

Τ.Ε.Ι. ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΘΕΡΜΟΚΗΠΙΑΚΩΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ ΚΑΙ
ΑΝΘΟΚΟΜΙΑΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Επαγωγή της αντοχής της αγγουριάς εναντίον του ωιδίου
(*Podosphaera xanthii*) από τους υπερπαρασιτικούς μύκητες
Acremonium alternatum και *Acremonium implicatum***



ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ : ΠΑΠΑΔΑΚΗΣ ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ
ΕΙΣΗΓΗΣΗ : Δρ. ΔΗΜΗΤΡΗΣ ΓΚΟΥΜΑΣ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ, ΙΟΥΛΙΟΣ 2005

Τ.Ε.Ι. ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΘΕΡΜΟΚΗΠΙΑΚΩΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ ΚΑΙ
ΑΝΘΟΚΟΜΙΑΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Επαγωγή της αντοχής της αγγουριάς εναντίον του ωιδίου (*Podosphaera xanthii*) από τους υπερπαρασιτικούς μύκητες *Acremonium alternatum* και *Acremonium implicatum*

ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ : ΠΑΠΑΔΑΚΗΣ ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ

ΕΙΣΗΓΗΣΗ : Δρ. ΔΗΜΗΤΡΗΣ ΓΚΟΥΜΑΣ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ, ΙΟΥΛΙΟΣ 2005

1. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.2 Οικονομικά Στοιχεία της Καλλιέργειας της Αγγουριάς στην Ελλάδα

Η καλλιέργεια της αγγουριάς στη χώρα μας καταλαμβάνει μια έκταση περίπου 30 – 40.000 στρεμμάτων, απ' τα οποία σχεδόν τα 10.000 στρέμματα είναι καλλιέργειες εκτός εποχής (θερμοκηπιακές καλλιέργειες), σε περιοχές της Κρήτης και της Πελοποννήσου αλλά και στη Χαλκιδική (Δημητράκης, 1998).

Η ετήσια παραγωγή αγγουριών κυμαίνεται μεταξύ 130 – 140.000 τόννων. Απ' την ποσότητα αυτή εξάγεται το 30% περίπου στις χώρες της Δ. Ευρώπης. Ο μεγαλύτερος όγκος παράγεται από τις αρχές Νοεμβρίου έως τα μέσα Ιανουαρίου περίπου, αξιοποιώντας δηλαδή τις υψηλές θερμοκρασίες του φθινοπώρου (Ζιώγας- Ντελής- Χορτσανίτης, 1990).

1.3 Βοτανικά Χαρακτηριστικά, Εδαφοκλιματικές Απαιτήσεις και Κυριότερες Ασθένειες της Καλλιέργειας

Η αγγουριά, *Cucumis sativus* ανήκει στην οικογένεια των *Cucurbitaceae*, είναι φυτό πολυετές αλλά καλλιεργείται σαν ετήσιο, είναι ποώδες, έρπον ή αναρριχώμενο, τα φύλλα είναι απλά με λωβούς γωνιώδους απολήξεως και τα άνθη του είναι μόνοικα και δικλινή.

Η αγγουριά είναι φυτό θερμής εποχής, ζημιώνεται δηλαδή από θερμοκρασίες κάτω των 10°C. Αναπτύσσεται σε πολλούς τύπους εδαφών αλλά προτιμά έδαφος αμμοπηλώδες, γόνιμο, καλά στραγγιζόμενο, πλούσιο σε οργανική ουσία, με pH 5,5- 7,0.

Οι άριστες θερμοκρασίες ανάπτυξης του φυτού κυμαίνονται μεταξύ 18 και 24°C (24°C τη μέρα και 18°C τη νύχτα). Οι θερμοκρασίες εδάφους κάτω

των 18°C κάνουν το ριζικό σύστημα ευαίσθητο σε μυκητολογικές προσβολές. Η σχετική υγρασία πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 70 και 80%, αν και οι υψηλές υγρασίες πρέπει να αποφεύγονται καθώς ευνοούν τις ασθένειες.

Οι κυριότερες ασθένειες που προσβάλουν την καλλιέργεια της αγγουριάς είναι η τεφρά σήψη (*Botrytis cinerea*), το ωΐδιο (*Podosphaera xanthii*), ο περονόσπορος (*Pseudoperonospora cubensis*), η αλτερναρίωση (*Alternaria alternata*) και το Μωσαϊκό της αγγουριάς (Cucumber Mosaic Cucumovirus) (Πεδιαδιτάκης, 2002).

1.4 Το Ωΐδιο της Αγγουριάς (*Podosphaera xanthii*)

Τα ωΐδια είναι πολύ διαδεδομένες ασθένειες σε όλες τις περιοχές της χώρας και προκαλούν συχνά σημαντικές ζημιές στις διάφορες καλλιέργειες των κολοκυνθοειδών τόσο στην ύπαιθρο όσο και στα θερμοκήπια. Οι μύκητες που προκαλούν τα ωΐδια είναι υποχρεωτικά παράσιτα και έχουν πολλούς ξενιστές μεταξύ των λαχανικών αλλά και μεταξύ των καλλωπιστικών και αυτοφυών ποωδών φυτών (Παναγόπουλος, 1995).

Ο μύκητας που προκαλεί το ωΐδιο στην αγγουριά είναι ο *Podosphaera xanthii*. Ανήκει στην Κλάση *Pyrenomycetes*, στην Υποκλάση *Ascomycetes* στην Τάξη *Erysiphales* και στην Οικογένεια *Erysiphaceae*. Οι κονιδιοφόροι της ατελούς μορφής του μύκητα είναι του τύπου *Oidium*.

Ο μύκητας διατηρείται πάνω σε καλλιεργούμενα φυτά ή σε ζιζάνια, από τα οποία προέρχονται τα μολύσματα για τις αρχικές μολύνσεις. Στις νέες καλλιέργειες, τα κονίδια μεταφέρονται με τον άνεμο και όταν βρεθούν πάνω στο φυτό βλαστάνουν ακόμη και με σχετική υγρασία 46% και προκαλούν μολύνσεις (Παναγόπουλος, 1995).

Σε ευνοϊκές συνθήκες ο μύκητας αναπτύσσεται πολύ γρήγορα. Ο χρόνος μεταξύ προσβολής και εμφάνισης συμπτωμάτων είναι συνήθως 3-7 μέρες και στο διάστημα αυτό μπορεί να παραχθεί ένας μεγάλος αριθμός σπορίων. Ευνοϊκές συνθήκες για την ανάπτυξη του μύκητα είναι η πυκνή φύτευση των φυτών και η χαμηλή ένταση φωτισμού, ενώ η υψηλή σχετική υγρασία ευνοεί την προσβολή και την επιβίωση των κονιδίων.

Οι ξηρικές συνθήκες ευνοούν τον αποικισμό, την παραγωγή σπορίων και την διασπορά τους. Η ασθένεια αναπτύσσεται ικανοποιητικά σε θερμοκρασίες από 20-27°C, ενώ η μόλυνση επιτυγχάνεται σε ένα ευρύ φάσμα από 10-32°C. Σε συνθήκες αγρού ο μύκητας αναστέλλει την ανάπτυξη του σε θερμοκρασίες από 38°C και πάνω (Mac Grath & Thomas, 1998).

Τα προσβεβλημένα φυτά αγγουριάς εμφανίζουν μικρές, λευκές κηλίδες στα φύλλα (στην πάνω και στην κάτω επιφάνεια του ελάσματος), στους μίσχους και στους βλαστούς στις οποίες παρατηρούνται οι χαρακτηριστικές αλευρώδεις εξανθήσεις των ωιδίων. Συνήθως προσβάλλονται πρώτα τα γηραιότερα φύλλα (ή φυτά), ενώ τα νεαρά φύλλα δεν προσβάλλονται πολύ εύκολα. Ανάλογα με τις περιβαλλοντικές συνθήκες η προσβολή μπορεί να καταλάβει ολόκληρο το έλασμα του φύλλου και να καλύψει μεγάλη επιφάνεια του βλαστού. Μερικές φορές πάνω στην λευκή εξάνθιση εμφανίζονται μικρά μαύρα στίγματα τα κλειστοθήκια που είναι οι καρποφορίες της τέλειας μορφής του μύκητα.

Σαν συνέπεια της προσβολής και ανάλογα με την ένταση της προκαλείται μείωση της παραγωγής και υποβάθμιση της ποιότητας των καρπών, (οργανοληπτικά χαρακτηριστικά) καθώς και μείωση της διατηρησιμότητάς τους (Παναγόπουλος, 1995).

1.5 Μηχανισμοί Άμυνας των Φυτών

Η ικανότητα των φυτών να επιβιώνουν από τις προσβολές των παθογόνων είναι βασική προϋπόθεση για τη διατήρησή τους. Για το σκοπό αυτό έχουν αναπτύξει διάφορους μηχανισμούς ώστε να προφυλάσσονται από τις προσβολές των περισσότερων παθογόνων.

Η αλληλεπίδραση φυτού-παθογόνου κυμαίνεται από την ανοσία (απόλυτη ανθεκτικότητα) μέχρι την πλήρη ευπάθεια. Στην περίπτωση της ευπάθειας το παθογόνο έχει την ικανότητα να προσβάλει το συγκεκριμένο φυτό και να προκαλεί ζημιές ποικίλης έκτασης ανάλογα με την μολυσματικότητα του και την αδυναμία του φυτού να ενεργοποιήσει έγκαιρα

τους αμυντικούς μηχανισμούς που διαθέτει. Το παθογόνο μπορεί επίσης να αναστέλει τους μηχανισμούς αυτούς με την παραγωγή συγκεκριμένων βιολογικών μορίων (Knogge, 1996).

Αντίθετα στην περίπτωση της ανοσίας το παθογόνο δεν μπορεί να αναπτυχθεί πάνω στο συγκεκριμένο είδος είτε επειδή δεν βρίσκει τα κατάλληλα θρεπτικά συστατικά, είτε επειδή το φυτό διαθέτει μηχανισμούς 'παθητικής ανθεκτικότητας' που εμποδίζουν την μόλυνση (Φανουράκης 2002) όπως :

- Κηρώδης επίστρωση στην επιφάνεια των φύλλων και των καρπών που εμποδίζει την εκροή θρεπτικών στοιχείων από το φυτό στο παθογόνο, ιδιαίτερα στα πρώτα στάδια της ανάπτυξής του.
- Επιδερμικές τρίχες που παρεμποδίζουν τη δημιουργία σταγονιδίων νερού ή την παραμονή της απαραίτητης υγρασίας για την ανάπτυξη των παθογόνων. Επίσης στέκονται εμπόδιο στην επαφή των σπορίων και των βλαστικών σωλήνων του παθογόνου με το φυτό.
- Αυξημένο πάχος και σκληρότητα των κυτταρικών τοιχωμάτων των φυτικών ιστών. Για παράδειγμα η παρουσία εκτεταμένων περιοχών σκληρεγχυματικών κυτάρρων στα στελέχη διαφόρων σιτηρών μπορεί να σταματήσει την περαιτέρω εξάπλωση του *Puccinia graminis*.
- Ουσίες που εκκρίνονται από το υπέργειο ή υπόγειο μέρος του φυτού που επηρεάζουν έμμεσα / άμεσα τη μόλυνση από τα παθογόνα.
- Απουσία στο φυτό ουσιών που είναι απαραίτητες για την ανάπτυξη του παθογόνου.
- Απουσία υποδοχέων στον ξενιστή ή θέσεων ευαισθησίας για τις τοξίνες του παθογόνου.
- Οσμωτική πίεση, περιεκτικότητα σε νερό και την ενεργό οξύτητα (pH) του φυτικού κυτάρου (Agrios, 1997).

Εκτός από την παθητική ανθεκτικότητα, υπάρχει και η ενεργητική ανθεκτικότητα που βασίζεται στην ενεργοποίηση των αμυντικών μηχανισμών του ξενιστή μετά την μόλυνση του από το παθογόνο. Όταν αρχίζει η προσβολή το φυτό 'ειδοποιείται' για την παρουσία του παθογόνου μέσω

πολλών ουσιών οι οποίες ονομάζονται ουσίες-σήματα. Οι ουσίες-σήματα περιλαμβάνουν προϊόντα μεταβολισμού του παθογόνου (π.χ.τοξίνες) ή αυξορυθμιστικές ουσίες, ολιγοσακχαρίτες, παραμποδιστές πρωτεΐνάσης, σαλκυλικό οξύ κ.λπ.

Ειδικοί δέκτες των κυττάρων αναγνωρίζουν αυτά τα σήματα και μεταβιβάζουν την πληροφορία στο χώρο δράσης και αντίδρασης του φυτού μέσα στο κύτταρο. Μετά τη λήψη του σήματος αρχίζει η αντίδραση του κυττάρου με ενεργοποίηση των μηχανισμών άμυνας.

Οι μηχανισμοί αυτοί σχετίζονται με το μεταβολισμό του φυτού (βιοχημικές αλλαγές) και έχουν χαρακτήρα δυναμικής αντιμετώπισης του παθογόνου και των μεταβολικών προϊόντων του (Jackson, 1996). Χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες :

α) Άμεση αντίδραση των κυττάρων που δέχονται την εισβολή από το παθογόνο, ξεκινώντας από την αναγνώριση του 'σήματος' (=δεν είναι μολυσματικό) (Mettraux, 2001) και την μεταβίβαση του. Συχνά καταλήγει σε γρήγορο θάνατο των κυττάρων, ονομάζεται αντίδραση υπερευαισθησίας (HR) και λειτουργεί μόνο από υψηλής ειδίκευσης αναγνωρισμένα μόρια διεγερτών (elicitors) (Shah, 1995).

Η αντίδραση υπερευαισθησίας συνοδεύεται από υψηλή τοπική συσσώρευση φαινολικών συστατικών και ενίσχυση του τοιχώματος των κυττάρων που περιβάλλουν την περιοχή των νεκρωμένων κυττάρων. Η διαρροή ηλεκτρολυτών από τα φυτικά κύτταρα, η διακοπή της φυσιολογικής ροής ιόντων K^+ / H^+ , η εισροή ιόντων Ca^{2+} , η παραγωγή ενεργών ριζών οξυγόνου και η συσσώρευση φυτοαλεξινών είναι μερικές από τις αλλαγές που λαμβάνουν χώρα στα φυτικά κύτταρα πριν από το θάνατο τους (Atkinson, 1993).

Η αντίδραση υπερευαισθησίας γενικά αναγνωρίζεται από την παρουσία καστανών, νεκρών κυττάρων στο σημείο της μόλυνσης του φυτού, των οποίων ο αριθμός μπορεί να κυμαίνεται, ανάλογα με το παθογόνο, από ένα έως πολλά. Εάν νεκρώνεται ένα ή λίγα κύτταρα τότε μία αποτελεσματική αντίδραση υπερευαισθησίας σε ένα ανθεκτικό φυτό μπορεί να μην είναι ορατή με γυμνό μάτι, ενώ εάν νεκρώνονται αρκετά κύτταρα, τότε στη

νεκρωμένη περιοχή συνήθως είναι ορατή η προαναφερθείσα καστανή αλλοίωση (Heath, 2000).

Γίνεται δεκτό ότι ορισμένες μορφές της αντίδρασης υπερευαισθησίας παρουσιάζουν κάποιες ομοιότητες με τον αναπτυσιακό προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο των φυτικών κυττάρων. Όμως, το γεγονός ότι τον κυτταρικό θάνατο, ακολουθεί πάντα η ενεργοποίηση της άμυνας του φυτού αποτελεί ένδειξη ότι τα παθογόνα διεγείρουν όχι ένα αναπτυσιακά προγραμματισμένο, αλλά ένα εξειδικευμένο και αμυντικά προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο (Heath, 1998).

β) Εντοπισμένη ενεργοποίηση των γονιδίων γύρω από το σημείο της μόλυνσης, καταλήγοντας σε σύνθεση δευτερευουσών ουσιών που μεταβάλλουν τη δομή και την περατότητα των κυτταρικών μεμβρανών. Οι πιο σημαντικές μεταβολές είναι:

- ο Η απελευθέρωση μορίων απαραίτητων για τη μεταγωγή του σήματος της αντίδρασης άμυνας μέσα και γύρω από το κύτταρο και πιθανόν διασυστηματικά σε ολόκληρο το φυτό.

- ο Η οξειδωση φαινολικών ενώσεων, η ενεργοποίηση αντιοξειδωτικών ενζύμων (Nicholson, 1992 ; Baker, 1995) και η απελευθέρωση και συσσώρευση ενεργών ριζών οξυγόνου O_2^- , H_2O_2 και OH^- (reactive oxygen radicals).

Η συσσώρευση υπεροξειδίου του υδρογόνου και των συγγενικών ριζών οξυγόνου (reactive oxygen species, ROS), για τα οποία υπάρχουν στοιχεία ότι μπορεί να έχουν σημαντικό ρόλο στη συσσώρευση σαλικυλικού οξέος (salicylic acid), φαίνεται να επηρεάζουν με πολλούς τρόπους την άμυνα του φυτού: (α) στοχεύουν τοπικά στο θάνατο των υπερευαίσθητων κυττάρων, (β) κατευθύνουν αντιμικροβιακές ενέργειες εναντίον του παθογόνου, (γ) συμμετέχουν στην ενίσχυση του κυτταρικού τοιχώματος του φυτού (Lamb, 1997). Το υπεροξείδιο του υδρογόνου μπορεί να δράσει σαν ένα διάχυτο σήμα για την επαγωγή της αντοχής σε γειτονικούς ιστούς.

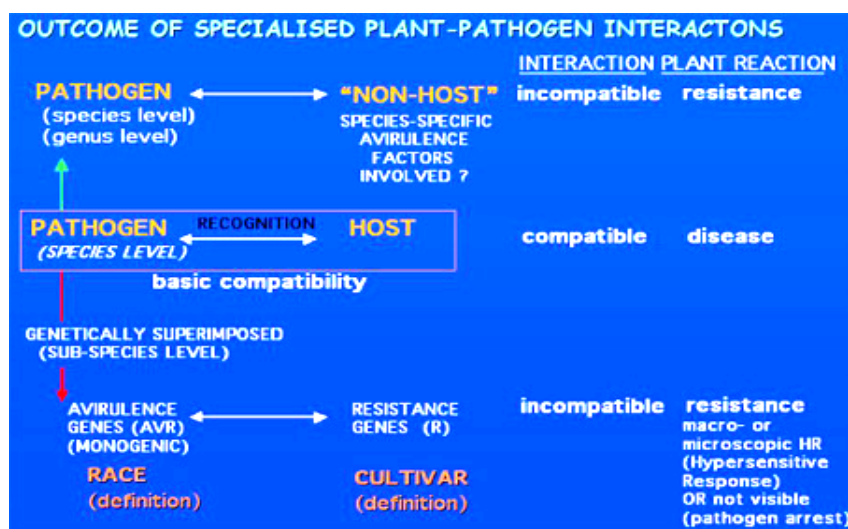
γ) Διασυστηματική ενεργοποίηση γονιδίων που κωδικοποιούν την παραγωγή πρωτεϊνών σχετικών με την παθογένεση (PR-proteins), παρεμποδίζοντας άμεσα (έχει αποδειχθεί η μερική αντιμικροβιακή δράση

τους *in-vitro*), ή έμμεσα το παθογόνο (Kombrink and Schemelzer, 2001). Οι PR πρωτεΐνες περιλαμβάνουν τις γλουκανάσες (PR-2), τις χιπινάσες (PR-3), ένζυμα που υδρολύουν τα κυτταρικά τοιχώματα των μυκήτων, και πρωτεΐνες παρόμοιες με τις thaumatines (PR- 5) (Ooostendorp *et al.*, 2001).

Το στάδιο ανάπτυξης του φυτού παίζει σημαντικό ρόλο. Φυτά που παρουσιάζονται ανθεκτικά σε ένα στάδιο ανάπτυξης μπορεί να είναι ευπαθή σε ένα άλλο στάδιο. Τέλος οι περιβαλλοντικές συνθήκες (θερμοκρασία, σχετική υγρασία, φωτισμός) συντελούν στην ανθεκτικότητα ή την ευπάθεια ενός φυτού σε ένα παθογόνο.

1.6 Αλληλεπίδραση Παθογόνου-Φυτού σε Μοριακό Επίπεδο

Η αλληλεπίδραση παθογόνου-ξενιστή στα φυτά μπορεί να εξειδικεύεται στο επίπεδο γένους και είδους ή ακόμα και στο επίπεδο συγκεκριμένων ποικιλιών ενός είδους (εικ.1).



Εικόνα 1: Πιθανές αλληλεπιδράσεις σε μοριακό επίπεδο, φυτού –παθογόνου.

Υπάρχουν τουλάχιστον τέσσερις (4) ξεχωριστοί τύποι ανθεκτικότητας :

- 1) Εξειδικευμένη σε ένα παθογόνο.
- 2) Εξειδικευμένη σε μια ποικιλία φυτού.

3) Μη ξενιστή (βασική).

4) Εντοπισμένη και διασυστηματική επαγόμενη ανθεκτικότητα.

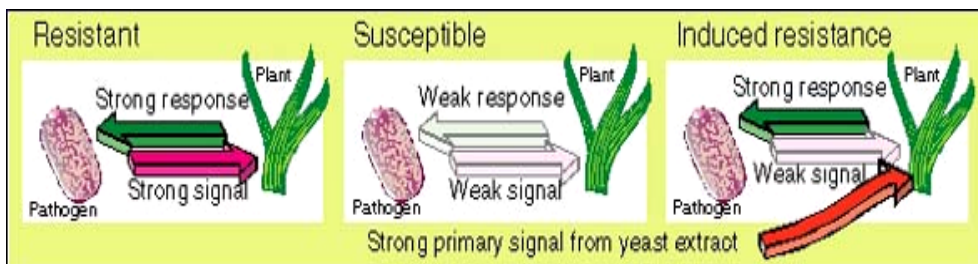
Η ανθεκτικότητα του φυτού στο παθογόνο μπορεί να είναι μονογονιδιακή (κάθετη) ή πολυγονιδιακή (οριζόντια). Η μονογονιδιακή εξαρτάται από την ύπαρξη ενός γονιδίου ανθεκτικότητας (R gene) στο φυτό το οποίο αλληλεπιδρά με ένα συγκεκριμένο γονίδιο μη-μολυσματικότητας (avr gene) στο παθογόνο και θεωρείται εξειδικευμένη (Tuzun, 2001).

Η αλληλεπίδραση των γονιδίων (gene for gene), έχει γενικά ερμηνευτεί σαν ένα μοντέλο υποδοχέα-συνδέτη (receptor-ligand) στο οποίο οι μη-μολυσματικές πρωτεΐνες του παθογόνου δεσμεύονται στις αντίστοιχες πρωτεΐνες ανθεκτικότητας του φυτού και τότε η σχέση λέγεται 'ασύμβατη' (incompatible). Αν λείπει το σωστό R γονίδιο που να αντιστοιχεί σε τουλάχιστον ένα από τα avr γονίδια του παθογόνου τότε το φυτό είναι ανίκανο να χρησιμοποιήσει τα R γονίδια του για να ανιχνεύσει και να εμποδίσει το παθογόνο και η σχέση τους λέγεται 'συμβατή' (compatible) (Flor, 1971).

Η πολυγονιδιακή ανθεκτικότητα βασίζεται στις αλληλεπιδράσεις των προϊόντων πολλών γονιδίων του φυτού και θεωρείται ως μη εξειδικευμένη επειδή το φυτό και το παθογόνο δεν χρειάζονται ταιριαστά R και avr γονίδια (Tuzun, 2001).

1.7 Επαγόμενη Αντοχή

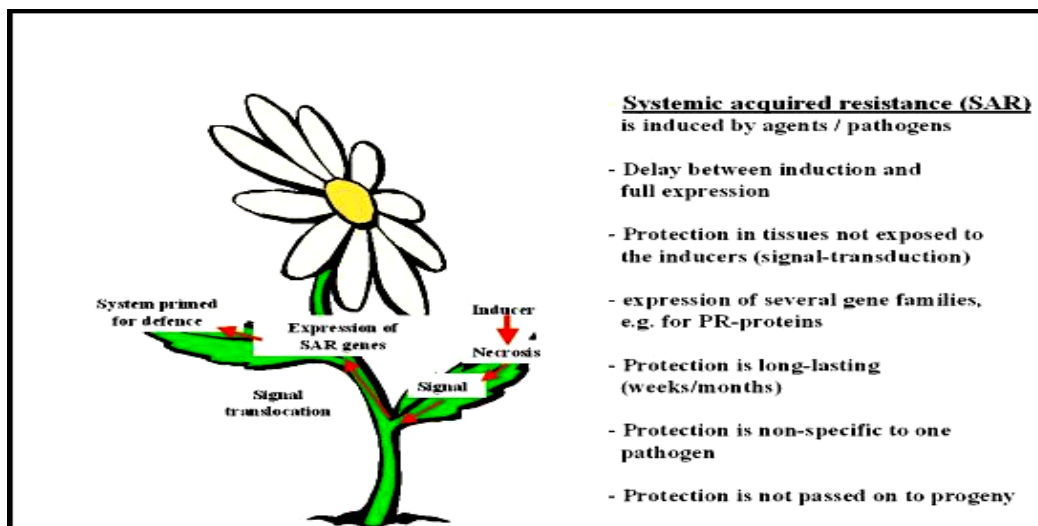
Η προσβολή των φυτών από μολυσματικά ή μη μολυσματικά στελέχη παθογόνων συχνά καταλήγει σε βιοχημικές αλλαγές στο φυτό που ενισχύουν την αντοχή των φυτών σε περαιτέρω μολύνσεις (priming). Το φαινόμενο αυτό στην πραγματικότητα περιλαμβάνει την ενεργοποίηση των μηχανισμών ανθεκτικότητας του φυτού που βρίσκονται σε λανθάνουσα κατάσταση (Kuc, 2000; Hammerschmidt, 2001). Ο τύπος αυτής της αντίδρασης, που μπορεί να εκδηλωθεί στο σημείο της μόλυνσης ή και σε ολόκληρο το φυτό (διασυστηματική), ονομάζεται επαγόμενη ή επίκτητη αντοχή (εικ. 2).



Εικόνα 2: Σχηματική αναπαράσταση των μοριακών γεγονότων που λαμβάνουν χώρα κατά την επαγωγή ανοχής.

Τα χαρακτηριστικά της διασυστηματικής επαγόμενης ανοχής (Δ.Ε.Α.) συνοψίζονται ως εξής:

- ο Η Δ.Ε.Α. επάγεται από διάφορους παράγοντες και παθογόνα.
- ο Κατά την Δ.Ε.Α. υπάρχει καθυστέρηση μεταξύ της επαγωγής και της πλήρους 'έκφρασης' της ανοχής.
- ο Το αποτέλεσμα της Δ.Ε.Α. είναι η προστασία και των φυτικών ιστών στους οποίους δεν έχουν εφαρμοσθεί διεγέρτες.
- ο Με την Δ.Ε.Α. εκφράζονται πολλές οικογένειες γονιδίων π.χ. PR-πρωτεΐνες.
- ο Η προστασία από την Δ.Ε.Α. είναι μακροχρόνια (εβδομάδες/μήνες).
- ο Η προστασία από την Δ.Ε.Α. δεν είναι εξειδικευμένη σε ένα παθογόνο.
- ο Η προστασία από την Δ.Ε.Α. δεν κληρονομείται στους απογόνους (εικ. 3).

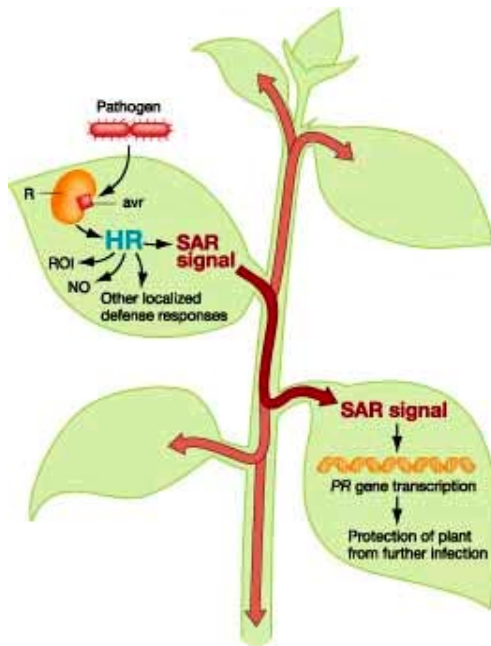


Εικόνα 3 : Βασικές αρχές της Διασυστηματικής Επίκτητης (Επαγόμενης) Αντοχής (Δ.Ε.Α.).

Θεωρείται ότι η Δ.Ε.Α. προστατεύει τα φυτά παρεμποδίζοντας την ανάπτυξη των παθογόνων και προστατεύοντας κατά των ζημιών (υδρολυτικών, οξειδωτικών) που αυτά προκαλούν καθώς και ζημιών που προκαλούνται από κάποια ζιζανιοκτόνα και κάποια βαριά μέταλλα (Kuc, 2001).

Επομένως η επαγόμενη αντοχή λειτουργεί κυρίως σαν μια γενική βελτίωση της άμυνας του φυτού, η οποία δεν είναι κληρονομική ή εξειδικευμένη, αλλά αποκτάται σαν αποτέλεσμα της διέγερσης ή ευαισθητοποίησης του φυτού σε διάφορους τύπους παθογόνων (Βακαλουνάκης και Φραγκιαδάκης, 2003). Επίσης σπάνια εμποδίζει την εμφάνιση της ασθένειας, ενώ γενικά μειώνει την έκταση και την ένταση της (Hammerschmidt *et al.*, 2001).

Έχει αποδειχθεί ότι κατά την επαγόμενη αντοχή εκφράζονται οι ίδιοι μηχανισμοί άμυνας όπως και στους άλλους τύπους ενεργής άμυνας (Hammerschmidt and Dann, 1997), π.χ. την αντίδραση υπερευαισθησίας και την γρήγορη συσσώρευση στα κύτταρα αμυντικών ουσιών όπως βιοπολυμερή και ανόργανες ουσίες, κάποιες απ' τις οποίες είναι άμεσα αντιμικροβιακές, ενώ άλλες παρεμποδίζουν την ανάπτυξη των παθογόνων με τη δημιουργία εμποδίων (εικ. 4) (Kuc, 2001) (βλ. παρ.1.5).



Εικόνα 4: Οι συνιστώσες της αρχικής μεταγωγής του σήματος κατά την επαγωγή αντοχής περιλαμβάνουν το nitric oxide (NO) και τα reactive oxygen intermediates (ROI) που είναι γνωστά ως oxidative burst. Το NO είναι δυνατό να ρυθμίζει την διαθεσιμότητα σιδήρου που χρειάζεται για την παραγωγή των τοξικών, ελεύθερων ριζών υδροξειλίου κατά την αντίδραση

Φαίνεται ότι η επαγόμενη αντοχή έχει πολλές ομοιότητες με την πολυγονιδιακή ανθεκτικότητα καθώς τα φυτά και στις δύο περιπτώσεις:

- ο είναι ανθεκτικά σε ένα εύρος φυλών των παθογόνων
- ο έχουν υψηλά επίπεδα υδρολυτικών/αντιοξειδωτικών ενζύμων

αλλά η ερώτηση παραμένει: είναι τα ίδια γονίδια που εμπλέκονται στη πολυγονιδιακή ανθεκτικότητα και την επαγόμενη αντοχή (Tuzun, 2001);

Γενικά οι αντιδράσεις των φυτών όταν είναι ευάλωτα στο παθογόνο είναι ποιοτικά ίδιες με όταν είναι ανθεκτικά στο παθογόνο και διαφέρουν μόνο στο χρόνο που εμφανίζονται. Η ανθεκτικότητα και η επαγόμενη αντοχή σχετίζονται με μια γρήγορη αντίδραση, αλλά οι ουσίες άμυνας είναι συχνά ίδιες. Όταν το φυτό είναι ευάλωτο οι ποσότητες των ουσιών που παράγονται είναι συχνά μεγαλύτερες από όταν το φυτό είναι ανθεκτικό (Kuc, 2001).

Παρόλο που η επαγόμενη αντοχή δεν είναι ιδιαίτερα εξειδικευμένη εμφανίζει κάποια διαφοροποίηση. Συγκεκριμένα η διασυστηματική επαγόμενη αντοχή είναι πιο αποτελεσματική κατά των μυκήτων και λιγότερο κατά των βακτηρίων και πολύ λιγότερο κατά των ιών. Επίσης μερικοί χημικοί παράγοντες που επάγουν αντοχή είναι πιο αποτελεσματικοί σε ορισμένες ασθένειες από άλλους.

Αυτό μπορεί να εξηγηθεί από τις διαφορετικές επιδράσεις σε διαφορετικούς παράγοντες μιας πολυπαραγοντικής αντίδρασης ανθεκτικότητας, γιατί δεν είναι όλες οι ουσίες άμυνας το ίδιο αποτελεσματικές κατά των παθογόνων. Για παράδειγμα η χιτινάση δεν έχει ρόλο σαν αμυντική ουσία κατά ενός μύκητα που δεν έχει στα τοιχώματα του χιτίνη, ενώ αυτός μπορεί να ενεργοποιήσει την συσσώρευση χιτινάσης (Kuc, 2001).

1.8 Παράγοντες που Επάγουν Αντοχή

Περιορισμένες μολύνσεις από παθογόνα (μύκητες, βακτήρια και ιοί) μπορούν να επάγουν αντοχή στο φυτό τόσο σε συμβατές όσο και σε μη συμβατές αλληλεπιδράσεις με τον ξενιστή (αντίδραση υπερευαισθησίας, HR) (Hammerschmidt and Dann, 1997).

Επαγωγή αντοχής επιτυγχάνεται επίσης από την εφαρμογή μη παθογόνων μικροοργανισμών στο φύλλο, το έδαφος ή το ριζικό σύστημα, όπως μύκητες και βακτήρια (Hammerschmidt *et al.*, 2001). Επιπρόσθετα, διάφορα φυτικά εκχυλίσματα έχει αποδειχθεί ότι δρουν με τον ίδιο τρόπο (Belanger and Labbe, 2002).

Εκτός από τους μικροοργανισμούς, υπάρχουν και χημικές ουσίες που επάγουν αντοχή και είτε παρασκευάζονται π.χ. dinitroaniline, (ζιζανιοκτόνο), (Ooestenoorp *et al.*, 2001) ή απομονώνονται από φυσικές πηγές π.χ. oxalate από το σπανάκι και λιπαρά οξέα (fatty acids) από φαινολικά οξέα (phenolic acids) (Hammerschmidt and Dann, 1997).

Μέχρι τώρα, έχουν βρεθεί 2 τάξεις που μιμούνται τη βιοχημική ενεργοποίηση της επαγόμενης αντοχής από παθογόνα:

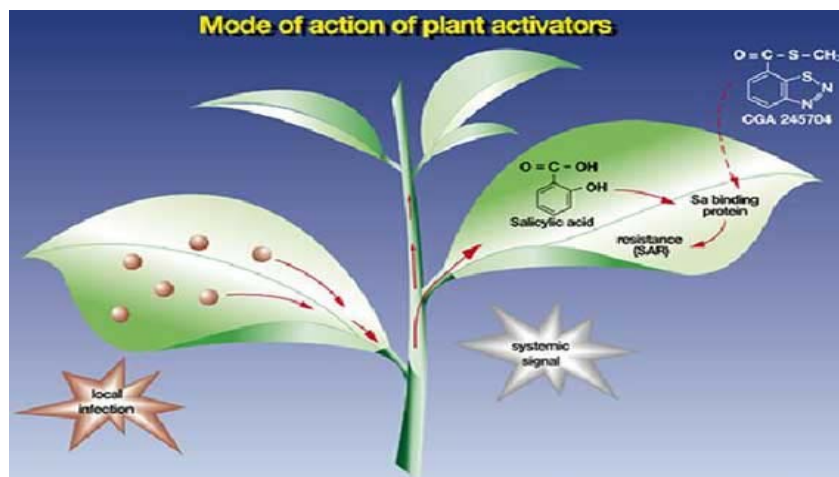
α) το 2,6 δίχλωροισονικοξινικό οξύ (INA) και τα παράγωγα του (Mettraux *et al.*, 2001) και **β)** τα παράγωγα της benzo(1,2,3)thiadiazole όπως το acibenzolar-s-methyl (ASM) που κυκλοφορεί στο εμπόριο με τα ονόματα Bion, Actigard και Boost (Kunz *et al.*, 1997).

Επίσης οι περιβαλλοντικοί παράγοντες είναι δυνατόν να επηρεάσουν την αντίδραση του ξενιστή στην προσβολή από το παθογόνο π.χ. η

προσαρμογή του χειμερινού σιταριού στο κρύο που επάγει αντοχή στο μύκητα *Microdochium nivale* (Ellingboe, 2001).

Τέλος η αποτελεσματικότητα των μηχανισμών της επαγόμενης αντοχής μπορεί να επηρεαστεί σημαντικά απ' την ανάμιξη των σημάτων που παράγονται από βιοτικά και αβιοτικά στρές όπως ξηρασία, έλλειψη θρεπτικών ουσιών ή υψηλή αλατότητα του εδάφους. Τέτοια είδη στρές μπορούν να κάνουν τα φυτά πιο ευάλωτα στις ασθένειες μέσω αλλαγών στη φυσιολογία τους (Bostock *et al.*, 2001).

Ανάλογα με το αρχικό ερέθισμα (παθογόνο φυλλώματος, ριζοβακτήριο, τεχνητή μόλυνση ή πληγή) και μετά την ροή ιόντων, τη παραγωγή νιτρικού οξειδίου και ελεύθερου οξυγόνου, ενεργοποιούνται διαφορετικοί 'δρόμοι' μεταγωγής του σήματος (Mettraux, 2001). Αυτοί οι 'δρόμοι' ελέγχονται από δευτερεύουσες ενδογενείς ρυθμιστικές ουσίες διασυστηματικού σήματος όπως το σαλικυλικό οξύ (Salicylic Acid, S.A.) (εικ.4), το αιθυλένιο και το ιασμονικό οξύ (Jasmonic Acid, J.A.), που επάγουν αντιδράσεις άμυνας (πχ. παραγωγή PR – πρωτεϊνών) και που χρειάζονται ή δεν χρειάζονται NPR1/NIM 1 (λειτουργικά γονίδια).



Εικόνα 4: Η μόλυνση του φυτού επάγει ένα άγνωστο ερέθισμα το οποίο προκαλεί την παραγωγή σαλικυλικού οξέος. Το σαλικυλικό οξύ ενεργοποιεί άλλους μηχανισμούς οι οποίοι παράγουν ένζυμα και πρωτεΐνες που προστατεύουν το φυτό από τις ασθένειες

Διαφορετικές ουσίες και 'δρόμοι' μπορούν να ελέγχουν διαφορετικές βιοχημικές αντιστάσεις. Η ενεργοποίηση ενός από τους 'δρόμους' μπορεί να ανταγωνίζεται ή να ενισχύει την δραστηριοποίηση / αποτελεσματικότητα του άλλου (Kuc, 2001).

Οι διασταυρώσεις μεταξύ αυτών των 'δρόμων' υπονοούν την ύπαρξη ενός δικτύου που εμπεριέχει διάφορα εξωτερικά σήματα. Για παράδειγμα τα ένζυμα τα οποία υδρολύουν τα τοιχώματα των κυττάρων της *Erwinia carotovora* ενεργοποιούν το δρόμο του S.A. στο φυτό *Arabidopsis*, ο οποίος εξαρτάται απ' την εντοπισμένη δράση του αιθυλενίου και J.A. και δεν χρειάζεται ούτε το S.A. ούτε το NPR 1 λειτουργικό γονίδιο. Παρόλα αυτά μπορεί να ενδυναμωθεί από την παρουσία του S.A. Το S.A. έχει ένα διπλό ρόλο καθώς προάγει την επίδραση του J.A./αιθυλενίου ενώ καταστέλλει την ενεργοποίηση των ενζύμων που επάγονται μόνο από το J.A. (Hammerschmidt *et al.*, 2001).

Παρά τις προσπάθειες πολλών ερευνητών, η φύση των διασυστηματικών σημάτων δεν έχει βρεθεί.

1.9 Επαγόμενη Αντοχή στην Αγγουριά

Η επαγωγή αντοχής στην αγγουριά έχει μελετηθεί εκτενώς και υπάρχουν αρκετές αναφορές για την εκδήλωση της. Συγκεκριμένα, η τεχνητή μόλυνση ενός φύλλου με *Colletotrichum lagenarium* σε φυτά με ευαισθησία στην ανθράκωση είχε ως αποτέλεσμα την επαγωγή αντοχής ολόκληρου του φυτού στην ανθράκωση. Η αντοχή αυτή χαρακτηρίστηκε από τη μείωση στο μέγεθος και των αριθμό των κηλίδων που εμφανίστηκαν μετά την επαγωγή (Hammerschmidt and Dann, 1997).

Το εύρος της επαγόμενης αντοχής επεκτάθηκε στη συνέχεια σε αντοχή σε διάφορους μύκητες, βακτήρια και ιούς που προσέβαλαν το υπέργειο μέρος του φυτού.

Αντίστοιχα τεχνητή μόλυνση με μη παθογόνες φυλές του *Fusarium oxysporum* είχε ως αποτέλεσμα την επαγωγή αντοχής των φυτών σε ειδικές μορφές του *F. oxysporum* (Hammerschmidt and Dann, 1997).

Σε μεταγενέστερες μελέτες οι Hammerschmidt and Dann (1997), περιγράφουν έναν αριθμό παραμέτρων που σχετίζεται με την έκφραση της επαγόμενης διασυστηματικής αντοχής του αγγουριού στο *C. lagenarium*.

Υποστηρίζουν ότι αυτή η αντοχή επιτεύχθηκε με μόλυνση είτε του πρώτου πραγματικού φύλλου είτε μίας ή δύο κοτυληδόνων. Η κατάσταση της επαγόμενης αντοχής κράτησε 6 εβδομάδες μετά την αρχική τεχνητή μόλυνση και ήταν εμφανής και στα φύλλα που δεν είχαν εκπτυχθεί κατά την τεχνητή μόλυνση.

Το τελικό επίπεδο της διασυστηματικής επαγόμενης αντοχής φάνηκε να σχετίζεται με: α) την συγκέντρωση του μολύσματος που χρησιμοποιήθηκε για την επαγωγή και β) των αριθμό των κηλίδων που εμφανίστηκαν στο φύλλο στο οποίο έγινε η μόλυνση.

Επίσης, οι χαμηλές συγκεντρώσεις μολύσματος (10^3 σπόρια/ml) είχαν ως αποτέλεσμα την σημαντική αύξηση της αντοχής. Η διαφοροποίηση στον αριθμό των σταγόνων αιωρήματος των σπορίων του *C. lagenarium* στο φύλλο έπαιξε σημαντικό ρόλο στο τελικό επίπεδο της αντοχής.

Τέλος αποδείχθηκε ότι μία κηλίδα της ασθένειας στο πρώτο φύλλο του φυτού ήταν αρκετή για να επάγει αντοχή στο δεύτερο φύλλο, ενώ η αύξηση του αριθμού των κηλίδων στο πρώτο φύλλο φάνηκε να αυξάνει την αντοχή του δεύτερου φύλλου σημαντικά σε μεταγενέστερες μολύνσεις από το *C. lagenarium*.

Δεν σημειώθηκαν διαφορές μεταξύ των διαφόρων υβριδίων που δοκιμάστηκαν ενώ αύξηση της αντοχής σημειώθηκε και στα υβρίδια με ανθεκτικότητα στην ασθένεια. Ακόμα και όταν οι συγκεντρώσεις του μολύσματος ήταν υψηλές π.χ. (10^6 και 10^7 σπόρια/ml) η επαγόμενη αντοχή δεν χάθηκε τελείως.

Η επαγόμενη αντοχή αποδείχθηκε αποτελεσματική και σε υποχρεωτικά παράσιτα. Συγκεκριμένα μόλυνση του πρώτου φύλλου με τον ιό TNV είχε ως αποτέλεσμα την αντοχή του φυτού στο ωίδιο της αγγουριάς

(*Podosphaera xanthii*). Το επίπεδο της αντοχής επηρεάστηκε σημαντικά από τον αριθμό των κηλίδων του TNV στο πρώτο φύλλο όπου πραγματοποιήθηκε η μόλυνση. Η αντοχή χαρακτηρίστηκε από μια σημαντική μείωση των αποικιών του ωιδίου και μείωση της παραγωγής κονιδίων (Hammerschmidt and Yang-Cashman, 1995).

Σύμφωνα με τους Hammerschmidt *et al.* (2001), αιωρήματα μυκήτων που προάγουν την ανάπτυξη των φυτών, προστατεύουν την αγγουριά από το *Colletotrichum orbiculare* με την προαγωγή της εναπόθεσης λιγνίνης στα κυτταρικά τοιχώματα.

Συμπερασματικά η επαγωγή αντοχής στην αγγουριά είναι σε μεγάλο βαθμό μη εξειδικευμένη τόσο όσον αφορά το παθογόνο που χρησιμοποιήθηκε για την επαγωγή όσο και το/τα παθογόνα απ' τα οποία προστατεύεται το φυτό (Hammerschmidt and Dann, 1997).

1.10 Μηχανισμοί Επαγόμενης Αντοχής των Φυτών στα Ωΐδια

Οι μηχανισμοί που ενεργοποιούνται ως αποτέλεσμα της επαγόμενης αντοχής και παρεμποδίζουν την προσβολή των φυτών από τα ωΐδια είναι οι εξής :

α) Δημιουργία των *papillae*. Τα *papillae* (θηλές) έχει αποδειχθεί ότι περιβάλλουν τα *haustoria* (μυζητήρες) και παρεμποδίζουν την επέκτασή τους μέσα στο κύτταρο κυρίως όμως στα μονοκοτυλήδονα φυτά. Στα κολοκυνθοειδή δεν φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο στην αντοχή κατά των ωιδίων.

β) Υδρολυτικά ένζυμα. Τα υδρολυτικά ένζυμα όπως οι β-1,3 γλουκανάσες και χιτινάσες, ανήκουν στην οικογένεια των PR πρωτεϊνών και είναι γνωστά για την αντιμικροβιακή τους δράση *in vitro* σε πολλά φυτικά είδη. Οι πρωτεΐνες αυτού του είδους δεν φαίνεται να συμμετέχουν στην επαγωγή αντοχής στα κολοκυνθοειδή εναντίον των ωιδίων.

γ) Αντίδραση υπερευαισθησίας. Η αντίδραση υπερευαισθησίας ή τοπικός κυτταρικός θάνατος, είναι ένα φαινόμενο που συχνά σχετίζεται με την επαγωγή αντοχής. Παρ'όλα αυτά η αντίδραση υπερευαισθησίας δεν έχει

παρατηρηθεί σε κηπευτικά μετά την εφαρμογή βιολογικών επαγωγέων αντοχής.

δ) Φυτοαλεξίνες. Στην αγγουριά έχει αναφερθεί ότι η παρουσία φαινολικών ενώσεων σχετίζεται με την αποβολή των *haustoria* (μυζητήρων) των ωιδίων. Επιπρόσθετα αποδείχθηκε ότι οι φυτοαλεξίνες είναι βασικές για τη μείωση της εμφάνισης της ασθένειας. Σε άλλα πειράματα που χρησιμοποιήθηκε διαλυτή σιλικόνη για την επαγωγή αντοχής κύριο ρόλο έπαιξαν τα φλαβονοειδή και τα φαινολικά οξέα που έχουν σημαντικές αντιμικροβιακές ιδιότητες. Οι φαινολικές ενώσεις αποδείχτηκε ότι συμβάλλουν στην καταστροφή των μυζητήρων στην αγγουριά και άρα είναι ένα αποτελεσματικό αμυντικό όπλο κατά των ωιδίων (Belanger and Labbe, 2002).

1.11 Βιολογικοί Παράγοντες ως Επαγωγείς Αντοχής στα Ωΐδια

Τα τελευταία 15-20 χρόνια έχουν γίνει πολλές και διάφορες μελέτες πάνω στη χρήση βιολογικών παραγόντων κατά των ωιδίων. Αυτή η πρόοδος έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση πολλών σκευασμάτων στο εμπόριο με βάση μύκητες ή βακτήρια που ειδικεύονται στην καταπολέμηση των ωιδίων. Παρόλα αυτά όπως ισχύει για τον οποιοδήποτε βιολογικό παράγοντα, ο βαθμός αποτελεσματικότητας τους ποικίλει και γίνονται προσπάθειες για την πιο σταθερή απόδοση τους.

Οι περισσότεροι παράγοντες ανήκουν στους μύκητες και αυτό γιατί οι μύκητες είναι πιο κατάλληλοι από άλλους μικροοργανισμούς της φυλλόσφαιρας για την καταπολέμηση των ωιδίων. Ένας λόγος για αυτό είναι ότι οι περισσότεροι απ' τους μύκητες που χρησιμοποιούνται ως ανταγωνιστές των ωιδίων έχει ανακαλυφθεί ότι αναπτύσσονται κοντά στις αποικίες των ωιδίων. Αντίθετα κανένα βακτήριο-ανταγωνιστής δεν έχει αναφερθεί μέχρι σήμερα να προσβάλει τα ωΐδια στη φύση.

Μέχρι πρόσφατα δύο ήταν οι τρόποι δράσης των μυκήτων-ανταγωνιστών : ο παρασιτισμός και η παραγωγή αντιβιοτικών. Αρκετοί ερευνητές πρότειναν και έναν τρίτο τρόπο δράσης, αυτόν της επαγόμενης

αντοχής. Υπάρχουν ενδείξεις ότι σε αρκετές περιπτώσεις η αποτελεσματικότητα των μυκήτων δεν οφείλεται ούτε σε παρασιτισμό ούτε σε παραγωγή αντιβιοτικών και επομένως η μόνη πιθανή εξήγηση είναι η επαγωγή αντοχής. Παρ'όλα αυτά είναι πολύ πιθανό η αποτελεσματικότητα ενός ανταγωνιστή να βασίζεται σε περισσότερους από ένα τρόπους δράσης (Belanger and Labbe,2002).

1.12 *Acremonium* sp.

Ο μύκητας *Acremonium* sp. ανήκει στους Αδηλομύκητες και την τάξη Moniliales. Είναι ένα νεκροφυτικό υπερπαρασίτο. Ο *Acremonium alternatum* έχει πολλές φορές απομονωθεί από το θαλλό του *Podosphaera xanthii*, από διάφορα μέρη της Κρήτης και έχει χρησιμοποιηθεί για την καταπολέμηση του ωιδίου της αγγουριάς και της τομάτας. Παρασιτεί το θαλλό και τα κονίδια του μύκητα *P. xanthii*, αλλά ο ακριβής τρόπος δράσης του δεν είναι πλήρως εξακριβωμένος.

Τα σπόρια του *Acremonium* sp. είναι υαλόχροα και παράγονται σε αλυσίδες. Το μυκήλιο είναι υαλόχρουν και πολυκύτταρο. Η άριστη θερμοκρασία για την βλάστηση των σπορίων και την ανάπτυξη του μυκηλίου είναι 37°C ενώ ο παρασιτισμός λαμβάνει χώρα σε θερμοκρασία μεγαλύτερη από 15°C και όταν η σχετική υγρασία κυμαίνεται από 70-90%. Καλλιεργείται εύκολα σε διάφορα μυκητολογικά υποστρώματα, όπως PDA, τόσο σε στερεά όσο και σε υγρά, σε θαλάμους παλινδρομικής κίνησης (Malathrakis, 1989).

Μελέτες στις οποίες ο *A. alternatum* δοκιμάστηκε ως επαγωγέας αντοχής (νεκρά κονίδια), στην τομάτα κατά του *Leveillula taurica* έδωσαν μέτρια αποτελέσματα. Αποδείχτηκε ότι η επαγωγή αντοχής από την εφαρμογή του *A. alternatum*, ήταν διασυστηματική στα φύλλα της τομάτας και είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση του αριθμού των κηλίδων τόσο στα ψεκασμένα όσο και στα αφέκαστα φύλλα. Το επίπεδο της αποτελεσματικότητας φάνηκε να επηρεάζεται σημαντικά από την θερμοκρασία και την ηλικία των φύλλων (Kasselaki, 2004).

2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1.1 Γενικά

Ο σκοπός των πειραμάτων που περιγράφονται παρακάτω ήταν η διερεύνηση της δυνατότητας των *A. alternatum* και *A. implicatum* να επάγουν την αντοχή της αγγουριάς εναντίον του ωιδίου της αγγουριάς (*P. xanthii*). Στο πλαίσιο αυτό διερευνήθηκε και ο χρόνος εφαρμογής πριν την τεχνητή μόλυνση και η διασυστηματικότητα της επαγόμενης αντοχής.

2.1.2 Παρασκευή Θρεπτικών Υποστρωμάτων

Για την διατήρηση των κοτυληδόνων χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό υλικό Water Agar (W.A.). Το W.A. παρασκευαζόταν με την προσθήκη 15gr Agar σε 1lt νερό (Σεληνάρι). Η αποστείρωση γινόταν στον κλίβανο στους 121°C για 15 λεπτά. Το υλικό παρέμενε σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι να κρυώσει αρκετά και ακολούθως επροστίθετο το παρακάτω μείγμα σε 2ml αποστειρωμένο, απιονισμένο νερό: 0,1 gr κιτρικό οξύ, 0,1 gr ασκορβικό οξύ (αντιοξειδωτικές ουσίες), 0,001 gr ινδολοβουτυρικό οξύ (ορμόνη ανάπτυξης) και 1 ml καναμικίνη (αντιβιοτικό) που είχε φιλτραριστεί σε ειδικό φίλτρο διαμέτρου οπών 25μm, για την αποφυγή των βακτηρίων.

Για την καλλιέργεια και την ανάπτυξη των μυκήτων *A. alternatum* και *A. implicatum* χρησιμοποιήθηκε το Potato Dextrose Agar (P.D.A.) που παρασκευαζόταν ως εξής: Σε 1lt αποστειρωμένο, απιονισμένο νερό προστείθονταν 20 gr Agar, 20gr δεξτρόζη και το εκχύλισμα από 200 gr πατάτας. Ακολουθούσε η προσθήκη γαλακτικού οξέος για τη ρύθμιση του pH στο 5,5-6,0, ώστε να αποφευχθεί η ανάπτυξη βακτηρίων. Η αποστείρωση γινόταν στον κλίβανο στους 121°C για 15 λεπτά. Με την ολοκλήρωση της αποστείρωσης και αφού το θρεπτικό υπόστρωμα είχε κρυώσει λίγο προστείθονταν 1 ml καναμικίνη. Τα θρεπτικά υποστρώματα μοιράζονταν σε τριβλία και φυλάσσονταν στους 4±1°C μέχρι τη χρησιμοποίησή τους.

2.1.3 Παραγωγή Κοτυληδόνων

Χρησιμοποιήθηκαν σπόροι αγγουριάς της ποικιλίας "Κνωσός". Οι σπόροι έμπαιναν για προβλάστηση πριν φυτευτούν στην κομπόστα, σε γυάλινο τριβλίο με απορροφητικό χαρτί και στις δυο επιφάνειες για να συγκρατεί το νερό, στους 25°C για 24 ώρες. Η διαδικασία της προβλάστησης γινόταν για την επιτάχυνση της έκπτυξης του αρχικού ριζιδίου του σπόρου και συνέβαλε στην αύξηση της επιτυχίας των βλαστανόντων σπόρων αλλά και στον υπολογισμό του βαθμού βλαστικότητας του σπόρου.

Έπειτα οι σπόροι φυτεύονται σε βάθος περίπου 2εκ. σε πλαστικούς δίσκους με κομπόστα, ποτίζονταν και τοποθετούνταν σε θάλαμο ανάπτυξης φυτών στους 25°C και φωτοπερίοδο 12 /12.

Οι κοτυληδόνες συλλέγονταν 5-7 μέρες μετά την σπορά και απολυμαίνονταν πριν να τοποθετηθούν στο θρεπτικό υπόστρωμα.

2.1.4 Απολύμανση Κοτυληδόνων

Η απολύμανση των κοτυληδόνων γινόταν με εμβάπτιση σε υποχλωριώδες νάτριο (0,5 %), για 3 λεπτά. Ακολουθούσε διπλό ξέπλυμα σε αποιονισμένο και αποστειρωμένο νερό για 3 λεπτά και κατόπιν καλό στέγνωμα σε αποστειρωμένο απορροφητικό χαρτί στο θάλαμο νηματικής ροής.

2.1.5 Καλλιέργεια και Διατήρηση των Υπερπαράσιτων

Τα υπερπαράσιτα καλλιεργούνταν ανά τακτά χρονικά διαστήματα έτσι ώστε κατά την εφαρμογή τους στην κάθε επέμβαση να έχουν ηλικία επτά (7) ημερών. Οι καλλιέργειες τοποθετούνταν σε θάλαμο επώασης στους 23°C και 12/12 φωτοπερίοδο. Οι καλλιέργειες προέρχονταν από το αρχικό στοκ του εργαστηρίου, μεταφέροντας τα σπόρια ή και το μυκήλιο του μύκητα με την λούπα, σε καινούργια τριβλία με θρεπτικό υπόστρωμα. Ένας άλλος τρόπος ήταν η μεταφορά μικρών κομματιών θρεπτικού υποστρώματος με τον μύκητα

επάνω από αρχικές καλλιέργειες σε καινούργια τριβλία με P.D.A. Οι καλλιέργειες των 7 ημερών που δεν χρησιμοποιούνται, διατηρούνται στους 5 °C.

2.1.6 Προετοιμασία και Εφαρμογή των Επεμβάσεων

Στα πειράματα που έγιναν, εφαρμόστηκαν επεμβάσεις με ζωντανά και νέκρα σπόρια των μυκήτων *A.alternatum* και *A. implicatum*. Τα σπόρια συλλέγονταν με έκπλυση του τριβλίου με αποστειρωμένο και απιονισμένο νερό και με αποστειρωμένο μαλακό πινελάκι.

Στη συνέχεια γινόταν αραιώση 1:100 και μέτρηση στο αιματοκυστόμετρο για να βρούμε την συγκέντρωση των σπορίων στο αρχικό αιώρημα. Η συγκέντρωση των σπορίων σε όλες τις επεμβάσεις ήταν 1×10^7 σπόρια / ml. Η θανάτωση των σπορίων γινόταν σε κλίβανο αποστείρωσης στους 121°C για 15 λεπτά. Οι επεμβάσεις των υπερπαρασίτων γίνονταν 5, 3, 1 και 0 μέρες πριν την τεχνητή μόλυνση με το παθογόνο.

Η εφαρμογή των υπερπαρασίτων γινόταν με εμβάπτιση των κοτυληδόνων στο αιώρημα των σπορίων για 3 λεπτά και έπειτα καλό στέγνωμα σε αποστειρωμένο απορροφητικό χαρτί.

2.1.7 Τεχνητή Μόλυνση

Το παθογόνο διατηρούνταν σε φυτά αγγουριάς της ποικιλίας 'Κνωσός' στο θερμοκήπιο. Συλλέγονταν μολυσμένα αλλά χλωρά φύλλα που τινάζονταν για να απορρηφθούν τα γηραιότερα κονίδια. Το μόλυσμα τοποθετούνταν στις κοτυληδόνες με εντομολογική βέλονα σε έξι διαφορετικά σημεία ανα κοτυληδόνα.

2.1.8 Εκτίμηση Προσβολής

Η εκτίμηση της προσβολής γινόταν με την πρώτη εμφάνιση των κονιδιοφόρων, 5-7 μέρες μετά την τεχνητή μόλυνση. Καταγραφόταν ο

αριθμός των κονιδιοφόρων του *P. xanthii* ανά σημείο και υπολογιζόταν ο μέσος όρος των κονιδιοφόρων ανά κοτυληδόνα.

Στα δεδομένα έγινε ανάλυση διασποράς (ANOVA) και η σύγκριση των επεμβάσεων με το τέστ του Tuckey. Το ποσοστό σημαντικότητας ορίσθηκε στο 95%. Χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πακέτο SPSS for Windows (version 11.0).

2.2 Πειράματα

Πείραμα 1

Εφαρμόστηκαν σπόρια του *A. alternatum* νεκρά και ζωντανά σε κοτυληδόνες αγγουριάς μια μέρα (-1) πριν και την ίδια μέρα (0) με την τεχνητή μόλυνση. Χρησιμοποιήθηκαν 7 κοτυληδόνες ανά επέμβαση.

Πείραμα 2

Εφαρμόστηκαν σπόρια του *A. implicatum* νεκρά και ζωντανά σε κοτυληδόνες αγγουριάς πέντε μέρες (-5), τρεις μέρες (-3) και μία μέρα (-1) πριν την τεχνητή μόλυνση. Χρησιμοποιήθηκαν 10 κοτυληδόνες ανά επέμβαση.

Πείραμα 3

Το πείραμα πραγματοποιήθηκε σε θάλαμο ανάπτυξης στους 25°C και 12/12 φωτοπερίοδο. Χρησιμοποιήθηκαν φυτά αγγουριάς (γλάστρες) στο στάδιο των κοτυληδόνων. Εφαρμόστηκε αιώρημα νεκρών σπορίων του *A. alternatum* (10^7 σπόρια / ml) στην μια κοτυληδόνα (κοτυληδόνα 1) πέντε μέρες (-5) και τρεις μέρες (-3) πριν την τεχνητή μόλυνση. Η τεχνητή μόλυνση έγινε με αιώρημα σπορίων του *P. xanthii* (3×10^4 σπόρια / ml). Χρησιμοποιήθηκαν 10 φυτά ανα επέμβαση.

Η εκτίμηση της προσβολής έγινε με την πρώτη εμφάνιση των συμπτωμάτων, 7 μέρες μετά την τεχνητή μόλυνση. Καταγράφηκε ο αριθμός των κηλίδων / κοτυληδόνα και ο αριθμός των κονιδιοφόρων / κηλίδα στις κοτυληδόνες και στο πρώτο πραγματικό φύλλο.

2.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Πείραμα 1

Τα αποτελέσματα του πειράματος παρουσιάζονται στον πίνακα 1. Γενικά η εφαρμογή του *A. alternatum* μια μέρα πριν την τεχνητή μόλυνση ήταν σημαντικά καλύτερη από τον μάρτυρα και από την εφαρμογή του *A. alternatum* την ίδια μέρα με την τεχνητή μόλυνση (ζωντανού ή νεκρού).

Στην εφαρμογή μια μέρα πριν την τεχνητή μόλυνση ο μύκητας νεκρός ήταν σημαντικά καλύτερος από ότι ζωντανός. Όταν ο μύκητας εφαρμοζόταν την ημέρα της τεχνητής μόλυνσης, δεν παρεμπόδιζε την προσβολή από το ωίδιο.

Πίνακας 1: Σύγκριση των μέσων όρων του αριθμού των κονιδιοφόρων / κοτυληδόνα για τις διαφορετικές επεμβάσεις κατά του *P. xanthii* σε κοτυληδόνες αγγουριάς *in vitro* (Πείραμα 1)

Επέμβαση	Ομάδα		
	1	2	3
A. alter. νεκ. (-1 μέρα)	15,5		
A. alter. ζων. (-1 μέρα)		29,5	
A. alter. ζων. (0 μέρα)			41,2
A. alter. νεκ. (0 μέρα)			47,2
Μάρτυρας			49,2
Σημαντικότητα	1,0	1,0	0,2

Οι μέσοι όροι που είναι στην ίδια ομάδα δεν διαφέρουν σημαντικά κατά Tuckey ($p \leq 0,05$)

Πείραμα 2

Τα αποτελέσματα του πειράματος παρουσιάζονται στον πίνακα 2. Ο χρόνος εφαρμογής του *A. implicatum* αποδείχθηκε σημαντικός. Συγκεκριμένα, η εφαρμογή πιο κοντά στη τεχνητή μόλυνση (-1) έδωσε σημαντικά καλύτερα αποτελέσματα απ' ό,τι 5 και 3 μέρες πριν την τεχνητή μόλυνση που τα αποτελέσματα ήταν ίδια με τον μάρτυρα. Δεν υπήρξαν σημαντικές διαφορές μεταξύ του ζωντανού και του νεκρού μύκητα.

Πίνακας 2: Σύγκριση των μέσων όρων του αριθμού των κονιδιοφόρων / κοτυληδόνα για τις διαφορετικές επεμβάσεις κατά του *P. xanthii* σε κοτυληδόνες αγγουριάς *in vitro* (Πείραμα 2)

Επέμβαση	Ομάδα	
	1	2
A. impl. ζων. (-1 μέρα)	6,5	
A. impl. νεκ. (-1 μέρα)	9,5	
A. impl. νεκ. (-3 μέρα)		57,2
A. impl. ζων. (-3 μέρα)		57,8
Μάρτυρας		63,4
A. impl. νεκ. (-5 μέρα)		64,5
A. impl. ζων. (-5 μέρα)		70,8
Σημαντικότητα	0,9	0,2

Οι μέσοι όροι που είναι στην ίδια ομάδα δεν διαφέρουν σημαντικά κατά Tuckey ($p \leq 0,05$)

Πείραμα 3

Το *A. alternatum* μείωσε σημαντικά τον αριθμό των κονιδιοφόρων του παθογόνου τόσο στην ψεκάσμενη όσο και στην αφέκαστη κοτυληδόνα ενώ δεν είχε καμία επίδραση στο πρώτο πραγματικό φύλλο (πίνακας 3).

Ο χρόνος εφαρμογής αποδείχτηκε σημαντικός για την διασυστηματική δράση καθώς ο μύκητας στην αφέκαστη κοτυληδόνα (κοτυληδόνα 2) ήταν σημαντικά καλύτερος από τον μάρτυρα μόνο όταν ψεκάστηκε 3 μέρες πριν την τεχνητή μόλυνση (πίνακας 3).

Η εφαρμογή του *A. alternatum* δεν είχε σημαντικό αποτέλεσμα στη μείωση των κηλίδων του παθογόνου σε καμία κοτυληδόνα, ανεξάρτητα από τον χρόνο εφαρμογής (πίνακας 4).

Πίνακας 3: Σύγκριση των μέσων όρων του αριθμού των κονιδιοφόρων / κηλίδα για τις διαφορετικές επεμβάσεις κατά του *P. xanthii* σε ψεκασμένες κοτυληδόνες (κοτυληδόνα 1), σε αφέκαστες κοτυληδόνες (κοτυληδόνα 2) και στο 1^ο φύλλο (αφέκαστο) φυτών αγγουριάς (Πείραμα 3)

Αριθμός κονιδιοφόρων / κηλίδα			
Επέμβαση	Κοτυληδόνα 1	Κοτυληδόνα 2	1^ο Φύλλο
<i>A. alter.</i> νεκ. (-3 μέρα)	29,6 α	33,3 α	35,5 α
<i>A. alter.</i> νεκ. (-5 μέρα)	36,4 α	46,2 β	38,0 α
Μάρτυρας	49,9 β	42,5 β	43,6 α

Πίνακας 4: Σύγκριση των μέσων όρων του αριθμού των κηλίδων για τις διαφορετικές επεμβάσεις κατά του *P. xanthii* σε ψεκασμένες κοτυληδόνες (κοτυληδόνα 1) και σε αφέκαστες κοτυληδόνες (κοτυληδόνα 2) φυτών αγγουριάς (Πείραμα 3)

Αριθμός κηλίδων		
Επέμβαση	Κοτυληδόνα 1	Κοτυληδόνα 2
<i>A. alter.</i> νεκ. (-3 μέρα)	16,5 α	16,5 α
<i>A. alter.</i> νεκ. (-5 μέρα)	15,3 α	18,8 α
Μάρτυρας	18,1 α	16,6 α

Οι μέσοι όροι που έχουν το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν σημαντικά κατά Tuckey ($p \leq 0,05$)

3. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στη διάρκεια αυτής της πτυχιακής εργασίας έγινε μια σειρά πειραμάτων, τα περισσότερα απ' τα οποία δεν παρουσιάζονται είτε γιατί η προσβολή ήταν πολύ χαμηλή, είτε γιατί η μέθοδος τεχνητής μόλυνσης που χρησιμοποιήθηκε δεν εξασφάλισε ομοιογένεια της προσβολής με αποτέλεσμα να είναι αδύνατη η στατιστική ανάλυση. Επομένως η δουλειά που παρουσιάζεται μπορεί να θεωρηθεί μόνο ως προκαταρκτική. Η διεξαγωγή περισσότερων πειραμάτων κρίνεται απαραίτητη για την εξαγωγή τελικών και ολοκληρωμένων συμπερασμάτων.

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων που παρουσιάζονται έδειξαν ότι τόσο το *A. alternatum* όσο και το *A. implicatum* είχαν σημαντική αποτελεσματικότητα στην μείωση του αριθμού των κονιδιοφόρων του *P. xanthii* στις κοτυληδόνες αγγουριάς.

Το γεγονός ότι τα δυο υπερπαρασίτα ήταν εξίσου αποτελεσματικά και όταν εφαρμόστηκαν νεκρά υποδηλώνει ότι ο τρόπος δράσης τους μπορεί να περιλαμβάνει εκτός από τον υπερπαρασιτισμό και την επαγωγή ανοχής. Εξάλλου η μείωση του αριθμού των κονιδιοφόρων ως αποτέλεσμα της επαγωγής ανοχής της αγγουριάς στο ωίδιο (*P. xanthii*) έχει αναφερθεί και σε άλλες μελέτες (Hammerschmidt and Yang-Cashman, 1995), αλλά όχι με υπερπαρασίτα.

Ο χρόνος εφαρμογής των υπερπαρασίων αποδείχθηκε σημαντικός και στα δυο πειράματα που έγιναν *in vitro*. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι για την επίτευξη της επαγωγής ανοχής, η εφαρμογή πρέπει να προηγηθεί της προσβολής από το παθογόνο, αλλά όχι πολλές μέρες πριν, καθώς η αποτελεσματικότητα μπορεί να μειωθεί σημαντικά.

Τα συγκεκριμένα πειράματα έδειξαν ότι η εφαρμογή μια μέρα πριν την τεχνητή μόλυνση έδωσε τα καλύτερα αποτελέσματα. Συγκεκριμένα για το *A. implicatum* νεκρό η μείωση του αριθμού των κονιδιοφόρων έφτασε το 86% (πείραμα 2) ενώ για το *A. alternatum* νεκρό η μείωση έφτασε το 69% (πείραμα 1).

Παρόμοιες μελέτες στο παθοσύστημα αγγουριά - *P. xanthii* στις οποίες χρησιμοποιήθηκαν ως επαγωγείς μη μολυσματικές φυλές παθογόνων ή phosphates έδωσαν ποικίλλα αποτελέσματα όσον αφορά τον χρόνο εφαρμογής. Συγκεκριμένα ενώ για τα phosphates ο χρόνος εφαρμογής έπρεπε να είναι κοντά στην τεχνητή μόλυνση, για τις μη μολυσματικές φυλές παθογόνων όπως το *Alternaria cucumarina* και το *Cladosporium fulvum* ο χρόνος εφαρμογής δεν είχε ιδιαίτερη σημασία (Reuveni and Reuveni, 2000).

Η αποτελεσματικότητα του *A. alternatum* αποδείχθηκε και *in vivo* (πείραμα 3) όπου η μείωση των κονιδιοφόρων έφτασε το 40% και 23% στις ψεκασμένες και απέκαστες κοτυληδόνες αντίστοιχα, ενώ η μείωση ήταν ασήμαντη στο πρώτο πραγματικό φύλλο.

Με βάση τα παραπάνω μπορεί να ειπωθεί ότι η επαγωγή αντοχής στην αγγουριά ήταν μετρίως διασυστηματική. Πιθανότατα η αποτυχία καταπολέμησης του παθογόνου στο πρώτο πραγματικό φύλλο να οφείλεται στη διαφορετική φυσιολογία που μπορεί να έχει αυτό σε σχέση με τις κοτυληδόνες.

Εξάλλου παρόμοια μείωση στην αποτελεσματικότητα της επαγόμενης αντοχής στα φύλλα της αγγουριάς όσο μακρύτερα βρίσκονται από το ψεκασμένο φύλλο έχει παρατηρηθεί και στα πειράματα με τα phosphates (Reuveni and Reuveni, 2000).

Στο ίδιο πείραμα το *A. alternatum* δεν κατάφερε να μειώσει τον αριθμό των κηλίδων του *P. xanthii* στις κοτυληδόνες αγγουριάς. Γενικά ενώ η επαγωγή αντοχής επιφέρει μείωση στον αριθμό των κηλίδων στα φύλλα της αγγουριάς όπως έχουν δείξει πολλές μελέτες δεν υπάρχουν αναφορές για κοτυληδόνες αγγουριάς.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Βακαλουνάκης, Δ. Ι., Φραγκιαδάκης, Γ. Α. 2003. Φυτοπαθοβελτίωση με έμφαση στη τομάτα και τα κολοκυνθοειδή 518.

Δημητράκης, Κ.Γ. 1998. Οικ. Κολοκυνθίδες (Cucurbitaceae). Από *Λαχανοκομία*. Εκδόσεις 'ΆγροΤύπος Α.Ε.

Ζιώγας, Ν., Ντελής, Δ. Σχορτσανίτης, Κ. 1992. Κόστος και οικονομικά αποτελέσματα. Από *Κόστος παραγωγής αγροτικών προϊόντων και αποδοτικότητα της ελληνικής γεωργίας (1969-1989)*. Εκδόσεις 'ΓΡΑΜΜΑ' 225-226.

Παναγόπουλος, Χ.Γ. 1995. Ασθένειες κολοκυνθοειδών. Από *Ασθένειες κηπευτικών καλλιεργειών*. Εκδόσεις Α. ΣΤΑΜΟΥΛΗΣ 233- 300.

Πεδιαδιτάκης, Γ. 2002. Σημειώσεις Ειδικής Λαχανοκομίας II, ΤΕΙ Ηρακλείου, Σχολή Τεχνολογίας Γεωπονίας, Τμήμα ΘΕΚΑ, σελ. 1-4.

Φανουράκης, Ν. 2002. Η μοριακή βάση της ανθεκτικότητας των φυτών στις ασθένειες. Από *Γενετική Βελτίωση Φυτών- Βασικές αρχές*. Εκδόσεις 'ΙΩΝ' 225-234.

Agrios, G. N. 1997. Plant Pathology. Academic Press.

Atkinson, M. M. 1993. Molecular mechanisms of pathogen recognition by plants. *Adv. Plant Pathology* 10: 35-64.

Baker, C. J., Orlandi, E. W. 1995. Active oxygen in plant pathogenesis. *Annual Review of Phytopathology* 33: 299-321.

Belanger, R. R. & Labbe, C. 2002. Control of powdery mildews without chemicals: prophylactic and biological alternatives for horticultural crops. In *The powdery mildews. A comprehensive treatise*, edited by R. R. Belanger,

Bushnell, W. R., Dik, A. J. & Carver, T. L. W. St. Paul, Minnesota: APS Press.

Bostock, R. M., Karban, R., Thaler, J. S., Weyman, P. D. & Gilchrist, D. 2001. Signal interactions in induced resistance to pathogens and insect herbivores. *European Journal of Plant Pathology* 107 (1):103-111.

Ellingboe, A. H. 2001. Plant-pathogen interactions: genetic and comparative analyses. *European Journal of Plant Pathology* 107:79-84.

Flor, H. H. 1971. Current status of the gene for gene concept. *Annual Review of Phytopathology* 9: 275-295.

Hammerschmidt, R. & Yang-Cashman, P. 1995. Induced resistance in cucurbits. In *Induced resistance to disease in plants*, edited by R. Hammerschmidt and J. Kuc, Kluwer Academic Publishers, 63-85.

Hammerschmidt, R. & Dann, E. K. 1997. Induced resistance. In *Environmentally safe approaches to crop disease control*, edited by N. A. R. Rechcigl, J. E. Florida: CRC Press LLC.

Hammerschmidt, R., Metraux, J. P., VanLoon, L. C. 2001. Inducing resistance: a summary of papers presented at the First International Symposium on Induced Resistance to Plant diseases, Corfu, May 2000. *European Journal of Plant Pathology* 107 (1):1-6.

Heath, M. C. 1998. Apoptosis, programmed cell death and hypersensitive response. *European Journal of Plant Pathology* 104: 117-124.

Heath, M. C. 2000. Hypersensitive response-related death. *Plant Molecular Biology* 44: 321-334.

Jackson, A. O., Taylor, C. B., 1996. Plant-Microbe Interactions: life and death at the interface. *Plant Cell* 8:1651-1668.

Kasselaki, A.M. 2004. Studies on the epidemiology and the biological control of *Leveillula taurica* (Lev.) Arn. on greenhouse tomato. PhD. Thesis. The University of Reading, U.K.

Knogge, W. 1996. Fungal infection of plants. *Plant Cell* 8:1711-1722.

Kombrink, E. & Schmelzer, E. 2001. The hypersensitive response and its role in local and systemic disease resistance. *European Journal of Plant Pathology* 107 (1):69-78.

Kuc, J. A., 2000. Development and future direction of induced systemic resistance in plants. *Crop protection* 19: 859-861.

Kuc, J. A., 2001. Concepts and direction of induced systemic resistance in plants and its application. *European Journal of Plant Pathology* 107 (1):7-12.

Kunz, W., Schurter, R. & Maetzke, T. 1997. The chemistry of benzothiadiazole plant activators. *Pesticide Science* 50:275-282.

Lamb, C., Dixon, A. 1997. *Annual Review Plant Physiology Plant Molecular Biology* 48:251-275.

Malathrakis, N.E., 1989. Control of powdery mildew by *Acremonium alternatum*. Presented in Practical application of integrated control in protected crops, Joint Expert's meeting, France.

McGrath, M. T. & Thomas, C. E. 1998. Powdery mildew. *In Compendium of cucurbit diseases*, edited by T. A. Zitter, D. L. Hopkins & C.E. Thomas. APS Press 28-30

Metraux, J. P. 2001. Systemic acquired resistance and salicylic acid: current state of knowledge. *European Journal of Plant Pathology* 107 (1):13-18.

Nicholson, R. L., Hammerschmidt, R. 1992. Phenolic compounds and their role in disease resistance. *Annual Review of Phytopathology* 30: 369-389.

Oostendorp, M., Kunz, W., Dietrich, B. & Staub, T. 2001. Induced disease resistance in plants by chemicals. *European Journal of Plant Pathology* 107 (1):19-28.

Reuveni, M. & Reuveni, R. 2000. Prior inoculation with non-pathogenic fungi induces systemic resistance to powdery mildew on cucumber plants. *European Journal of Plant Pathology* 106:633-638.

Shah, D. M., Rommens, C. M. T., Beachy, R. N. 1995. Resistance to disease and insects in transgenic plants: progress and applications to agriculture. *Trends Biotechnology* 13:362-368.

Tuzun, S. 2001. The relationship between pathogen-induced resistance (ISR) and multigenic (horizontal) resistance in plants. *European Journal of Plant Pathology* 107 (1):85-93.