Alexander H., Sven Leininger, Arnulf Kletzin, Stephan C. Schuster, Hans-Peter Klenk, and Christa Schleper. 2005. "Novel Genes for Nitrite Reductase and Amo-Related Proteins Indicate a Role of Uncultivated Mesophilic Crenarchaeota in Nitrogen Cycling." *Environmental Microbiology* 7 (12): 1985–95. doi:10.1111/j.1462-2920.2005.00906.x.
- Tsrur, Leah. 2010. "Biology, Epidemiology and Management of *Rhizoctonia Solani* on Potato." *Journal of Phytopathology* 158 (10): 649–58. doi:10.1111/j.1439-0434.2010.01671.x.
- Van Elsas, J. D., G. F. Duarte, A. S. Rosado, and K. Smalla. 1998. "Microbiological and Molecular Biological Methods for Monitoring Microbial Inoculants and Their Effects in the Soil Environment." *Journal of Microbiological Methods* 32 (2): 133–54. doi:10.1016/S0167-7012(98)00025-6.
- Wang, D., C. Rosen, L. Kinkel, A. Cao, N. Tharayil, and J. Gerik. 2009. "Production of Methyl Sulfide and Dimethyl Disulfide from Soil-Incorporated Plant Materials and Implications for Controlling Soilborne Pathogens." *Plant and Soil* 324 (1–2): 185–97. doi:10.1007/s11104-009-9943-y.
- Waring, M. J. 1965. "Complex Formation between Ethidium Bromide and Nucleic Acids." *Journal of Molecular Biology* 13 (1): 269–82. doi:10.1016/S0022-2836(65)80096-1.
- Whelan, Joseph A, Nick B Russell, and Michael A Whelan. 2003. "A Method for the Absolute Quantification of cDNA Using Real-Time PCR." *Journal of Immunological Methods* 278 (1–2): 261–69. doi:10.1016/S0022-1759(03)00223-0.
- WHIPPS, J. M. 1997. "Developments in the Biological Control of Soil-Borne Plant Pathogens." *Advances in Botanical Research* 26: 134.
- White, Tj, T Bruns, S Lee, and J Taylor. 1990. "Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics." In *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, edited by Ma Innis, Dh Gelfand, Jj Shinsky, and Tj White, 315–22. Academic Press.
- Wittwer, Carl T., Mark G. Herrmann, Alan A. Moss, and Randy P. Rasmussen. 1997. "Continuous Fluorescence Monitoring of Rapid Cycle DNA Amplification." *BioTechniques* 22 (January): 130–38.
- Wood, R. K. S. 1951. "The Control of Diseases of Lettuce by the Use of Antagonistic Organisms II. the Control of *Rhizoctonia Solani* Kuhn." *Annals of Applied Biology* 38 (1): 217–30. doi:10.1111/j.1744-7348.1951.tb07798.x.
- Yang, Genhua, and Chengyun Li. 2012. "General Description of *Rhizoctonia* Species Complex." In *Plant Pathology*, edited by Christian Joseph Cumagun. InTech. <http://www.intechopen.com/books/howtoreference/plant-pathology/general-description-of-rhizocotonia-species-complex>.
- Yildiz, Ayhan, and Seher Benlioğlu. 2014. "A Laboratory Bioassay for Evaluating Pathogenicity of *Macrophomina Phaseolina* and *Rhizoctonia Solani* Isolates to

- Strawberry Stolons." *Phytoparasitica* 42 (3): 367–69. doi:10.1007/s12600-013-0370-5.
- Zeng, Qing-Yin, Sven-Olof Westermarck, Åsa Rasmuson-Lestander, and Xiao-Ru Wang. 2006. "Detection and Quantification of Cladosporium in Aerosols by Real-Time PCR." *Journal of Environmental Monitoring* 8 (1): 153–60. doi:10.1039/B509515H.
- Zhang, Tong, and Herbert H. P. Fang. 2006. "Applications of Real-Time Polymerase Chain Reaction for Quantification of Microorganisms in Environmental Samples." *Applied Microbiology and Biotechnology* 70 (3): 281–89. doi:10.1007/s00253-006-0333-6.
- Κουμπάκης, Κουμπάκης. 2005. "ΑΠΟΛΥΜΑΝΣΗ ΜΕ ΑΤΜΟ." Νέες τεχνολογίες στη γεωργική παραγωγή και την αγροτική ανάπτυξη. Αλλατίνη 28 Φοίνικας Τ.Θ. 46 Τ.Κ. 55102 Θεσσαλονίκη: ΚΑΜΙΝΙ Ο.Ε. http://library.tee.gr/digital/m2067/m2067_koubakis.pdf.
- Σάββας, Δ. 2009. "ΠΡΟΣΦΑΤΕΣ ΕΞΕΛΙΞΕΙΣ ΚΑΙ ΔΙΑΦΑΙΝΟΜΕΝΕΣ ΤΑΣΕΙΣ ΣΤΙΣ ΘΕΡΜΟΚΗΠΙΑΚΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΚΗΠΕΥΤΙΚΩΝ." Πρακτικά 23ου Συνεδρίου της Ελληνικής Εταιρείας της Επιστήμης των Οπωροκηπευτικών. Ιερά Οδός 75, 11855 Αθήνα: Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής, Εργαστήριο Κηπευτικών Καλλιεργειών. <http://web.cut.ac.cy/eeee/wp-content/uploads/sites/14/2013/07/savvas.pdf>.