



Καινοτόμες λύσεις για τη βιώσιμη και περιβαλλοντικά φιλική φυτοπροστασία των οπωροκηπευτικών της Ελλάδας, στην Ευρώπη του μέλλοντος

Παραδοτέο Π.4.5.1: Αποτελέσματα *in vitro* βιοδοκιμών ενδοφυτικών μικροβιακών απομονώσεων (ενδοφυτικών μικροβιακών απομονώσεων ως μονά στελέχη και ως μίγματα στελεχών)

Πληροφορίες για το έγγραφο

Αριθμός παραδοτέου: Π.4.5.1

Ενότητα εργασίας: ΕΕ4

Επικεφαλής δικαιούχος: [ΙΤΕ]

Συγγραφείς: [Αναστασία Βενιεράκη, Δημήτριος Γκούμας, Εμμανουήλ Μαρκάκης, Παναγιώτης Σαρρής, Αιμιλία Μαρκέλλου]

Έκδοση: 1.0

Είδος Παραδοτέου: [Πιλοτική Κατασκευή]

Ημερομηνία παράδοσης: [15/12/2025]

Στοιχεία Πράξης

Τίτλος: Καινοτόμες λύσεις για τη βιώσιμη και περιβαλλοντικά φιλική φυτοπροστασία των οπωροκηπευτικών της Ελλάδας, στην Ευρώπη του μέλλοντος

Τίτλος (ΕΝ): InnoPP-Innovations in Plant Protection for sustainable and environmentally friendly pest control

Κωδικός πράξης: ΤΑΕΔΡ-0535675

Ακρωνύμιο έργου: InnoPP

Ημερομηνία έναρξης: 15 Μαΐου 2023

Διάρκεια: 28 Μήνες

Συντονιστής Φορέας: Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Συντονιστής/ Επιστημονικός Υπεύθυνος: Ιωάννης Βόντας

Πίνακας Περιεχομένων

1	ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΣΤΟΧΟΙ.....	5
2	ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΩΝ ΕΡΓΑΣΙΩΝ	6
2.1	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	ΣΦΑΛΜΑ! ΔΕΝ ΕΧΕΙ ΟΡΙΣΤΕΙ ΣΕΛΙΔΟΔΕΙΚΤΗΣ.
2.2	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	ΣΦΑΛΜΑ! ΔΕΝ ΕΧΕΙ ΟΡΙΣΤΕΙ ΣΕΛΙΔΟΔΕΙΚΤΗΣ.
3	ΣΥΝΟΨΗ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	55
4	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ	56

Περίληψη του Έργου

Το έργο «Καινοτόμες λύσεις για τη βιώσιμη και περιβαλλοντικά φιλική φυτοπροστασία των οπωροκηπευτικών της Ελλάδας, στην Ευρώπη του μέλλοντος» στοχεύει στην ανάπτυξη σύγχρονων και καινοτόμων μεθόδων για την προστασία των καλλιεργειών όπως τα κηπευτικά, τα εσπεριδοειδή και το επιτραπέζιο σταφύλι. Περιλαμβάνει τη δημιουργία προηγμένων διαγνωστικών εργαλείων για την ανίχνευση εχθρών και παθογόνων με τεχνολογίες αιχμής, όπως ηλεκτρονικές παγίδες και βιοαισθητήρες, καθώς και πλατφόρμες αλληλούχισης για τον πλήρη προσδιορισμό των ιωμάτων. Επιπλέον, θα αναπτυχθούν μοντέλα πρόβλεψης επιδημιών και καινοτόμα βιοφυτοπροστατευτικά προϊόντα, τα οποία θα αξιολογηθούν για την ασφάλεια τους σε μη στόχους οργανισμούς. Τέλος, οι νέες τεχνολογίες θα ενσωματωθούν σε συστήματα ολοκληρωμένης διαχείρισης φυτοπροστασίας και θα δοκιμαστούν σε πραγματικές συνθήκες, ενώ θα αξιολογηθούν οι κοινωνικοοικονομικές και περιβαλλοντικές επιπτώσεις τους.

Σύνοψη της ΕΕ4

[Συνοπτική περιγραφή της Ενότητας Εργασίας στην οποία εντάσσεται το Παραδοτέο]
Στην ΕΕ4 θα αναπτυχθούν δράσεις που θα ενισχύσουν την αποτελεσματικότητα της βιολογικής καταπολέμησης. Θα γίνει βελτίωση της αρμοστικότητας των ωφέλιμων αρπακτικών και ενίσχυση της δράσης τους, καθώς επίσης και αξιοποίηση της λειτουργικής βιοποικιλότητας για την ανάπτυξη καλύτερα προσαρμοσμένης βιολογικής καταπολέμησης. Θα αναπτυχθούν βελτιωμένα προϊόντα για τη βιολογική καταπολέμηση, θα διερευνηθεί η αξιοποίηση άγριων αυτοφυών φυτών για την ενίσχυση των οικοσυστημικών υπηρεσιών για την αντιμετώπιση επιβλαβών οργανισμών μέσω της βιολογικής καταπολέμησης και θα ενισχυθεί η δράση παρασιτοειδών με χρήση ουσίων φυσικής προέλευσης ή/και «ωφέλιμων ιών». Θα αναπτυχθούν βελτιωμένες μέθοδοι για την αντιμετώπιση των εχθρών μέσω της χρήσης βακτηρίων και μικροοργανισμών. Θα αναπτυχθούν τέλος καινοτόμες μέθοδοι για την αντιμετώπιση των ζιζανίων, μέσω προσεγγίσεων αξιοποίησης της βιοποικιλότητας και καλλιεργητικών πρακτικών.

Συνοπτική παρουσίαση του παραδοτέου 4.5.1

Σκοπός του παραδοτέου Π4.5.1 είναι να μελετηθούν ένα εύρος ενδοφυτικών μικροβίων ως προς την *in vitro* βιολογική τους δράση έναντι διαφορετικών φυτοπαθογόνων βακτηρίων, μυκήτων και ωομυκήτων, που προσβάλλουν τα οπωροκηπευτικά.

Περιγράφεται η πρόοδος των εργασιών στα πλαίσια της Εμβληματικής δράσης «Καινοτόμες λύσεις για τη βιώσιμη και περιβαλλοντικά φιλική φυτοπροστασία των οπωροκηπευτικών της Ελλάδας, στην Ευρώπη του μέλλοντος», οι οποίες έλαβαν χώρα στα παρακάτω ερευνητικά Ινστιτούτα και Πανεπιστήμια:

- Ινστιτούτο Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας (IMBB) του Ιδρύματος Έρευνας και Τεχνολογίας (ΙΤΕ), και στο εργαστήριο «Μικροβιολογίας και Αλληλεπιδράσεων Μικροβίου – Ξενιστή» του Καθ. Π. Σαρρή,
- Ελληνικό Μεσογειακό Πανεπιστήμιο (ΕΛΜΕΠΑ), Τμήμα Γεωπονίας και συγκεκριμένα στο εργαστήριο «Βιοτεχνολογικών Εφαρμογών και Φυτοπροστασίας» του Καθ. Δ. Γκούμα,
- ΕΛΓΟ-ΔΗΜΗΤΡΑ, Εργαστήριο Μυκητολογίας του Ινστιτούτου Τροπικών, Ελιάς

- και Αμπέλου του Καθ. Ε. Μαρκάκη.
- Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών (ΓΠΑ), Τμήμα Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής, Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας της Δρ. Αναστασία Βενιεράκη.
 - Μπενάκειο Φυτοπαθολογικό Ινστιτούτο (ΜΦΙ), Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας της Δρ. Αιμιλία Μαρκέλλου

1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΣΤΟΧΟΙ

Εισαγωγή

Η ανάπτυξη και εφαρμογή εναλλακτικών μεθόδων αντιμετώπισης των εχθρών αποτελεί βασική απαίτηση του ΥΠΑΑΤ και της ΕΕ (άρθρο 28 του Ν. 4036/2012 περί υποχρέωσης εφαρμογής των Γενικών αρχών Ολοκληρωμένης Φυτοπροστασίας) ενώ ταυτόχρονα αποτελούν βασικό εργαλείο σε πρόγραμμα Ολοκληρωμένης Διαχείρισης της Ανθεκτικότητας (ΟΔΑ). Στα αποτελέσματα περιλαμβάνονται πρωτότυπα καινοτόμα προϊόντα και μέθοδοι που μπορούν να αξιοποιηθούν στα προγράμματα ολοκληρωμένης διαχείρισης και αντιμετώπισης των εχθρών των οπωροκηπευτικών, με πολύ μεγάλη σημασία για τον Αγροδιατροφικό τομέα της χώρας. Οι περιορισμοί της Ευρωπαϊκής Πράσινης Συμφωνίας επιβάλλουν τη δραστική μείωση των χημικών εντομοκτόνων, γεγονός που δημιουργεί ένα πολύ μεγάλο πρόβλημα στη γεωργική πρακτική, αφού δεν υπάρχουν επαρκή φυτοπροστατευτικά για την καταπολέμηση των εχθρών των καλλιεργειών". Τα παραδοτέα του έργου καλύπτουν ακριβώς αυτό το κενό, προσφέροντας λύσεις στη φυτοπροστασία.

Ένας από τους διάφορους μηχανισμούς δράσης των βιολογικών παραγόντων είναι να αναστέλλουν άμεσα τα διάφορα φυτοπαθογόνα, μέσω παραγωγής και έκκρισης κάποιας αντιμικροβιακής ουσίας, αντιμικροβιακών πρωτεϊνών ή μεταβολιτών (αντιβίωση). Επιπλέον, ένας άλλος μηχανισμός αντιμετώπισης των φυτοπαθογόνων είναι ο ανταγωνισμός για θρεπτικά και χώρο, αποκλείοντας με αυτόν τον τρόπο την ανάπτυξη του παθογόνου (ανταγωνισμός).

Σκοπός του παρόντος εγγράφου

Στην παρούσα υποενότητα εργασίας 4.5.1 μελετήθηκαν ένα εύρος από ενδοφυτικές βιολογικές απομονώσεις ως προς την ικανότητά τους να αναστέλλουν *in vitro* την ανάπτυξη φυτοπαθογόνων βακτηρίων, ωομυκήτων και μυκήτων.

Δομή του παρόντος εγγράφου

Το παρόν έγγραφο **ακολουθεί την παρακάτω δομή:**

- 1. Εισαγωγή και Στόχοι:** Παρουσιάζεται το πλαίσιο της έρευνας και οι στόχοι του εγγράφου.
- 2. Περιγραφή των Εργασιών:** 2.1. Υλικά και Μέθοδοι (με υποπαραγράφους ανά πείραμα και υπεύθυνη ομάδα), 2.2. Αποτελέσματα και Συζήτηση (με υποπαραγράφους ανά πείραμα και υπεύθυνη ομάδα).
- 3. Σύνοψη και Συμπεράσματα:** Βασικά ευρήματα της έρευνας και σχετικά συμπεράσματα.
- 4. Παράρτημα:** Βιβλιογραφικές αναφορές και συμπληρωματικοί πίνακες.

2 ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΩΝ ΕΡΓΑΣΙΩΝ

2.1 Υλικά και Μέθοδοι

2.1.1 *In vitro* βιοδοκιμές βακτηριακών απομονώσεων ενάντια των φυτοπαθογόνων βακτηρίων *Clavibacter michiganensis*, *Paracidovorax citrulli*, *Ralstonia solanacearum* και *Xanthomonas campestris* παθότυπος *campestris* (Εργ. Καθ. Π. Σαρρή)

Στις δοκιμασίες αντιπαραβολής χρησιμοποιήθηκαν διάφορες ενδοφυτικές απομονώσεις των γενών *Kushneria* spp., *Pseudomonas* spp., *Streptomyces* spp. και *Bacillus* spp., έναντι των φυτοπαθογόνων βακτηρίων *Clavibacter michiganensis*, *Ralstonia solanacearum*, *Paracidovorax citrulli* (*Acidovorax citrulli*) και *Xanthomonas campestris* παθότυπος *campestris*. Επιπλέον των ήδη χαρακτηρισμένων ενδοφυτικών βακτηρίων που χρησιμοποιήθηκαν, πραγματοποιήθηκε και μοριακός χαρακτηρισμός και άλλων μη χαρακτηρισμένων βακτηρίων για τον εμπλουτισμό της παρούσας μελέτης. Για το σκοπό αυτό, έγινε εκχύλιση του γενωμικού DNA των απομονώσεων και αλληλούχιση κατά Sanger του 16S ριβοσωμικού γονιδίου (16S rDNA) χρησιμοποιώντας τους εκκινητές 27f/1492r (**Αλληλουχία των εκκινητών στο Παράρτημα, Πίνακας 4.5.1-10**).

Συγκεκριμένα, τα διάφορα ενδοφυτικά και φυτοπαθογόνα βακτήρια αναπτύχθηκαν σε στέρεο θρεπτικό μέσο Nutrient Agar (NA), σύστασης 0,5% βακτηριολογικής πεπτόνης, 0,3% εκχυλίσματος ζύμης και 0,5% χλωριούχου νατρίου. Αρχικά, τα φυτοπαθογόνα βακτήρια αφέθηκαν να μεγαλώσουν σε όλη την επιφάνεια του τρυβλίου Petri μέσω ειδικού βαμβακοφόρου στυλεού και ακολούθως, τοποθετήθηκαν στην επιφάνεια τα ενδοφυτικά βακτήρια, σε διακριτές αποστάσεις μεταξύ τους. Ακολούθησε επώαση των τρυβλίων Petri στους 28^ο C και έλεγχος της ανάπτυξης του εκάστοτε φυτοπαθογόνου στις 24 ώρες και για έως και 96 ώρες ανάπτυξης.

2.1.2 *In vitro* βιοδοκιμές βακτηριακών απομονώσεων ενάντια των φυτοπαθογόνων μυκήτων και ωομυκήτων *Verticillium dahliae*, *Botrytis cinerea* και *Phytophthora nicotianae* (Εργ. Καθ. Π. Σαρρή)

Στις δοκιμασίες αντιπαραβολής χρησιμοποιήθηκαν επιλεγμένες ενδοφυτικές απομονώσεις, από αυτές που εξετάστηκαν ενάντια στα φυτοπαθογόνα βακτήρια (Παράγραφος 2.1). Η ανάπτυξή τους έγινε σε θρεπτικό μέσο Potato Dextrose Agar (PDA). Για την παραγωγή αυτού του θρεπτικού μέσου, αρχικά βράσαμε 200 γρ. πατάτες και στη συνέχεια, το υπερκείμενο της βράσης φιλτραρίστηκε και χρησιμοποιήθηκε μαζί με 20 γρ. δεξτρόζης, πεχαμετρήθηκε σε τελικό pH 5,6 και τέλος προστέθηκαν 15 γρ. άγαρ σε συνολικό όγκο 1 λίτρου.

Στις δοκιμασίες αντιπαραβολής, κόπηκαν δίσκοι φυτοπαθογόνων μυκήτων/ωομυκήτων ίσης διαμέτρου από ήδη αναπτυχθέντα τρυβλία PDA και τοποθετήθηκαν στη μία πλευρά του τρυβλίου. Στη συνέχεια, απλώθηκε στην άλλη πλευρά και σε γνωστή απόσταση (3 cm) σε ενιαία κατακόρυφη γραμμή η εκάστοτε ενδοφυτική απομόνωση. Ως μάρτυρας ελέγχου/σύγκρισης της ανάπτυξης χρησιμοποιήθηκε ο μύκητας/ωομύκητας μόνος του, χωρίς την ύπαρξη ενδοφυτικής απομόνωσης στο τρυβλίο. Η ανάπτυξή τους ελέγχθηκε σε τακτά χρονικά διαστήματα και έως ότου περάσει το φυτοπαθογόνο την κάθετη απόσταση των 3 cm (περίπου 15 έως 20 ημέρες για τα φυτοπαθογόνα *Verticillium dahliae* και *Phytophthora nicotianae* και 6 ημέρες για το φυτοπαθογόνο *Botrytis*

cinerea).

2.1.3 *In vitro* βιοδοκιμές ενδοφυτικών μικροβιακών απομονώσεων έναντι του φυτοπαθογόνου βακτηρίου *Clavibacter michiganensis* (Εργ. κ. Γκούμα)

Βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν: Το βακτηριακό στέλεχος του *C. michiganensis* που χρησιμοποιήθηκε στις δοκιμές είναι το στέλεχος αναφοράς CFBP4999T. Τα ενδοφυτικά βακτήρια που χρησιμοποιήθηκαν παρατίθενται στον **Πίνακα 4.5.1-1**. Τα βακτήρια καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα NAG (Nutrient Agar Glucose) στους 26°C για διάστημα δύο ημερών.

Πίνακας 4.5.1-1. Κατάλογος των ενδοφυτικών βακτηρίων και των συντομογραφιών τους που χρησιμοποιήθηκαν έναντι του *C. michiganensis* και του *A. citrulli*. Τα αρχικά «GL» υποδηλώνουν ότι τα βακτήρια αυτά έχουν απομονωθεί στο Εργαστήριο Βιοτεχνολογικών Εφαρμογών και Προστασίας Φυτών (ΗΜΥ), ενώ τα αρχικά «SRL» στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας & Αλληλεπιδράσεων Φυτών-Μικροβίων (ΙΜΒΒ, ΥοC).

Βακτήρια	Γένος/ Είδος	Βακτήρια	Γένος/ Είδος
Biological agents			
GL1		GL38	
GL2	<i>Bacillus</i> sp.	GL39	
GL3		GL40	<i>Bacillus</i> sp.
GL4	<i>Bacillus</i> sp.	GL41	
GL5	<i>Bacillus</i> sp.	GL44	
GL6		GL45	
GL7		SRL689	<i>Brevibacillus</i> sp.
GL8		SRL729	<i>Bacillus</i> sp.
GL9		SRL764	<i>Brevibacillus</i> sp.
GL10		SRL768	<i>Brevibacillus</i> sp.
GL11		SRL769	<i>Pseudomonas</i> sp.
GL12		SRL771	<i>Bacillus</i> sp.
GL13		SRL774	<i>Bacillus</i> sp.
GL14		SRL810	<i>Brevibacillus</i> sp.
GL15		SRL811	<i>Bacillus</i> sp.
GL16		SRL816	<i>Bacillus</i> sp.
GL17		SRL818	<i>Pseudomonas</i> sp.
GL18		SRL820	<i>Pseudomonas</i> sp.
GL19		SRL821	<i>Pseudomonas</i> sp.
GL20		SRL835	<i>Brevibacillus</i> sp.
GL21		SRL837	<i>Brevibacillus</i> sp.
GL22		SRL851	<i>Pseudomonas</i> sp.
GL23		SRL871	<i>Brevibacillus</i> sp.
GL24		SRL879	<i>Brevibacillus</i> sp.
GL25		SRL917	<i>Pseudomonas</i> sp.
GL26		SRL933	<i>Bacillus</i> sp.
GL27		SRL937	<i>Pseudomonas</i> sp.
GL28		SRL969	<i>Pseudomonas</i> sp.
GL29		SRL971	<i>Pseudomonas</i> sp.
GL30		SRL982	<i>Pseudomonas</i> sp.

GL31		SRL983	<i>Pseudomonas</i> sp.
GL32	<i>Bacillus</i> sp.	SRL987	<i>Brevibacillus</i> sp.
GL33		SRL1126	<i>Pseudomonas</i> sp.
GL34		SRL1301	<i>Brevibacillus</i> sp.
GL35		SRL1302	<i>Brevibacillus</i> sp.
GL36		SRL1324	<i>Pseudomonas</i> sp.
GL37		SRL1328	<i>Pseudomonas</i> sp.

In vitro δοκιμές παρεμπόδισης. Για τις δοκιμές παρεμπόδισης χρησιμοποιήθηκαν δύο μεθοδολογίες: Η *in vitro* ανταγωνιστική ικανότητα των στελεχών, έναντι του *Clavibacter michiganensis* (CFBP4999^T) αξιολογήθηκε με τις μεθοδολογίες του βαμβακοφόρου στυλεού (cotton swab) και της διπλής επίστρωσης (double layer). Και για τις δύο δοκιμασίες τα βακτήρια αναπτύχθηκαν σε μέσο NAG για δύο ημέρες. Για τη μέθοδο με βαμβακοφόρο στυλεό, το εμβόλιο του φυτοπαθογόνου *Clavibacter michiganensis* (Cm) ρυθμίστηκε σε OD₆₀₀ 0,1 σε αποστειρωμένο dH₂O και επιστρώθηκε στο θρεπτικό μέσο NAG. Μετά την απορρόφησή του εμβολίου, οι βακτηριακές απομονώσεις τοποθετήθηκαν με αποστειρωμένο βαμβακοφόρο στυλεό ως κηλίδες στο μέσο NAG. Το θρεπτικό με τα συγκαλλιεργούμενα βακτήρια τοποθετήθηκε για 2-3 ημέρες στους 26°C και μετρήθηκαν οι ζώνες αναστολής γύρω από τους δίσκους που υποδεικνύουν ζώνες καταστολής της ανάπτυξης του φυτοπαθογόνου.

Για τη δοκιμασία διπλής επίστρωσης, κάθε απομονωμένη αποικία τοποθετήθηκε στο κέντρο γυάλινου τρυβλίου Petri που περιείχε NAG και επώαστηκε για δύο ημέρες στους 26°C. Μετά την περίοδο καλλιέργειας, τα τρυβλία Petri με τις βακτηριακές απομονώσεις τοποθετήθηκαν στην απαγωγό ανάποδα σε γυάλινο καπάκι που περιείχε χλωροφόρμιο για 40 λεπτά. Στη συνέχεια, τα τρυβλία Petri αφέθηκαν ανοιχτά για να εξατμιστεί το χλωροφόρμιο και τοποθετήθηκαν για 20 λεπτά υπό υπεριώδη ακτινοβολία. Για την παρασκευή του μολύσματος του φυτοπαθογόνου βακτηρίου Cm που είχαν αναπτυχθεί σε μέσο NAG αιωρήθηκαν σε υγρό θρεπτικό κρυπτοκαζείνης (TSB, Condolab) συμπληρωμένο με άγαρ 0,4% (w/v) ώστε να επιτευχθεί OD₆₀₀ 0,1. Το μόλυσμα Cm τοποθετήθηκε πάνω στα τρυβλία Petri όπου αναπτύχθηκαν οι βακτηριακές απομονώσεις και αφέθηκε να στερεοποιηθεί. Τα τρυβλία επώαστηκαν στους 26°C για 2-3 ημέρες και μετρήθηκαν οι ζώνες αναστολής που αναπτύχθηκαν.

2.1.4 In vitro βιοδοκιμές ενδοφυτικών μικροβιακών απομονώσεων έναντι του φυτοπαθογόνου βακτηρίου *Acidovorax citrulli* (Εργ. κ. Γκούμα)

Βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν: Το βακτηριακό στέλεχος του *Acidovorax citrulli* (HMU50701) που χρησιμοποιήθηκε στις δοκιμές απομονώθηκε στο εργαστήριο από φυτά καρπουζιάς. Τα ενδοφυτικά βακτήρια που χρησιμοποιήθηκαν παρατίθενται στον **Πίνακα 4.5.1-1**. Τα βακτήρια καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα NAG (Nutrient Agar Glucose) στους 26°C για διάστημα δύο ημερών.

In vitro δοκιμές παρεμπόδισης. Για τις δοκιμές παρεμπόδισης χρησιμοποιήθηκαν δύο μεθοδολογίες: Η *in vitro* ανταγωνιστική ικανότητα των στελεχών, έναντι του *A. citrulli* (HMU50701) αξιολογήθηκε με τις μεθοδολογίες του βαμβακοφόρου στυλεού (cotton swab) και της διπλής επίστρωσης (double layer). Η μεθοδολογία που

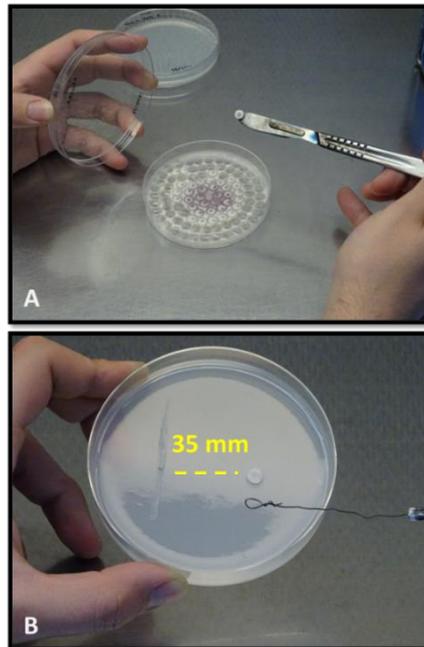
χρησιμοποιήθηκε είναι ίδια με αυτή που αναφέρεται στην παράγραφο 2.1.3.

2.1.5 *In vitro* βιοδοκιμές βακτηριακών στελεχών ενάντια σε φυτοπαθογόνους μύκητες (Εργ. Καθ. Εμμ. Μαρκάκη)

Μυκητολογικές απομονώσεις

Οι απομονώσεις των μυκήτων *Verticillium dahliae* (απομόνωση 999-1), *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-cucumerinum* (απομόνωση AFu68A) και *Botrytis cinerea* (απομόνωση B.14.9) ανήκουν στη μυκητοσυλλογή του Εργαστηρίου Μυκητολογίας του Ινστιτούτου Ελιάς, Υποτροπικών Φυτών και Αμπέλου, του Ελληνικού Γεωργικού Οργανισμού «ΔΗΜΗΤΡΑ» και έχουν ταυτοποιηθεί σε επίπεδο γένους ή/και είδους μορφολογικά, φυσιολογικά, μικροσκοπικά ή/και μοριακά ενώ έχουν χαρακτηριστεί ως έντονα μολυσματικά έναντι των ξενιστών τους.

In-vitro Δοκιμές αντιπαραβολής (Dual-culture Assays)



Εικόνα 4.5.1-1. A) Μεταφορά δισκίου φρέσκιας καλλιέργειας του μύκητα σε νέο τριβλίο και **B)** εμβολιασμός βακτηριακού στελέχους (μέθοδος γραμμικής διασποράς) ώστε να απέχει 35 mm από το εμβόλιο του παθογόνου.

Οι δοκιμές αντιπαραβολής (Dual-culture assays) πραγματοποιήθηκαν προκειμένου να διερευνηθεί η παρεμποδιστική δράση των δυνητικών βιολογικών παραγόντων όταν αυτοί βρίσκονται σε άμεση αλληλεπίδραση με το εκάστοτε παθογόνο (Lahlali et al., 2007). Δισκία διαμέτρου 5 mm από φρέσκια καλλιέργεια του εκάστοτε παθογόνου μύκητα (**Εικόνα 4.5.1-1A**), εμβολιάστηκαν σε νέα τριβλία με θρεπτικό υπόστρωμα PDA (ένα δισκίο/τριβλίο) έτσι ώστε το δισκίο να απέχει 25 mm από το τοίχωμα του τριβλίου. Στην συνέχεια, εμβολιάστηκε το εκάστοτε βακτηριακό στέλεχος με την μέθοδο της γραμμικής διασποράς (Streaking) με την χρήση μικροβιολογικού βρόχου, χαράσσοντας μια γραμμή στην απέναντι πλευρά του τριβλίου από την οποία είχε εμβολιαστεί το παθογόνο. Τόσο ο εμβολιασμός του παθογόνου όσο και ο εμβολιασμός του δυνητικού βιολογικού παράγοντα έγινε έτσι ώστε τα εμβόλια των δύο

μικροοργανισμών να απέχουν μεταξύ τους 35 mm (**Εικόνα 4.5.1-1B**) (Christakis et al., 2021). Για τα τρυβλία του μάρτυρα, αντί βακτηρίου τοποθετήθηκαν δίσκια αποστειρωμένου PDA. Η εν λόγω διαδικασία πραγματοποιήθηκε σε θάλαμο αναστρεφόμενης νηματικής ροής υπό ασηπτικές συνθήκες. Τέλος, τα τρυβλία τοποθετήθηκαν σε επωαστικό θάλαμο σε θερμοκρασία 24 °C και σε συνθήκες σκότους. Για την προκαταρκτική αξιολόγηση των βακτηριακών στελεχών πραγματοποιήθηκαν τυπικές δοκιμές αντιπαραβολής. Για κάθε βακτηριακό στέλεχος πραγματοποιήθηκε μια επανάληψη - τρυβλίο ανά παθογόνο. Αντίθετα, για την διεξοδική αξιολόγηση των πιο αποτελεσματικών βακτηριακών στελεχών (από τα 31), οι δοκιμές αντιπαραβολής αποτελούνταν από πέντε επαναλήψεις - τρυβλία ανά παθογόνο, για το εκάστοτε βακτηριακό στέλεχος.

***In-vitro* Δοκιμές πτητικών (Dual-plate Assays)**

Οι δοκιμές πτητικών (Dual-plate assays) πραγματοποιήθηκαν προκειμένου να διερευνηθεί η πιθανότητα οι δυνητικοί βιολογικοί παράγοντες να επιδρούν στην ανάπτυξη του εκάστοτε παθογόνου διαμέσου των πτητικών ενώσεων που εκλύουν. Στις δοκιμές αυτές, ο παθογόνος μικροοργανισμός και το βακτηριακό στέλεχος εμβολιάζονται με τρόπο τέτοιο ώστε να μοιράζονται τον ίδιο εναέριο χώρο αλλά χωρίς να έρχονται σε άμεση επαφή (Chaurasia et al., 2005). Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν δύο τρυβλία με θρεπτικό υπόστρωμα PDA όπου στο ένα εμβολιάστηκε ο παθογόνος μικροοργανισμός με την μεταφορά δισκίου διαμέτρου 5 mm φρέσκιας καλλιέργειας του εκάστοτε παθογόνου στο κέντρο του θρεπτικού υλικού (**Εικόνα 4.5.1-2A**) ενώ στο άλλο εμβολιάστηκε το προς αξιολόγηση βακτηριακό στέλεχος με την μέθοδο της γραμμικής διασποράς (επτά γραμμές ζιγκ - ζαγκ) (**Εικόνα 4.5.1-2B**). Έπειτα, αφού τα καπάκια των τρυβλίων απομακρύνθηκαν, οι βάσεις των τρυβλίων προσαρμόστηκαν και στην συνέχεια σταθεροποιήθηκαν με μεμβράνη (**Εικόνα 4.5.1-2Γ**). Η εν λόγω διαδικασία πραγματοποιήθηκε σε θάλαμο αναστρεφόμενης νηματικής ροής υπό ασηπτικές συνθήκες. Τέλος, τα τρυβλία τοποθετήθηκαν σε επωαστικό θάλαμο σε θερμοκρασία 24 °C και σε συνθήκες σκότους. Οι δοκιμές πτητικών πραγματοποιήθηκαν κατά την αξιολόγηση των πιο αποτελεσματικών βακτηριακών στελεχών και αποτελούνταν από πέντε επαναλήψεις - τρυβλία ανά παθογόνο για το εκάστοτε βακτηριακό στέλεχος.



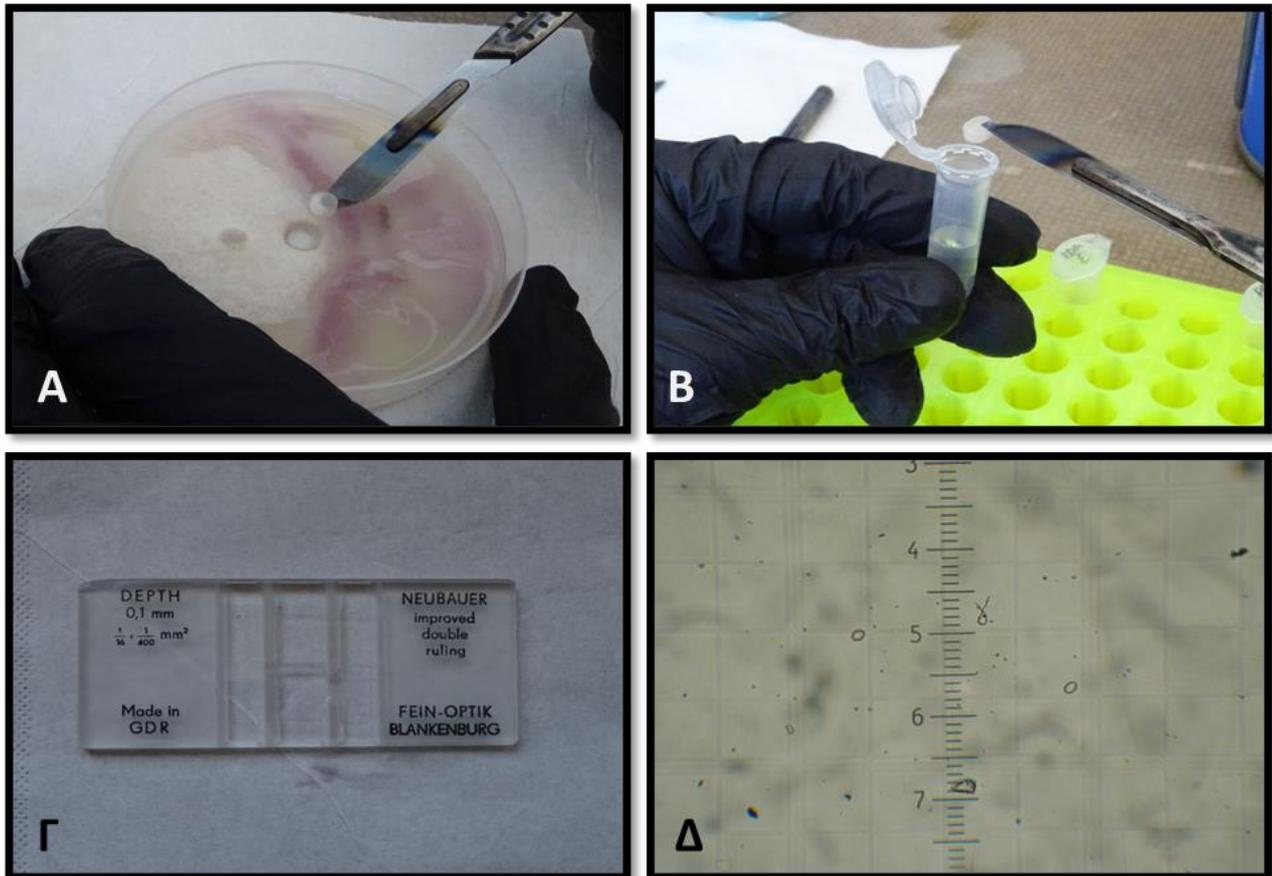
Εικόνα 4.5.1-2. Α) Εμβολιασμός παθογόνου μύκητα με μεταφορά δισκίου φρέσκιας καλλιέργειας, **Β)** Εμβολιασμός του υπό αξιολόγηση βακτηριακού στελεχούς, και **Γ)** Ολοκληρωμένη βιοδοκιμή πτητικών.

κατασταλτικής δράσης των βακτηριακών στελεχών

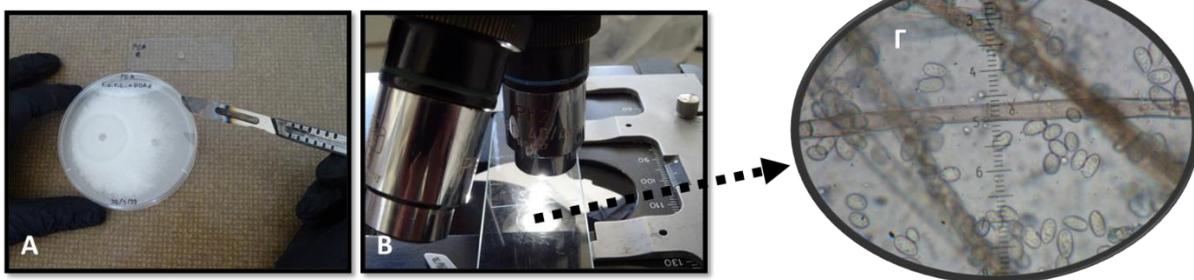
Οι μυκητολογικοί παράμετροι που ελέγχθηκαν κατά την αξιολόγηση των βακτηριακών στελεχών ήταν η ακτινωτή ανάπτυξη του μυκηλίου του παθογόνου (mm/ημέρα), ο αριθμός των παραγόμενων κονιδίων (αριθμός κονιδίων ή δισκίο φρέσκιας καλλιέργειας διαμέτρου 5 mm) και το πάχος των υφών (μm). Επιπρόσθετα, λήφθηκαν μετρήσεις σχετικά με το εμβαδόν των σχηματιζόμενων μικροσκληρωτίων σε cm² για τον μύκητα *Verticillium dahliae* και τον αριθμό των σκληρωτίων για τον μύκητα *Botrytis cinerea*. Κατά την προκαταρκτική αξιολόγηση πραγματοποιήθηκαν καταγραφές μόνο για τη μυκηλιακή ανάπτυξη του παθογόνου ενώ κατά τη διεξοδική αξιολόγηση των πιο αποτελεσματικών βακτηριακών στελεχών πραγματοποιήθηκαν καταγραφές για όλες τις προαναφερθείσες παραμέτρους τόσο για τα τριβλία των δοκιμών αντιπαραβολής όσο και για τα τριβλία των δοκιμών με πτητικά.

Ειδικότερα, οι μετρήσεις για την μυκηλιακή ανάπτυξη γινόταν περιοδικά, ανάλογα πάντα με τον ρυθμό ανάπτυξης του εκάστοτε παθογόνου στο θρεπτικό υπόστρωμα. Στις δοκιμές αντιπαραβολής, για την καταγραφή των μετρήσεων χρησιμοποιήθηκε χάρακας όπου η ένδειξη "0" τοποθετούνταν στο κέντρο του δισκίου (εμβολίου) του παθογόνου. Η μέτρηση αφορούσε το μήκος της ακτίνας του αναπτυσσόμενου μυκηλίου με κατεύθυνση προς το υπό εξέταση βακτηριακό στέλεχος. Στις δοκιμές πτητικών, ο χάρακας τοποθετούνταν στο κέντρο του δισκίου και στην συνέχεια λήφθησαν καταγραφές για το μήκος της ακτίνας του αναπτυσσόμενου μυκηλίου προς τέσσερις κατευθύνσεις προκειμένου να προκύψει ένας μέσος όρος. Τα αποτελέσματα της ακτινωτής ανάπτυξης του μυκηλίου εκφράστηκαν σε mm/ ημέρα. Τέλος, οι καταγραφές του ρυθμού ανάπτυξης έληγαν είτε όταν το αναπτυσσόμενο μυκήλιο του εκάστοτε παθογόνου ξεπερνούσε το δισκίο του αποστειρωμένου PDA στα τριβλία του μάρτυρα (δοκιμές αντιπαραβολής) είτε όταν το αναπτυσσόμενο μυκήλιο κάλυπτε ολοκληρωτικά την επιφάνεια του τρυβλίου (δοκιμές πτητικών).

Για την αξιολόγηση των πιο αποτελεσματικών βακτηριακών στελεχών εξετάστηκαν επιπλέον τόσο ο αριθμός των παραγόμενων κονιδίων όσο και το πάχος των υφών. Με την ολοκλήρωση των καταγραφών του ρυθμού ανάπτυξης τόσο από τα τριβλία των δοκιμών αντιπαραβολής όσο και από τα τριβλία των δοκιμών με πτητικά, αποκόπηκαν με την χρήση φυλλοτρυπητήρα δισκία διαμέτρου 5 mm από την περιφέρεια του αναπτυσσόμενου μυκηλίου (**Εικόνα 4.5.1-3Α**) (για τις δοκιμές αντιπαραβολής τα δισκία αποκόπηκαν από το τμήμα της καλλιέργειας που κατευθύνονταν προς το υπό αξιολόγηση βακτηριακό στέλεχος). Τα δισκία τοποθετήθηκαν σε σωληνάρια Eppendorf όγκου 1.5 ml τα οποία περιείχαν 1 ml απεσταγμένου νερού (**Εικόνα 4.5.1-3Β**). Αφού πραγματοποιήθηκαν οι κατάλληλες αραιώσεις πραγματοποιήθηκε καταγραφή του αριθμού των παραγόμενων κονιδίων με την χρήση αιματοκυτταρομέτρου υπό μεγέθυνση μικροσκοπίου (**Εικόνα 4.5.1-3Γ, Δ**). Μετέπειτα, από κάθε επέμβαση επιλέχθηκε ένα αντιπροσωπευτικό τριβλίο και από την περιφέρεια του αναπτυσσόμενου μυκηλίου προετοιμάστηκε μικροσκοπικό παρασκεύασμα στο οποίο μετρήθηκαν και καταγράφηκαν τα πάχη από 30 τυχαίες υφές, υπό μεγέθυνση μικροσκοπίου (**Εικόνα 4.5.1-4**).

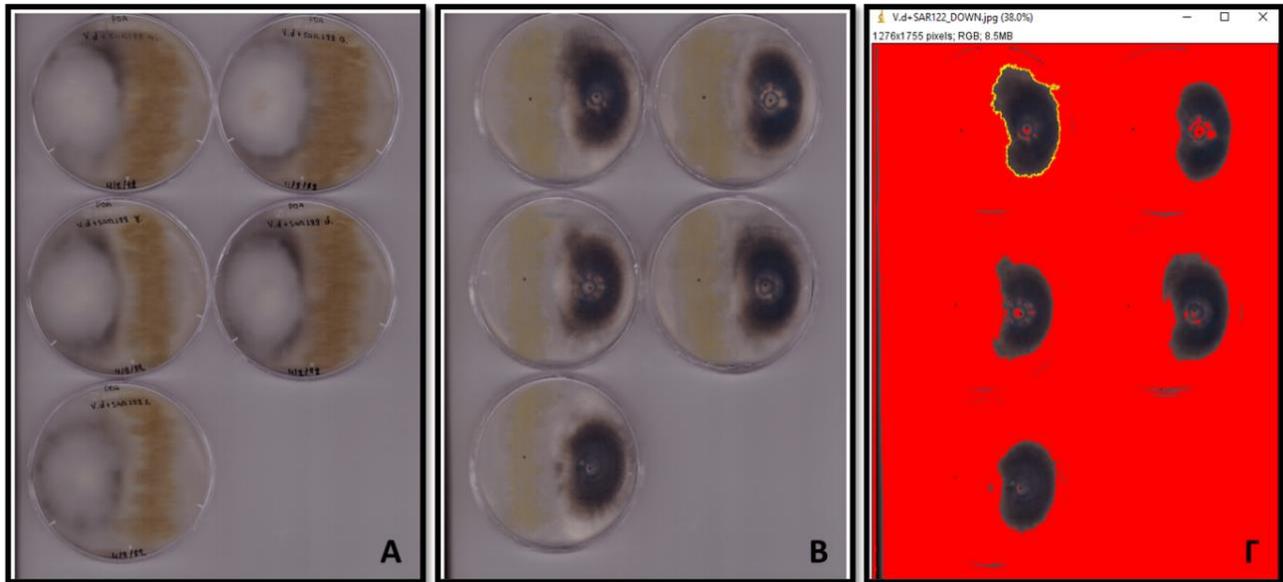


Εικόνα 4.5.1-3. Α) Αποκοπή δισκίου από την περιφέρεια του μύκητα, **Β)** μεταφορά σε σωληνάριο Eppendorf όγκου 1.5 ml, **Γ)** προετοιμασία αιματοκυτταρομέτρου και **Δ)** καταγραφή αριθμού κονιδίων στο αιματοκυτταρόμετρο υπό μεγέθυνση μικροσκοπίου.



Εικόνα 4.5.1-4. Α) Προετοιμασία μικροσκοπικού παρασκευάσματος από αντιπροσωπευτικό τριβλίο δοκιμών αντιπαραβολής και **Β)** μικροσκοπική παρατήρηση, **Γ)** Μέτρηση πάχους υφών του μύκητα *B. cinerea* υπό μεγέθυνση μικροσκοπίου.

Στην περίπτωση του μύκητα *V. dahliae*, εκτός τις παραπάνω παραμέτρους, μετρήθηκε και το εμβαδόν των σχηματισμένων μικροσκληρωτίων (cm^2) την τελευταία ημέρα των καταγραφών και στους δύο τύπους βιοδοκιμών με σαρωτή, ενώ οι εικόνες επεξεργάστηκαν το πρόγραμμα ImageJ, έτσι ώστε το εμβαδόν των μικροσκληρωτίων να μεταφραστεί σε cm^2 (**Εικόνα 4.5.1-5**). Τέλος, αναφορικά με τον μύκητα *B. cinerea* ο αριθμός των σχηματισμένων σκληρωτίων στις αποικίες μετρήθηκε μακροσκοπικά.



Εικόνα 4.5.1-5. Σάρωση **A)** της άνω και **B)** της κάτω επιφάνειας τριβλίων των δοκιμών αντιπαραβολής. **Γ)** Επεξεργασία φωτογραφιών με το πρόγραμμα ImageJ και εκτίμηση του αριθμού εικονοστοιχείων (pixels) που αντιστοιχεί στην επιφάνεια της περιοχής που καλύπτεται από μικροσκληρώτια του μύκητα *Verticillium dahliae*.

Στατιστική ανάλυση

Η ανάλυση διακύμανσης της διασποράς (ANOVA) χρησιμοποιήθηκε για να αξιολογηθεί η σημαντικότητα της επίδρασης των 31 απομονωμένων βακτηριακών στελεχών στις διάφορες μικροβιολογικές παραμέτρους των παθογόνων *Botrytis cinerea*, *Verticillium dahliae* και *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-cucumerinum* *in vitro*. Επιπλέον χρησιμοποιήθηκε η στατιστική δοκιμασία F ($P \leq 0.05$) προκειμένου να διερευνηθεί η ύπαρξη στατιστικών διαφορών μεταξύ των επεμβάσεων. Ακολούθως, τα αποτελέσματα υποβλήθηκαν σε διαχωρισμό των μέσων όρων σύμφωνα με τη στατιστική δοκιμασία *Tukey*. Τέλος, υπολογίστηκαν οι μέσοι όροι, οι τυπικές αποκλίσεις και τα τυπικά σφάλματα των μετρήσεων.

2.1.6 *In vitro* βιοδοκιμές γενών *Bacillus* ενάντια σε φυτοπαθογόνα βακτήρια και μύκητες (Εργ. Δρ. Α. Βενιεράκη)

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν ενδοφυτικές βακτηριακές απομονώσεις του γένους *Bacillus* (*B. halotolerans*, *B. subtilis*, *B. velezensis*, *B. safensis*), οι οποίες είχαν προηγουμένως ταυτοποιηθεί μοριακά και καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό Nutrient Agar (NA) για τις *in vitro* δοκιμές (Tsalgaidou et al., 2022;2023). Για τις *in vitro* βιοδοκιμές αντιπαραβολής έναντι φυτοπαθογόνων βακτηρίων (*Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*, *P. savastanoi* pv. *savastanoi*, *P. syringae* pv. *tomato*), εφαρμόστηκε μέθοδος ομαδικής κινητικότητας (swarming motility) σε ημιστερεό NA (0,5%), με εμβολιασμό σε ζεύγη και επώαση στους 28°C για 24 ώρες, ώστε να παρατηρηθούν φαινόμενα αναχαίτισης ή σχηματισμός διαφανούς γραμμής οριοθέτησης (demarcation line). Για τις δοκιμές έναντι μυκήτων (*Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum*, *Verticillium dahliae*), απομονώθηκε μυκήλιο από καλλιέργειες σε PDA, το οποίο τοποθετήθηκε σε NA (1,5%) σε απόσταση 3 cm από εμβόλιο *Bacillus* και επώαστηκε

στους 25°C για τουλάχιστον 7 ημέρες.

2.1.7 Μοριακή ταυτοποίηση μικροβιακών απομονώσεων που συλλέχθηκαν από καρπούς μήλων στο πλαίσιο υλοποίησης του LIFE-PureAgroH2O – (Εργ Δρ Ε. Μαρκέλλου)

Για να πραγματοποιηθεί μοριακή ταυτοποίηση απομονωμένων μικροβιακών στελεχών που συλλέχθηκαν στα πλαίσια του προγράμματος LIFE-PureAgroH2O, χρησιμοποιήθηκε η τεχνική Αλυσιδωτή Αντίδραση της Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR). Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές που περιγράφονται στον **Πίνακα 4.5.1- 2** και στοχεύουν την Ενδιάμεση Μεταγραφόμενη Περιοχή (Internal Transcribed Spacer, ITS) του ριβοσωμικού DNA. Η απομόνωση του γενωμικού DNA πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το Monarch® Genomic DNA Purification Kit (New England Biolabs, Ipswich, MA, ΗΠΑ) ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή. Σε έναν θερμικό κυκλοποιητή MiniAmp (Applied Biosystems, Λονδίνο, Καναδάς). Κάθε αντίδραση περιείχε 0,2 mM dNTPs, 0,2 μM από κάθε εκκινητή, 1 unit πολυμεράσης DreamTaq (Thermo Fisher Scientific, Λονδίνο, Καναδάς), 1x ρυθμιστικό διάλυμα DreamTaq (Thermo Fisher Scientific, Λονδίνο, Καναδάς), 1 μL του δείγματος DNA και απεσταγμένο νερό μέχρι τελικού όγκου 50 μL. Το πρόγραμμα PCR ενίσχυσης ήταν το παρακάτω: 3 λεπτά στους 95°C, 35 κύκλοι των 30 δευτερολέπτων στους 95°C, 30 δευτερολέπτων στους 65°C και 50 δευτερολέπτων στους 72°C. Στη συνέχεια, τα προϊόντα της ενίσχυσης στάλθηκαν για αλληλούχιση κατά Sanger.

Όνομα εκκινητή	Αλληλουχία 5'-3'
D1/D2	GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG
NL-4	GGTCCGTGTTTCAAGACGG
ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG
ITS2	GCTGCGTTCATCGATGC
ITS3	GCATCGATGAAGAACGCAGC
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC

Πίνακας 4.5.1- 2: Λίστα εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ταυτοποίηση των μικροβιακών απομονώσεων

In vitro καλλιέργειες ενδοφυτικών μικροβιακών απομονώσεων του γένους *Kushneria* και ωμοκυήτων του γένους *Phytophthora* σε διαφορετικά θρεπτικά μέσα

Προκειμένου να επιλεγεί το κατάλληλο θρεπτικό μέσο για την διενέργεια των βιοδοκιμών αντιπαραβολής με στόχο την βελτιστοποίηση της δράσης των βιολογικών παραγόντων, αξιολογήθηκε η ανάπτυξη τόσο των βακτηριακών στελεχών όσο και των ωμοκυήτων *Phytophthora nicotianae* (Pn) και *P. capsici* (Pc), σε διάφορα θρεπτικά μέσα. Αναφορικά, τα θρεπτικά μέσα τα οποία εξετάστηκαν ήταν τα εξής: Corn Meal Agar (CMA), Potato Dextrose Agar (PDA), αραιό Potato Dextrose Agar (PDA-B),

Nutrient Agar (NA), Nutrient Agar + 1% NaCl (NA + 1% NaCl) και Lysogeny Broth (LB).

In vitro βιοδοκιμές αντιπαραβολής μικροβιακών απομονώσεων των γενών *Kushneria*, *Bacillus* και *Metschnikowia* ενάντια σε ωμούκητες του γένους *Phytophthora*

Προκειμένου να μελετηθεί η πιθανή δράση βακτηρίων του γένους *Kushneria* (Συλλογή Καθ. Σαρρή, ΙΤΕ) σε ωμούκητες, σε δοκιμές αντιπαραβολής δοκιμάστηκαν τέσσερα βακτηριακά στελέχη του γένους *Kushneria* ενάντια σε τρία διαφορετικά στελέχη του είδους *Phytophthora nicotianae* και δύο στελέχη του είδους *Phytophthora capsici*. Για τις δοκιμές αντιπαραβολής, επιλέχθηκαν τα θρεπτικά μέσα: Nutrient Agar (NA), NA με 1% NaCl και Lysogeny Broth (LB), όπου στα συγκεκριμένα πραγματοποιήθηκαν παρατηρήσεις ανάπτυξης όλων των βακτηριακών στελεχών καθώς και της πλειοψηφίας των στελεχών ωμουκήτων. Στις δοκιμές αυτές, το κάθε στέλεχος απλωνόταν γραμμικά με λούπα κατά μήκος, στο κέντρο του τρυβλίου. Εκατέρωθεν του βακτηρίου, σε ίσες αποστάσεις (~2,3 cm), τοποθετούνταν μυκηλιακοί δίσκοι του ωμούκητα, διαμέτρου 5mm. Τα τρυβλία επωάστηκαν στους 28°C. Η αξιολόγηση πραγματοποιούνταν συγκρίνοντας την μυκηλιακή ανάπτυξη των εκάστοτε ωμουκήτων στα τρυβλία μάρτυρες και σε αυτά με τα βακτηριακά στελέχη. Το ποσοστό ανάπτυξης υπολογίστηκε σύμφωνα με τον τύπο: $I = (R_1 - R_2) / R_1 * 100$, όπου R1 η ακτίνα (απόσταση σε cm) της αποικίας του παθογόνου από το κέντρο της έως το τοίχωμα των τρυβλίων (μάρτυρες) και R2 η ακτίνα (απόσταση) της αποικίας από το κέντρο της έως την βακτηριακή λωρίδα.

In vitro βιοδοκιμές αντιπαραβολής στελεχών του γένους *Bacillus* ενάντια σε ωμούκητες του γένους *Phytophthora*

Προκειμένου να μελετηθεί η δράση των βακτηριακών στελεχών Cal.l.30 και Cal.r.29 του γένους *Bacillus* ενάντια σε ωμούκητες πραγματοποιήθηκαν δοκιμές αντιπαραβολής με ένα στέλεχος του είδους *Phytophthora nicotianae* σε PDA και NA.

In vitro βιοδοκιμές αντιπαραβολής στελεχών του γένους *Kushneria* ενάντια του μύκητα *Fusarium oxysporum f. sp. radicans lycopersici*

Στην παρούσα υποενότητα εργασίας εξετάστηκε η παρεμποδιστική δράση 18 στελεχών του γένους *Kushneria* και ενός στελέχους του γένους *Bacillus* *in vitro* σε δοκιμές αντιπαραβολής έναντι του φυτοπαθογόνου μύκητα *Fusarium oxysporum f. sp. radicans lycopersici* (FORL).

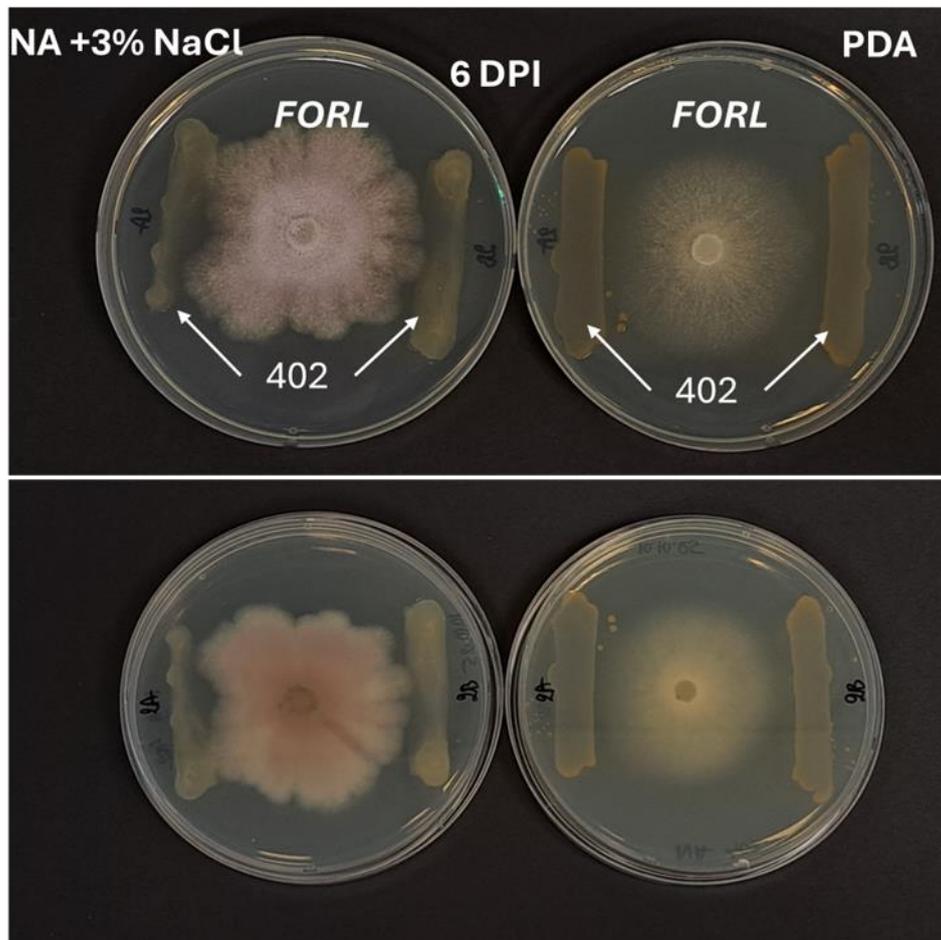
Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκαν *in vitro* δοκιμές αντιπαραβολής σε δύο είδη θρεπτικών υλικών: Α) Nutrient Agar (NA) εμπλουτισμένο με 3% NaCl (w/v), που ευνοεί την ανάπτυξη των βακτηριακών στελεχών του γένους *Kushneria* και Β) Potato Dextrose Agar (PDA), θρεπτικό υλικό ανάπτυξης μυκήτων (**Εικόνα 4.5.1.-6**).

Τα βακτήρια και ο μύκητας διατηρούνταν σε διάλυμα γλυκερόλης 25% v/v στους -80°C. Για την ενεργοποίηση των βακτηριακών στελεχών πριν από τις βιοδοκιμές, τρυβλία Petri που περιείχαν στερεό θρεπτικό υλικό NA με 3% NaCl (w/v) εμβολιάζονταν με βακτηριακά στελέχη (μέθοδος streak plate) και επωάζονταν στους 27 °C για 24-72

ώρες. Για την παρασκευή υγρής προκαλλιέργειας, 5 ml Nutrient Broth (NB) με 3% NaCl εμβολιάζονταν με μονή αποικία του βακτηρίου και επωάζονταν υπό ανάδευση στους 27°C για 24–48 ώρες. Στη συνέχεια, τα βακτηριακά κύτταρα συλλέγονταν με φυγοκέντρηση, επαναιωρούνταν σε αποστειρωμένο νερό και η τελική συγκέντρωση ρυθιζόνταν σε 1×10^7 cfu/ml με χρήση φασματοφωτόμετρου ($OD_{600}=0.9$) και σύγκριση με κατάλληλη καμπύλη αναφοράς.

Ο μύκητας FORL, πριν από τη χρήση του στα πειράματα, μεταφέρθηκε υπό ασηπτικές συνθήκες σε τριβλία με Potato Dextrose Agar (PDA) και επώαστηκε στους 27°C για 7 ημέρες.

Τα τριβλία με τα δύο θρεπτικά υλικά εμβολιάζονταν στο κέντρο με κυκλικό δίσκο διαμέτρου 5mm από αποικία του μύκητα 7 ημερών. Σε απόσταση 3cm από το κέντρο, εκατέρωθεν του δίσκου, σχηματιζόταν γραμμή με τη μέθοδο streak plate χρησιμοποιώντας 20μl του βακτηριακού αιωρήματος (**Εικόνα 4.5.1.-6**). Τα τριβλία επωάζονταν στους 27°C για 10 ημέρες. Σε κάθε υλικό αξιολογήθηκε η επίδραση των βακτηριακών στελεχών στον ρυθμό της μυκηλιακής ανάπτυξης (mm) στις 3, 6 και 10 μέρες μετά τον εμβολιασμό των τριβλίων.



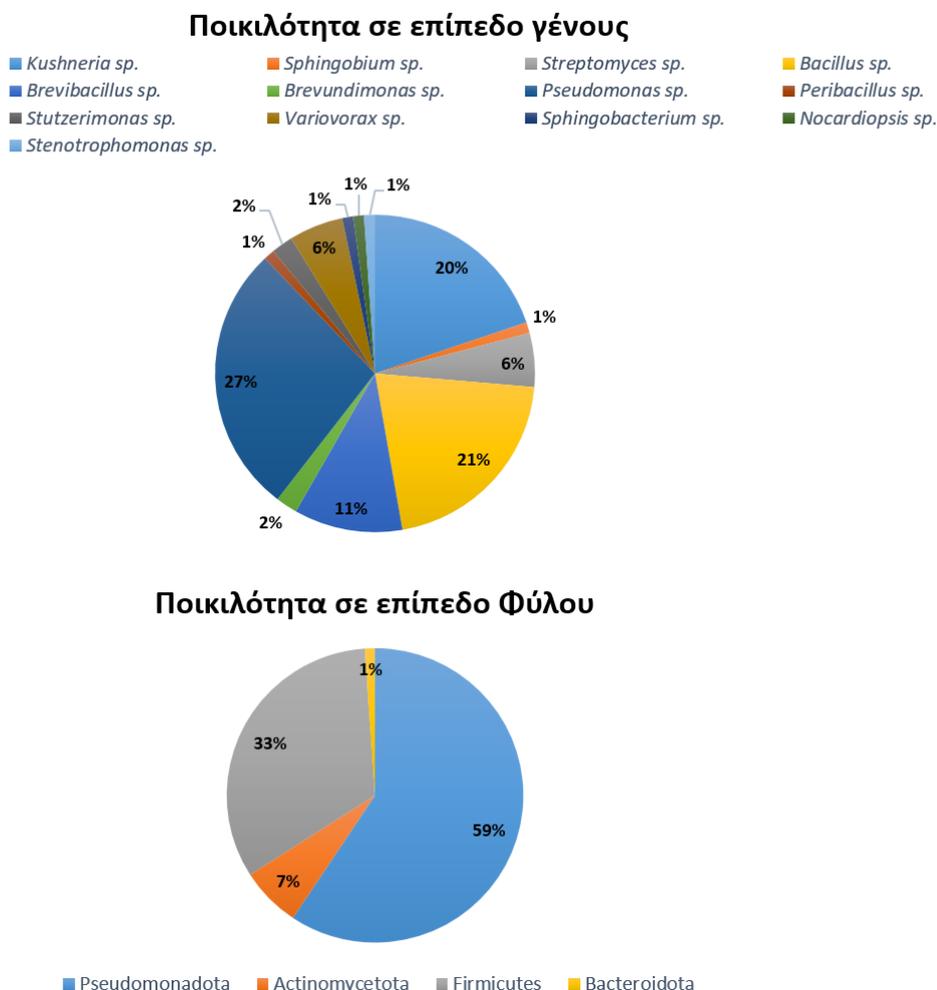
Εικόνα 4.5.1- 6: Δοκιμή *in vitro* αντιπαραβολής βακτηριακών στελεχών με τον μύκητα *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicle-lycopersici* (FORL). Ο μύκητας τοποθετείται στο

κέντρο του τριβλίου (5 mm δίσκος) και τα βακτηριακά αιωρήματα εμβολιάζονται εκατέρωθεν σε απόσταση 3 cm σε Nutrient Agar (NA) και Potato Dextrose Agar (PDA).

2.2 Αποτελέσματα

2.2.1 *In vitro* βιοδοκιμές βακτηριακών απομονώσεων ενάντια των φυτοπαθογόνων βακτηρίων *Clavibacter michiganensis*, *Paracidovorax citrulli*, *Ralstonia solanacearum* και *Xanthomonas campestris* παθότυπος *campestris* (Εργ. Καθ. Π. Σαρρή)

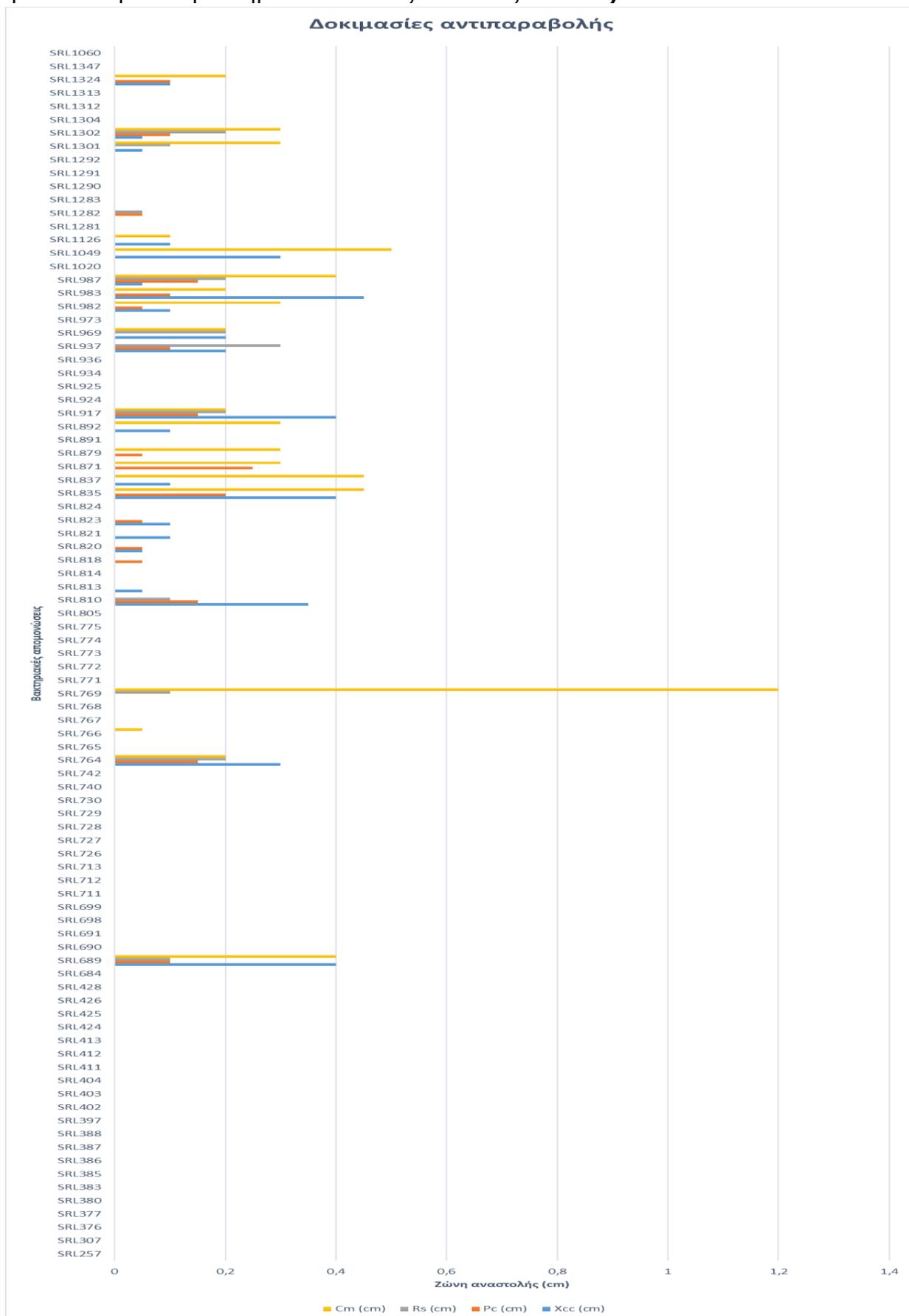
Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν ενδοφυτικοί μικροοργανισμοί εμπλουτισμένοι σε επίπεδο γένους και φύλου και η ποικιλότητα στα δύο αυτά ταξινομικά μεγέθη απεικονίζεται στην **Εικόνα 4.5.1-7**.



Εικόνα 4.5.1-7. Γραφικές αναπαραστάσεις της ποικιλότητας των ενδοφυτικών βακτηρίων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη, σε επίπεδο Γένους και Φύλου.

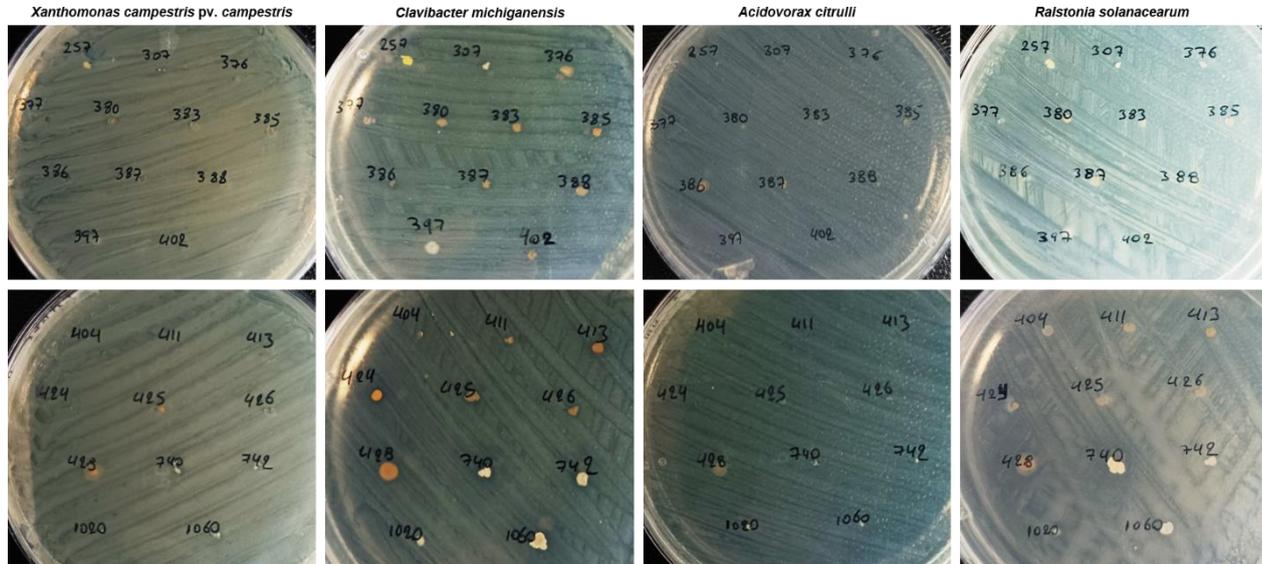
Κατά τις δοκιμασίες αντιπαραβολής, παρατηρήθηκε για ορισμένες βακτηριακές απομονώσεις αναστολή στην ανάπτυξη και των τεσσάρων υπό μελέτη φυτοπαθογόνων, όπως στην περίπτωση των SRL1302, SRL987, SRL917, SRL764 και SRL689 (**Εικόνα 4.5.1-8**). Ενδεικτικές φωτογραφίες από τις αναστολές στην ανάπτυξη των

φυτοπαθογόνων βακτηρίων απεικονίζονται στις εικόνες 4.5.1-9 και 4.5.1-10.

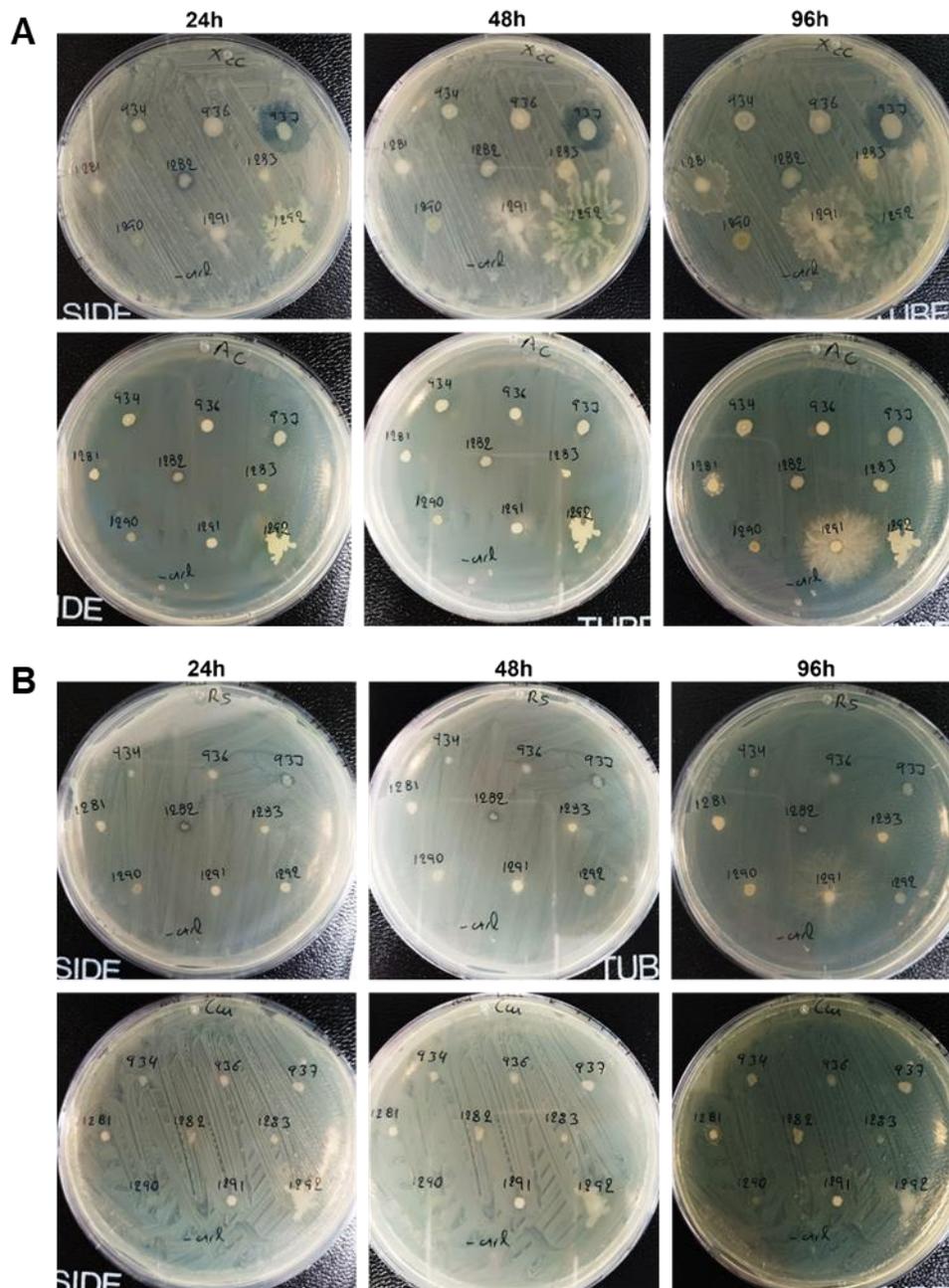


Εικόνα 4.5.1-8. Γραφική αναπαράσταση των αναστολών της ανάπτυξης των φυτοπαθογόνων βακτηρίων

Clavibacter michiganensis (Cm), *Ralstonia solanacearum* (Rs), *Paracidovorax citrulli* (Pc) και *Xanthomonas campestris* παθότυπος *campestris* (Xcc) σε εκατοστά (cm) από τα συνολικά διάφορα ενδοφυτικά βακτήρια που εξετάστηκαν στην παρούσα μελέτη.



Εικόνα 4.5.1-9. Ενδεικτικές δοκιμασίες αντιπαραβολής (*in vitro*) μικροβιακών απομονώσεων των γενών *Kushneria* spp. και *Streptomyces* spp. έναντι των φυτοπαθογόνων βακτηρίων *Xanthomonas campestris* παθότυπος *campestris*, *Clavibacter michiganensis*, *Paracidovorax citrulli* (*Acidovorax citrulli*), και *Ralstonia solanacearum*.

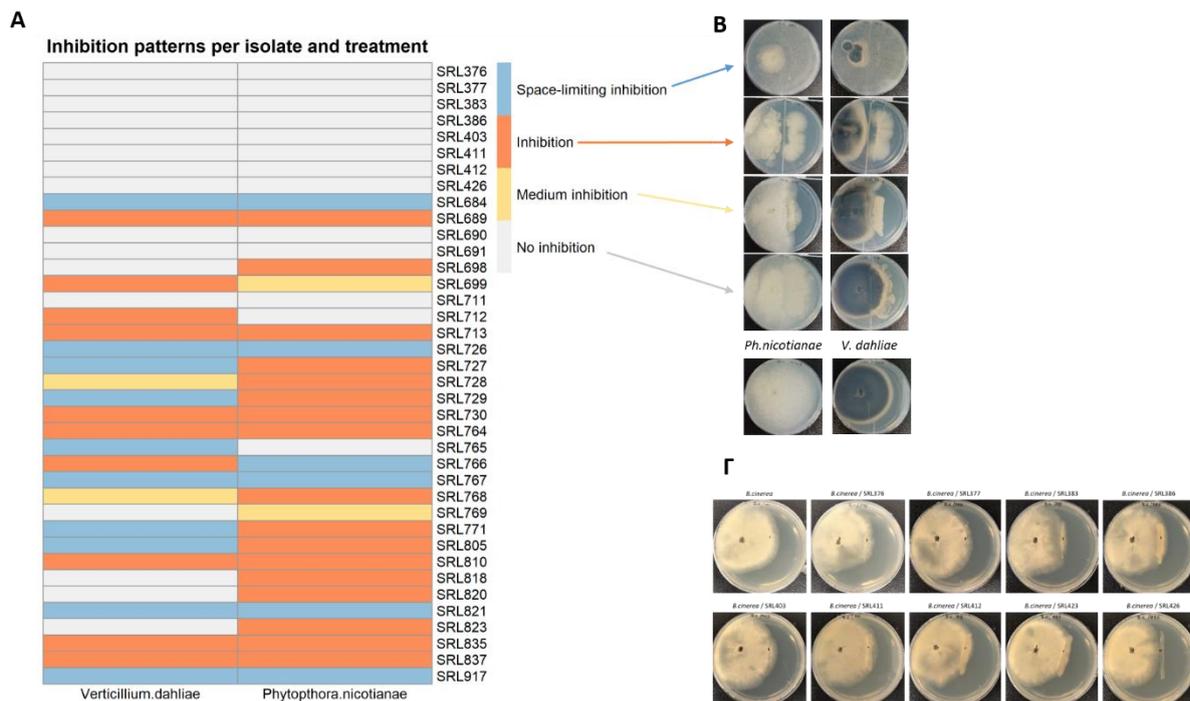


Εικόνα 4.5.1-10. Ενδεικτικές δοκιμασίες αντιπαραβολής μικροβιακών απομονώσεων των γενών *Bacillus* spp. και *Pseudomonas* spp. έναντι των φυτοπαθογόνων βακτηρίων (A) *Xanthomonas campestris* παθότυπου *campestris* (πρώτη σειρά), *Paracitovorax citrulli* (δεύτερη σειρά), (B) *Ralstonia solanacearum* (πρώτη σειρά) και *Clavibacter michiganensis* (δεύτερη σειρά) ύστερα από 24, 48 και 96 ώρες ανάπτυξης.

2.2.2 *In vitro* βιοδοκιμές βακτηριακών απομονώσεων ενάντια των φυτοπαθογόνων μυκήτων και ωομυκήτων *Verticillium dahliae*, *Botrytis cinerea* και *Phytophthora nicotianae* (Εργ. Καθ. Π. Σαρρή)

Στις υπό μελέτη δοκιμασίες αντιπαραβολής των μυκήτων/ωομυκήτων με τις ενδοφυτικές απομονώσεις, σε ορισμένες περιπτώσεις, παρατηρήθηκε ισχυρή ή μέτρια αναστολή της ανάπτυξης των φυτοπαθογόνων *Verticillium dahliae* και *Phytophthora nicotianae* (Εικόνες 4.5.1-11A και 4.5.1-11B αντίστοιχα), όχι όμως στην περίπτωση του *Botrytis cinerea* (Εικόνα 4.5.1-11Γ) με τις απομονώσεις που εξετάστηκαν.

Συγκεκριμένα, υπήρχαν βακτηριακές απομονώσεις που ανέστειλαν την ανάπτυξη των φυτοπαθογόνων μέσω ανταγωνισμού για θρεπτικά και χώρο (space-limiting inhibition), ενώ άλλα μέσω αντιβίωσης. Επιπλέον, ορισμένες βακτηριακές απομονώσεις εμφάνισαν αναστολή στην ανάπτυξη και των δύο φυτοπαθογόνων *Verticillium dahliae* και *Phytophthora nicotianae*, ενώ υπήρχαν και βακτηριακές απομονώσεις που δεν ανέστειλαν την ανάπτυξη κανενός υπό μελέτη φυτοπαθογόνου (Εικόνα 4.5.1-10).

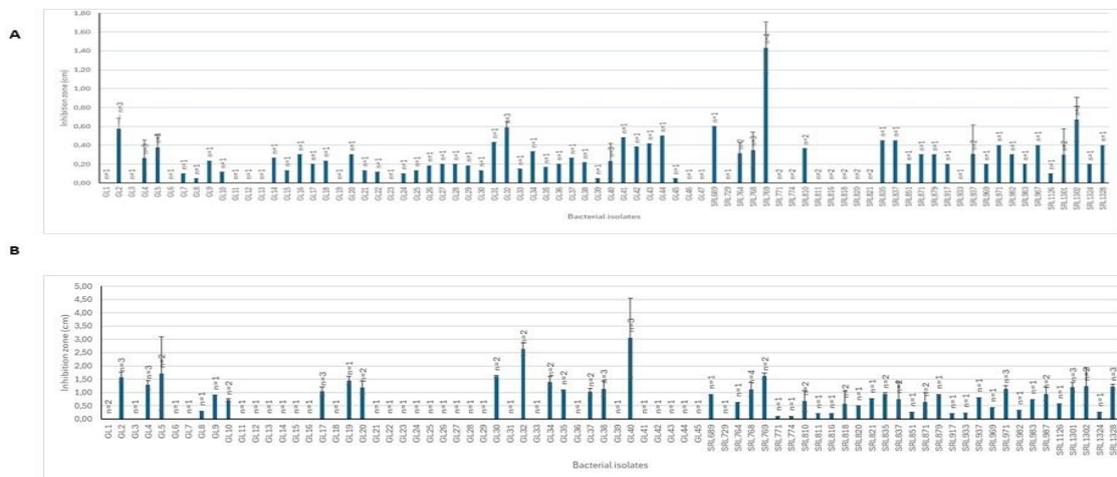


Εικόνα 4.5.1-11. Α. Γραφική απεικόνιση των *in vitro* δοκιμασιών αντιπαραβολής διαφόρων βιολογικών απομονώσεων ενάντια στο μύκητα *Verticillium dahliae* και στον ωομύκητα *Phytophthora nicotianae*. Με μπλε χρώμα απεικονίζονται οι αναστολές της ανάπτυξης των φυτοπαθογόνων εξαιτίας χωροκατακτητικών βιολογικών απομονώσεων, ενώ με πορτοκαλί ή μπεζ χρώμα σημειώνονται οι αναστολές εξαιτίας της παραγωγής κάποιας ουσίας από τη βιολογική απομόνωση (αντιβίωση). Με γκρι χρώμα παρουσιάζονται όσες απομονώσεις εξετάστηκαν και δεν παρουσίασαν κάποια *in vitro* αναστολή στην ανάπτυξη των φυτοπαθογόνων. **Β.** Ενδεικτικές εικόνες της αναστολής ή μη της ανάπτυξης των φυτοπαθογόνων που παρουσιάζονται στο Α. **Γ.** Εικόνες από την ανάπτυξη του *Botrytis cinerea*. Οι διάφορες βιολογικές απομονώσεις του γένους *Kushneria* spp. που εξετάστηκαν σε δοκιμασίες αντιπαραβολής, δεν επηρέασαν την ανάπτυξη του φυτοπαθογόνου μύκητα.

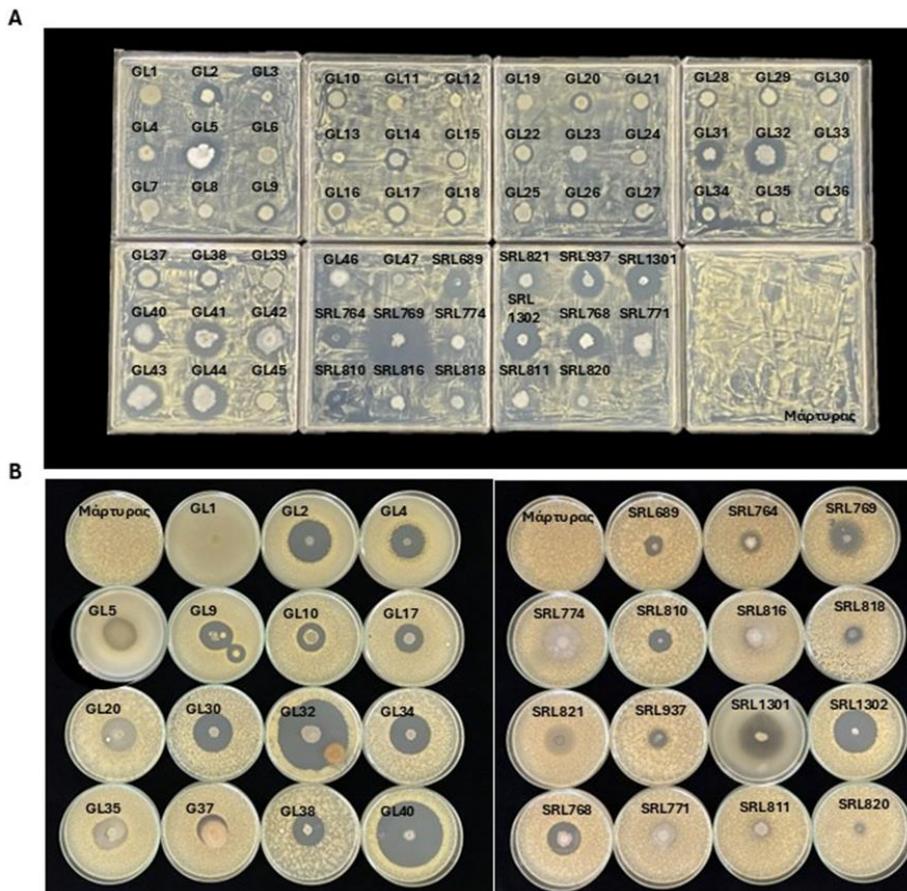
2.2.3 *In vitro* βιοδοκιμές ενδοφυτικών μικροβιακών απομονώσεων έναντι του φυτοπαθογόνου βακτηρίου *Clavibacter michiganensis* (Εργ. κ. Γκούμα)

Προκειμένου να προσδιοριστούν οι βακτηριακές απομονώσεις με ανταγωνιστική δράση έναντι του φυτοπαθογόνου *C. michiganensis* εξετάστηκαν *in vitro* συνολικά 78

βακτηριακές απομονώσεις. Στη μέθοδο του βαμβakoφόρου στυλεού τα βακτήρια συγκαλλιεργήθηκαν με το φυτοπαθογόνο, ενώ στη μέθοδο διπλής επίστρωσης οι βακτηριακές απομονώσεις καλλιεργήθηκαν για 48 ώρες και υποβλήθηκαν σε χλωροφόρμιο για τη λύση των κυττάρων και στη συνέχεια σε επικάλυψη του φυτοπαθογόνου. Από αυτόν τον έλεγχο (**Εικόνα 4.5.1-12**) παρατηρήθηκε ότι ορισμένες βακτηριακές απομονώσεις δεν είχαν καμία επίδραση στην ανάπτυξη του φυτοπαθογόνου και στις δύο μεθόδους που αναπτύχθηκαν (GL6, GL11-13, GL23), άλλες παρουσίασαν επίδραση μόνο σε μία από τις δύο μεθόδους (GL11-16, GL 22-30, GL41-45, SRL811, 816, 818, 820, 821), ενώ άλλες είχαν ισχυρή επίδραση και στις δύο μεθόδους που εξετάστηκαν (GL2, 4, 5, 32, 40, SRL768, 769, 1302). Η επίδραση των τελευταίων στην αναστολή του *C. michiganensis* παρουσιάζεται στην **Εικόνα 4.5.1-13**.



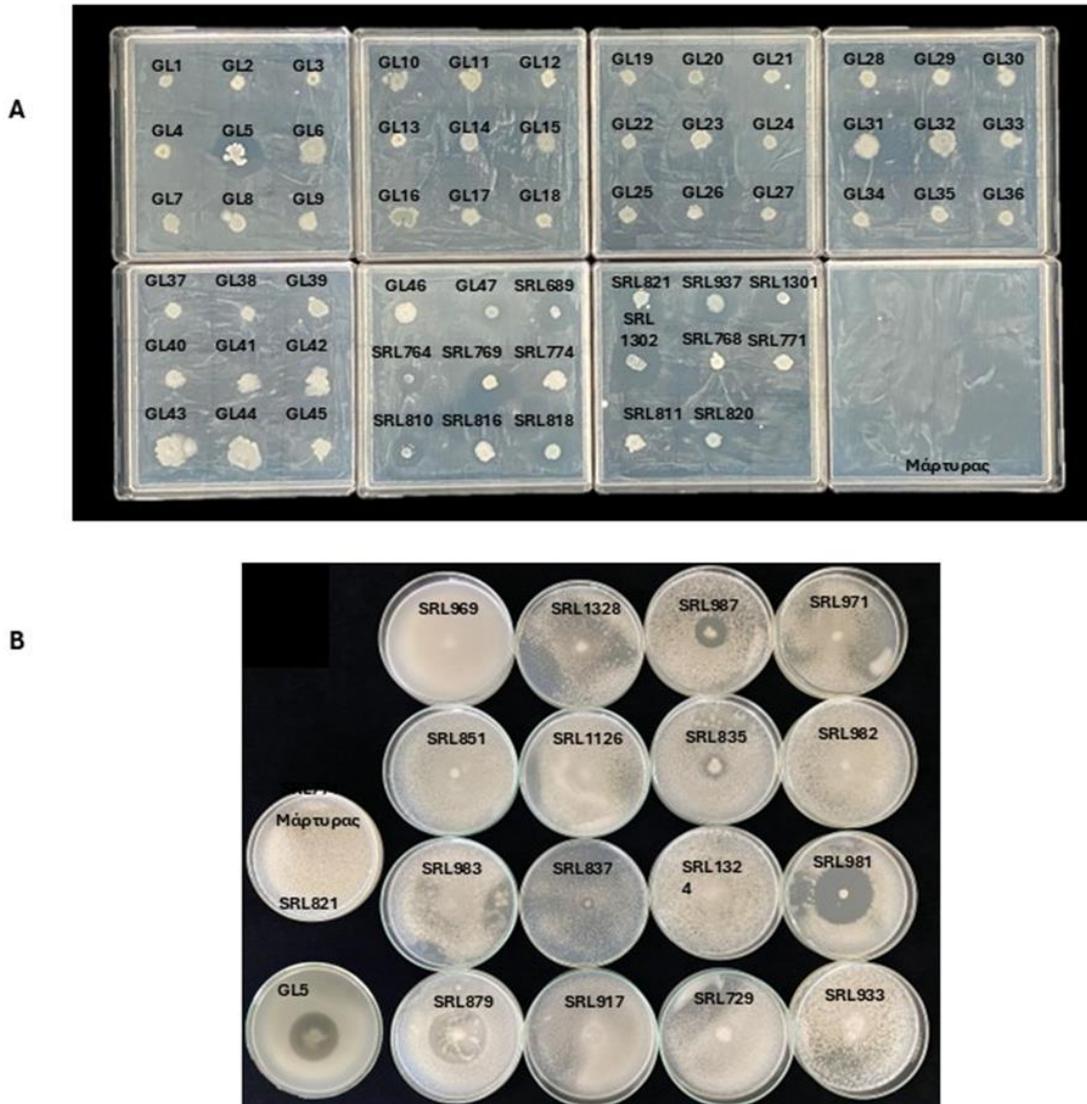
Εικόνα 4.5.1-12. Μετρήσεις των ζωνών αναστολής της ανάπτυξης όταν οι βακτηριακές απομονώσεις συγκαλλιεργήθηκαν με το φυτοπαθογόνο *C. michiganensis*. Για τον έλεγχο των 78 βακτηριακών απομονώσεων έναντι του *C. michiganensis*. Εφαρμόστηκαν δύο δοκιμασίες αναστολής της ανάπτυξης *in vitro* με τη μέθοδο του βαμβakoφόρου στυλεού (**A**) ή με τη μέθοδο της διπλής επίστρωσης (**B**). Μετά την περίοδο επώασης μετρήθηκαν οι ζώνες αναστολής. Σε κάθε δοκιμή παρουσιάζονται ο μέσος όρος, η τυπική απόκλιση και ο αριθμός των επαναλήψεων (n).



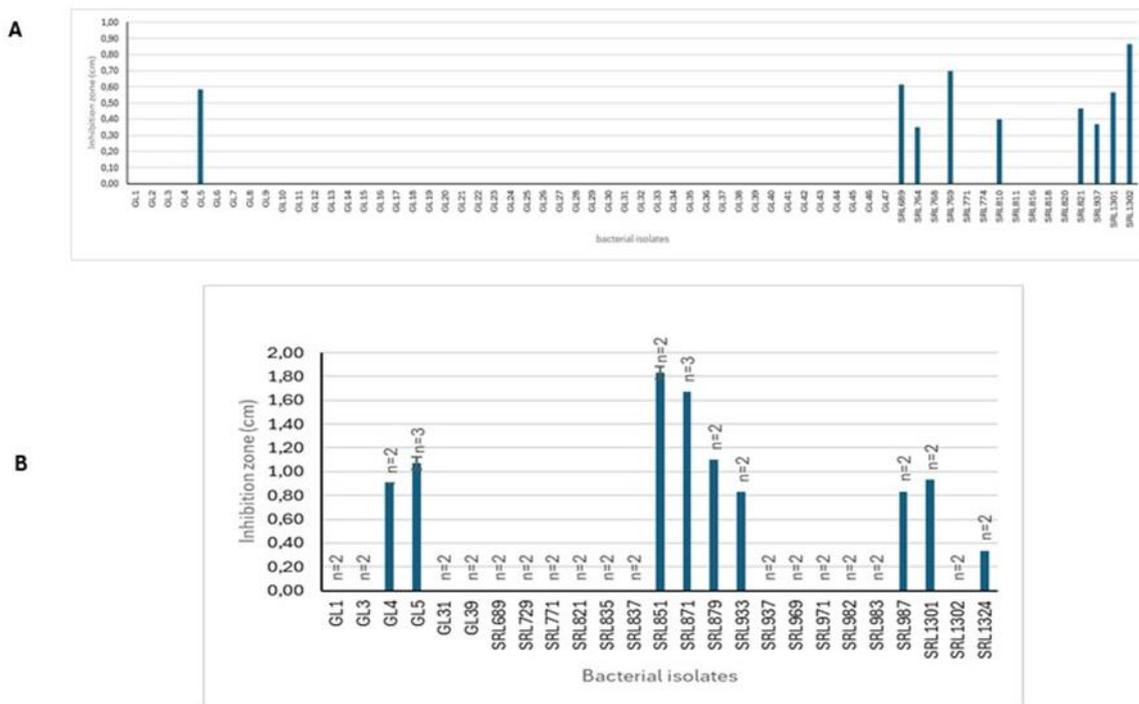
Εικόνα 4.5.1-13. Ενδεικτικές φωτογραφίες από τις μελέτες παρεμπόδισης της ανάπτυξης του φυτοπαθογόνου βακτηρίου *C. michiganensis* από τα ανταγωνιστικά βακτήρια . **A.** Ζώνες παρεμπόδισης μετά από ταυτόχρονη ανάπτυξη των απομονωμένων βακτηρίων και του φυτοπαθογόνου (μέθοδος βαμβακοφόρου στυλεού). **B.** Ζώνες παρεμπόδισης μετά από ανάπτυξη των απομονωμένων βακτηρίων για δύο ημέρες και μετέπειτα προσθήκη του φυτοπαθογόνου (μέθοδος διπλής επίστρωσης).

2.2.4 *In vitro* βιοδοκιμές ενδοφυτικών μικροβιακών απομονώσεων έναντι του φυτοπαθογόνου βακτηρίου *Acidovorax citrulli* (Εργ. κ. Γκούμα)

Προκειμένου να προσδιοριστούν οι βακτηριακές απομονώσεις με ανταγωνιστική δράση έναντι του φυτοπαθογόνου *A. citrulli* το οποίο προκαλεί την βακτηριακή κηλίδωση της καρπουζιάς, εξετάστηκαν *in vitro* συνολικά 78 βακτηριακές απομονώσεις. Στη μέθοδο του βαμβακοφόρου στυλεού τα βακτήρια συγκαλλιεργήθηκαν με το φυτοπαθογόνο, ενώ στη μέθοδο διπλής στρώσης οι βακτηριακές απομονώσεις καλλιεργήθηκαν για 48 ώρες και υποβλήθηκαν σε χλωροφόρμιο για τη λύση των κυττάρων και στη συνέχεια σε επικάλυψη του φυτοπαθογόνου. Από αυτόν τον έλεγχο (**Εικόνες 4.5.1-14 και 4.5.1-15**) παρατηρήθηκε ότι οι περισσότερες βακτηριακές απομονώσεις δεν είχαν καμία επίδραση στην ανάπτυξη του φυτοπαθογόνου. Λίγες είχαν μέτρια επίδραση (GL5, SRL987 & SRL879) ενώ η SRL981 παρουσίασε την πιο ισχυρή παρεμπόδιση μόνο με τη χρήση της μεθόδου της διπλής στρώσης.



Εικόνα 4.5.1-14. Ενδεικτικές φωτογραφίες από τις μελέτες παρεμπόδισης των απομονωμένων βακτηριών έναντι του φυτοπαθογόνου βακτηρίου *A. citrulli*. **A.** Ζώνες παρεμπόδισης μετά από ταυτόχρονη ανάπτυξη των απομονωμένων βακτηρίων και του φυτοπαθογόνου (μέθοδος βαμβακοφόρου συλίου), ενώ στη **B.** Ζώνες παρεμπόδισης μετά από ανάπτυξη των απομονωμένων βακτηρίων για δύο ημέρες και μετέπειτα προσθήκη του φυτοπαθογόνου (μέθοδος διπλής επίστρωσης).

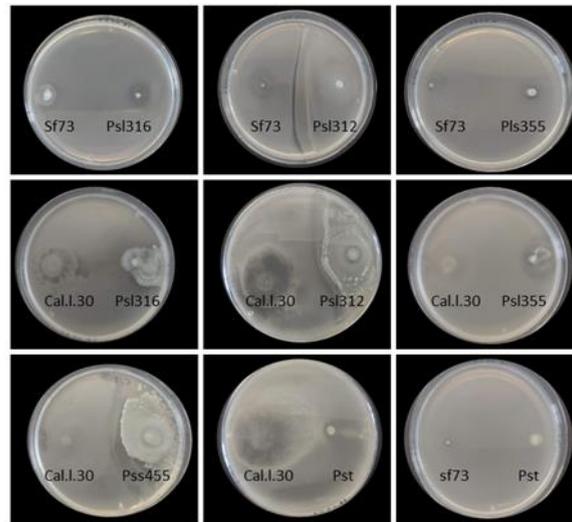


Εικόνα 4.5.1-15. Μετρήσεις των ζωνών αναστολής όταν οι βακτηριακές απομονώσεις συγκαλλιεργήθηκαν με το φυτοπαθογόνο *A. citrulli*. Για τον έλεγχο των 78 βακτηριακών απομονώσεων έναντι του *A. citrulli*, εφαρμόστηκαν δύο δοκιμασίες αναστολής της ανάπτυξης *in vitro* με τη μέθοδο του βαμβακοφόρου στυλεού (**A**) ή με τη μέθοδο της διπλής επίστρωσης (**B**). Μετά την περίοδο επώασης μετρήθηκαν οι ζώνες αναστολής. Σε κάθε δοκιμή παρουσιάζονται ο μέσος όρος, η τυπική απόκλιση και ο αριθμός των επαναλήψεων (n).

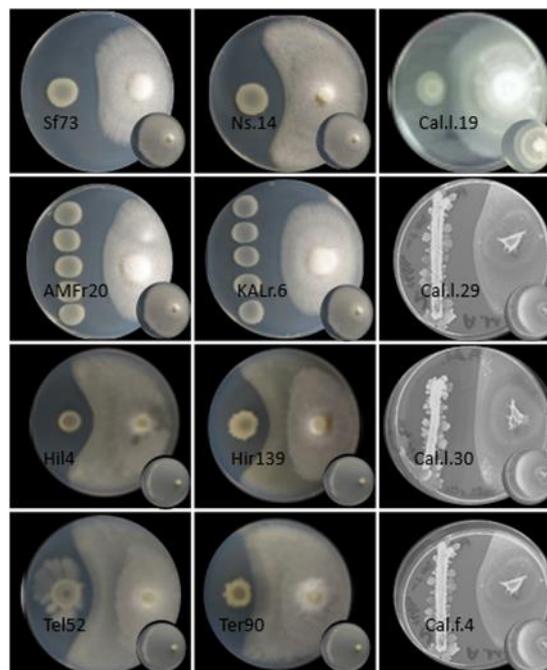
2.2.5 *In vitro* βιοδοκιμές γενών *Bacillus* ενάντια σε φυτοπαθογόνα βακτήρια και μύκητες (Εργ. Δρ. Α. Βενιεράκη)

Η παρούσα έρευνα ανέδειξε την αποτελεσματικότητα επιλεγμένων ενδοφυτικών στελεχών *Bacillus* ως βιολογικών παραγόντων με σημαντικό δυναμικό εφαρμογής στη φυτοπροστασία, τόσο μέσω άμεσων μηχανισμών παρεμπόδισης παθογόνων οργανισμών όσο και μέσω ενεργοποίησης αμυντικών αποκρίσεων των φυτών. Οι *in vitro* δοκιμές αντιπαραβολής αποτέλεσαν κρίσιμο πρώτο στάδιο για την επιλογή στελεχών, επιτρέποντας την αξιολόγηση της ανασταλτικής δράσης τους έναντι σημαντικών φυτοπαθογόνων, όπως τα βακτήρια *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* και οι μύκητες *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum* (Forc) και *Verticillium dahliae*. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η πλειονότητα των ενδοφυτικών απομονώσεων παρουσίασε έντονη αντιμικροβιακή δράση, αποτυπωμένη είτε με τη μορφή διαφανούς γραμμής οριοθέτησης (demarcation line) στα βακτηριακά ζεύγη, είτε με σαφή αναχαίτηση του παθογόνου, ιδίως στην περίπτωση του *P. syringae* pv. *Tomato*. Η παρουσία DL στα τριβλία υποδηλώνει πιθανή παραγωγή αντιβακτηριακών μεταβολιτών που προκαλούν λύση των κυττάρων του παθογόνου κοντά στη γραμμή

επαφής. Αντίστοιχα, οι αντιπαραβολές έναντι μυκήτων έδειξαν έντονη παρεμπόδιση της μυκηλιακής ανάπτυξης, με τα στελέχη *B. halotolerans*, *B. velezensis* και *B. subtilis* να υπερέχουν, επιβεβαιώνοντας την ικανότητά τους να παράγουν αντιμυκητιακές ενώσεις όπως λυσοζύμες, ισχυρούς λιποπεπτιδικούς μεταβολίτες ή άλλα αντιβιοτικά σήματα που αναστέλλουν την ανάπτυξη νεκροτροφικών παθογόνων.



Εικόνα 4.5.1-16. Δοκιμασία αντιπαραβολής βακτηριακών απομονώσεων Sf.73 *Bacillus safensis* και Cal.l.30 *B. halotolerans*, έναντι των φυτοπαθογόνων βακτηρίων *Pseudomonas syringae* pv *lachrymans* Psl 312, Psl 316, Psl 355, *P. savastanoi* pv *savastanoi* Pss 455, *P. syringae* pv *tomato* Pst DC3000, μετά από 24 ώρες επώασης. Σε κάποιες από τις αντιπαραβολές είναι εμφανής η παρουσία μιας διαφανούς γραμμής οριοθέτησης (demarcation line) στο σημείο συνάντησης των κινούμενων μετώπων ανάπτυξης μεταξύ των δυο αντιπαραβαλλόμενων απομονώσεων. Demarcation line: σαφώς οριοθετημένη ζώνη αναστολής ή μεταβολής της ανάπτυξης μεταξύ του μικροοργανισμού-δοκιμαζόμενου στελέχους και του παθογόνου σε τρυβλίο καλλιέργειας, η οποία υποδηλώνει ανταγωνιστική αλληλεπίδραση ή/και παραγωγή ανασταλτικών μεταβολιτών.



Εικόνα 4.5.1-17. Δοκιμασία αντιπαραβολής βακτηριακών απομονώσεων *Bacillus safensis* Sf.73, *B.*

halotolerans Ns.14, *B. subtilis* Cal.r.19, *B. velezensis* AMFr20, *B. velezensis* KALr6, *B. velezensis* Cal.r.29, *B. halotolerans* Hil4, *B. velezensis* Hir139, *B. halotolerans* Cal.l.30, *B. velezensis* Tel52, *B. subtilis* Ter90, *B. halotolerans* Cal.f.4 έναντι του φυτοπαθογόνου μύκητα *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-cucumerinum* (*Forc*) μετά από 7 ημέρες επώασης (μάρτυρας *Forc* σε ανάπτυξη σε παράλληλο χρονικό διάστημα με τη δόκιμη αντιπαραβολής: τρυβλίο σε μικρογραφία κάτω δεξιά).

2.2.6 Αποτελέσματα αξιολόγησης βακτηριακών απομονώσεων έναντι των παθογόνων *Verticillium dahliae*, *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-cucumerinum* (απομόνωση AFu68A) και *Botrytis cinerea* (απομόνωση B.14.9) (Εργ. Καθ. Εμμ. Μαρκάκη)

Αποτελέσματα αξιολόγησης της αντιμικροβιακής δράσης των 31 βακτηριακών στελεχών έναντι του παθογόνου *Verticillium dahliae* (απομόνωση 999-1)

Τα αποτελέσματα της αξιολόγησης των 31 βακτηριακών στελεχών με τυπικές δοκιμές αντιπαραβολής έναντι του μύκητα *Verticillium dahliae* (απομόνωση 999-1) καταδεικνύουν ότι 27 βακτηριακά στελέχη προκάλεσαν στατιστική σημαντική μείωση του ρυθμού ανάπτυξης του μύκητα συγκριτικά με το μάρτυρα. Σύμφωνα με τις **Εικόνες 4.5.1-18 και 4.5.1-19**, τα στελέχη αυτά είναι τα SRL971, SRL1328, SRL871, SRL835, SRL987, SRL933, SRL729, SRL879, SRL837, SRL764, SRL851, SRL1126, SRL816, SRL917, SRL982, SRL983, SRL811, SRL969, SRL1324, SRL771, SRL821, SRL1302, SRL810, SRL689, SRL1301, SRL818 και SRL774 (**Εικόνα 4.5.1-20**). Όσον αφορά στο πάχος των υφών, όπως απεικονίζεται στους **Πίνακες 4.5.1-3 και 4.5.1-5**, 15 βακτηριακά στελέχη επέφεραν στατιστικά σημαντική μείωση σε σύγκριση με τον μάρτυρα. Τα στελέχη αυτά είναι τα SRL729, SRL821, SRL835, SRL879, SRL933, SRL969, SRL971, SRL982, SRL983, SRL987, SRL1126, SRL1324, SRL1328, SRL811 και SRL818. Αναφορικά με το εμβαδόν των μικροσκληρωτίων, 8 βακτηριακά στελέχη επέφεραν στατιστικά σημαντική μείωση σε σχέση με το μάρτυρα. Τα στελέχη είναι τα SRL729, SRL837, SRL879, SRL971, SRL982, SRL983, SRL987 και SRL1328. Τέλος, 6 βακτηριακά στελέχη μείωσαν στατιστικά σημαντικά τον αριθμό παραγόμενων κονιδίων του μύκητα *V. dahliae*. Τα στελέχη αυτά ήταν τα SRL917, SRL969, SRL971, SRL1126, SRL1324 και SRL1328 (**Πίνακες 4.5.1-3 και 4.5.1-4**). Από την αξιολόγηση του ρυθμού της μυκηλιακής ανάπτυξης προκύπτει η υψηλότερη μείωση προήλθε από τα βακτηριακά στελέχη SRL971, SRL1328 και SRL871 (**Πίνακες 4.5.1-3 και 4.5.1-4**).

Πίνακας 4.5.1-3. Μέσοι όροι και τυπικά σφάλματα (\pm) των μετρήσεων των μυκητολογικών παραμέτρων σε τυπικές δοκιμές αντιπαραβολής που προέκυψαν από την αξιολόγηση της αντιμικροβιακής δράσης των

17 βακτηριακών στελεχών έναντι του μύκητα *Verticillium dahliae*.

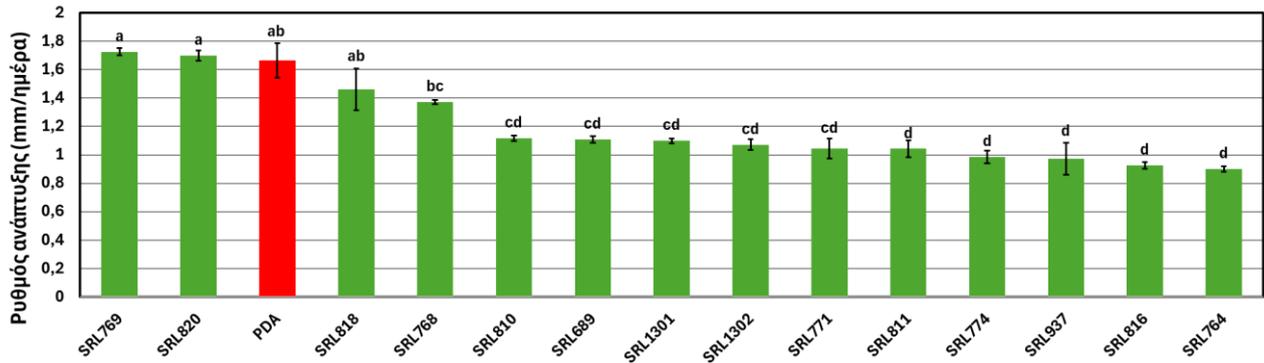
Τύπος βιοδοκιμών	Επέμβαση	Μυκητολογικές παράμετροι			
		Ρυθμός ανάπτυξης (mm/ημέρα)	Αριθμός κονιδίων ($\times 10^5$)/ δισκίο διαμέτρου 5 mm	Πάχος υφών (μm)	Εμβαδόν μικροσκληρωτίων (cm^2)
Δοκιμές αντιπαραβολής (Confrontation test)	V.d.+ PDA	1.8 \pm 0.1 a	42.1 \pm 4.0 ab	3.6 \pm 0.1 a	5.4 \pm 1.5 a
	V.d.+ SRL729	1.0 \pm 0.0 bc	21.9 \pm 6.9 abcd	2.4 \pm 0.1 defg	0.9 \pm 4.4 b
	V.d.+ SRL821	1.3 \pm 0.1 b	46.9 \pm 6.4 a	2.7 \pm 0.1 def	2.3 \pm 1.1 ab
	V.d.+ SRL835	0.9 \pm 0.0 c	35.9 \pm 4.1 abc	2.3 \pm 0.1 efg	2.8 \pm 0.5 ab
	V.d.+ SRL837	1.0 \pm 0.1 bc	18.9 \pm 3.0 bcd	3.5 \pm 0.1 abc	1.5 \pm 0.8 b
	V.d.+ SRL851	1.1 \pm 0.0 bc	26.2 \pm 4.4 abcd	3.5 \pm 0.1 ab	2.1 \pm 0.1 ab
	V.d.+ SRL871	0.9 \pm 0.0 c	24.1 \pm 8.8 abcd	3.6 \pm 0.1 a	2.6 \pm 0.5 ab
	V.d.+ SRL879	1.0 \pm 0.0 bc	18.5 \pm 2.7 bcd	3.0 \pm 0.1 bcde	1.4 \pm 0.8 b
	V.d.+ SRL917	1.2 \pm 0.1 bc	7.2 \pm 2.2 d	3.0 \pm 0.1 abcd	2.2 \pm 0.7 ab
	V.d.+ SRL933	1.0 \pm 0.0 bc	27.2 \pm 9.0 abcd	2.3 \pm 0.1 efg	1.9 \pm 0.4 ab
	V.d.+ SRL969	1.2 \pm 0.1 b	7.4 \pm 0.8 d	2.8 \pm 0.2 cdef	2.2 \pm 0.5 ab
	V.d.+ SRL971	0.1 \pm 0.0 d	5.9 \pm 2.0 d	2.8 \pm 0.1 cdef	0.0 \pm 0.0 b
	V.d.+SRL982	1.2 \pm 0.1bc	23.4 \pm 3.0 abcd	2.7 \pm 0.1 def	1.1 \pm 0.3 b
	V.d.+SRL983	1.2 \pm 0.1 bc	25.3 \pm 5.4 abcd	2.8 \pm 0.1 def	0.8 \pm 0.3 b
	V.d.+SRL987	0.9 \pm 0.0 c	17.2 \pm 2.9 bcd	2.7 \pm 0.1 def	1.8 \pm 0.6 b
	V.d.+SRL1126	1.1 \pm 0.0 bc	12.0 \pm 2.9 cd	2.4 \pm 0.1 defg	3.5 \pm 0.6 ab
	V.d.+SRL1324	1.3 \pm 0.0 b	14.2 \pm 2.6 cd	2.3 \pm 0.1 fg	2.7 \pm 1.1 ab
V.d.+SRL1328	0.2 \pm 0.1 d	16.2 \pm 7.4 cd	1.8 \pm 0.1 g	0.4 \pm 0.3 b	

* Εντός των στηλών, οι τιμές οι οποίες ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σύμφωνα με τη δοκιμασία Tukey HSD με $P \leq 0.05$.

Πίνακας 4.5.1-4. Μέσοι όροι και τυπικά σφάλματα (\pm) των μετρήσεων των μυκητολογικών παραμέτρων σε τυπικές δοκιμές αντιπαραβολής που προέκυψαν από την αξιολόγηση της αντιμικροβιακής δράσης των 14 βακτηριακών στελεχών έναντι του μύκητα *Verticillium dahliae*.

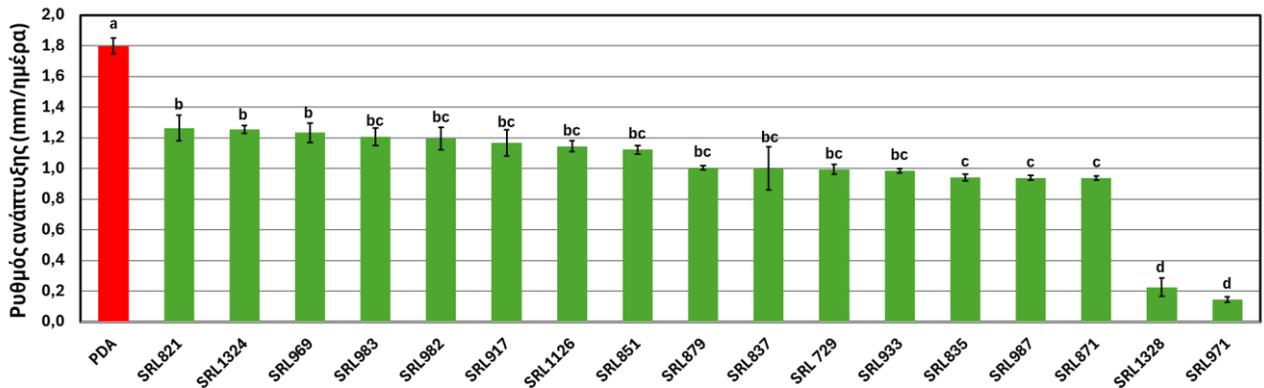
Τύπος βιοδοκιμών	Επέμβαση	Μυκητολογικές παράμετροι			
		Ρυθμός ανάπτυξης (mm/ημέρα)	Αριθμός κονιδίων ($\times 10^5$)/ δισκίο διαμέτρου 5 mm	Πάχος υφών (μm)	Εμβαδόν μικροσκληρωτίων (cm^2)
Δοκιμές αντιπαραβολής	V.d.+ PDA	1.7 \pm 0.1 ab	35.0 \pm 11.5 bc	3.2 \pm 0.1 ab	7.7 \pm 1.5 ab
	V.d.+ SRL689	1.1 \pm 0.0 cd	42.9 \pm 9.0 bc	2.9 \pm 0.1 abc	5.6 \pm 0.5 ab
	V.d.+ SRL764	0.9 \pm 0.0 d	14.8 \pm 2.7 bc	2.9 \pm 0.1 abc	4.6 \pm 0.5 b
	V.d.+ SRL768	1.4 \pm 0.0 bc	30.1 \pm 3.3 bc	3.0 \pm 0.2 abc	6.8 \pm 0.2 ab
	V.d.+ SRL769	1.7 \pm 0.0 a	13.2 \pm 0.6 c	3.4 \pm 0.2 a	8.6 \pm 0.5 a
	V.d.+ SRL771	1.0 \pm 0.1 d	59.6 \pm 14.3 abc	2.9 \pm 0.1 abc	4.3 \pm 0.4 b
	V.d.+ SRL774	1.0 \pm 0.0 d	49.4 \pm 14.1 bc	3.1 \pm 0.2 ab	6.2 \pm 0.2 ab
	V.d.+ SRL810	1.1 \pm 0.0 cd	29.2 \pm 3.7 bc	2.9 \pm 0.1 abc	7.4 \pm 0.1 ab
	V.d.+ SRL811	1.0 \pm 0.1 d	109.6 \pm 27.6 a	2.3 \pm 0.1 d	5.3 \pm 1.1 ab
	V.d.+ SRL816	0.9 \pm 0.0 d	33.4 \pm 8.16 bc	3.3 \pm 0.2 a	5.8 \pm 0.3 ab
	V.d.+ SRL818	1.5 \pm 0.1 ab	53.1 \pm 9.1 bc	2.5 \pm 0.1 cd	5.9 \pm 1.2 ab
	V.d.+ SRL820	1.7 \pm 0.0 a	64.8 \pm 5.8 ab	3.1 \pm 0.1 ab	7.5 \pm 0.5 ab
	V.d.+SRL937	1.0 \pm 0.1 d	15.9 \pm 3.1 bc	2.9 \pm 0.1 abc	5.3 \pm 1.1 ab
	V.d.+SRL1301	1.1 \pm 0.0 cd	29.3 \pm 3.1 bc	2.6 \pm 0.1 bcd	4.9 \pm 1.2 ab
	V.d.+SRL1302	1.1 \pm 0.0 cd	19.2 \pm 0.9 bc	2.5 \pm 0.1 bcd	6.3 \pm 0.4 ab

* Εντός των στηλών, οι τιμές οι οποίες ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σύμφωνα με τη δοκιμασία Tukey HSD με $P \leq 0.05$.



Βακτηριακό στέλεχος

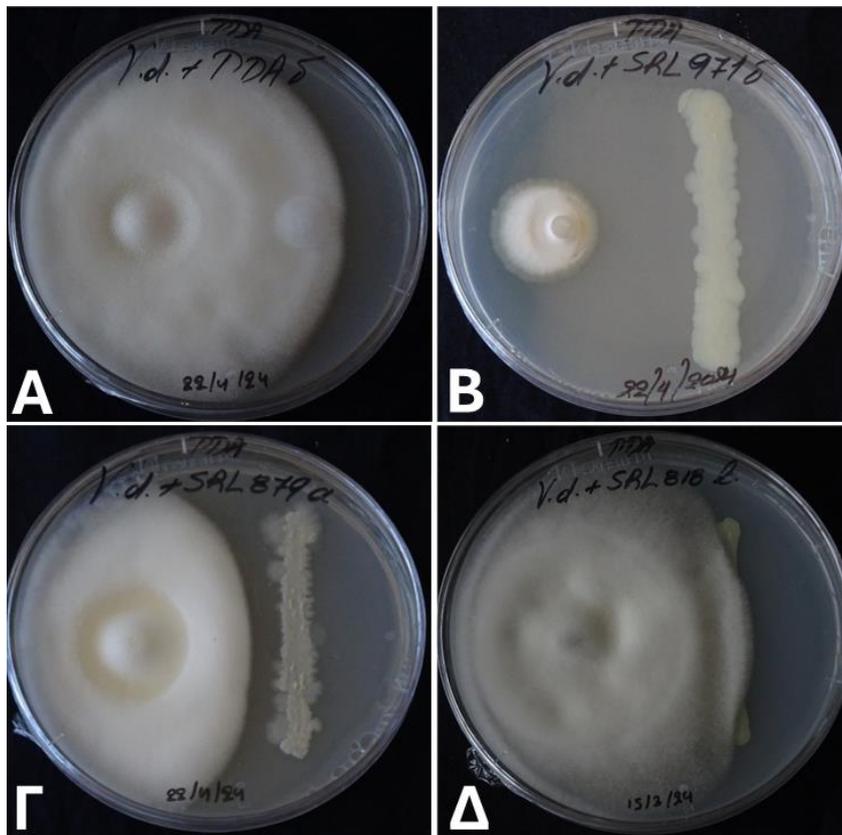
Εικόνα 4.5.1-18. Ρυθμός μυκηλιακής ανάπτυξης (mm/ημέρα) του μύκητα *Verticillium dahliae* (απομόνωση 999-1) υπό την επίδραση των 14 βακτηριακών στελεχών σε τυπικές δοκιμές αντιπαραβολής (φθίνουσα κατάταξη). Η κόκκινη στήλη αντιπροσωπεύει τον μάρτυρα ενώ οι πράσινες τις επεμβάσεις με τα βακτηριακά στελέχη που επέφεραν στατιστικά σημαντική μείωση του ρυθμού ανάπτυξης.



Βακτηριακό στέλεχος

Εικόνα 4.5.1-19. Ρυθμός μυκηλιακής ανάπτυξης (mm/ημέρα) του μύκητα *Verticillium dahliae* (απομόνωση 999-1) υπό την επίδραση των 17 βακτηριακών στελεχών σε τυπικές δοκιμές αντιπαραβολής (φθίνουσα κατάταξη). Η κόκκινη στήλη αντιπροσωπεύει τον μάρτυρα ενώ οι πράσινες τις επεμβάσεις με τα

βακτηριακά στελέχη που επέφεραν στατιστικά σημαντική μείωση του ρυθμού ανάπτυξης.



Εικόνα 4.5.1-20. Επίδραση βακτηριακών στελεχών στη μυκηλιακή ανάπτυξη του μύκητα *Verticillium dahliae* (απομόνωση 999-1) που προέκυψαν κατά διεξοδική αξιολόγηση 31 βακτηριακών στελεχών σε τυπικές δοκιμές αντιπαραβολής. Στην εικόνα απεικονίζονται: Α) μάρτυρας (Control-), καθώς και η παρεμποδιστική δράση των βακτηριακών στελεχών με κωδικό Β) SRL971 (Υψηλή παρεμπόδιση στη μυκηλιακή ανάπτυξη) Γ) SRL879 (Μέτρια παρεμπόδιση) και Δ) SRL818 (Χωρίς παρεμπόδιση).

Από τα αποτελέσματα της αξιολόγησης των 31 βακτηριακών στελεχών με δοκιμές πτητικών έναντι του μύκητα *Verticillium dahliae* (απομόνωση 999-1) καταδεικνύουν ότι 12 βακτηριακά στελέχη προκάλεσαν στατιστικά σημαντική μείωση του ρυθμού ανάπτυξης του μύκητα συγκριτικά με το μάρτυρα. Σύμφωνα με τις **Εικόνες 4.5.1-21 και 4.5.1-22**, τα στελέχη αυτά είναι τα SRL821, SRL835, SRL851, SRL879, SRL917, SRL933, SRL971, SRL982, SRL983, SRL1126, SRL1324 και SRL1328 (**Εικόνα 4.5.1-23**). Όσον αφορά στο πάχος των υφών, όπως απεικονίζεται στους **Πίνακες 4.5.1-5 και 4.5.1-6**, 4 βακτηριακά στελέχη επέφεραν στατιστικά σημαντική μείωση σε σύγκριση με τον μάρτυρα. Τα στελέχη αυτά είναι τα SRL729, SRL917, SRL1126 και SRL1328. Αναφορικά με το εμβαδόν των μικροσκληρωτίων, 17 βακτηριακά στελέχη επέφεραν στατιστικά σημαντική μείωση σε σχέση με το μάρτυρα. Τα στελέχη είναι τα SRL729, SRL821, SRL835, SRL837, SRL851, SRL871, SRL879, SRL917, SRL933, SRL969, SRL971, SRL982, SRL983, SRL987, SRL1126, SRL1324 και SRL1328. Τέλος, από τους **Πίνακες 4.5.1-5 και 4.5.1-6**, κανένα στέλεχος δε μετέβαλλε στατιστικά σημαντικά τον αριθμό παραγόμενων κονιδίων του μύκητα *V. dahliae*. Από την αξιολόγηση του ρυθμού της μυκηλιακής ανάπτυξης προκύπτει η υψηλότερη μείωση προήλθε από τα βακτηριακά στελέχη SRL1328, SRL971 και SRL851 (**Πίνακες 4.5.1-5 και 4.5.1-6**).

Πίνακας 4.5.1-5. Μέσοι όροι και τυπικά σφάλματα (\pm) των μετρήσεων των μυκητολογικών παραμέτρων

σε δοκιμές πτητικών που προέκυψαν από την αξιολόγηση της αντιμικροβιακής δράσης των 14 βακτηριακών στελεχών έναντι του μύκητα *Verticillium dahliae*.

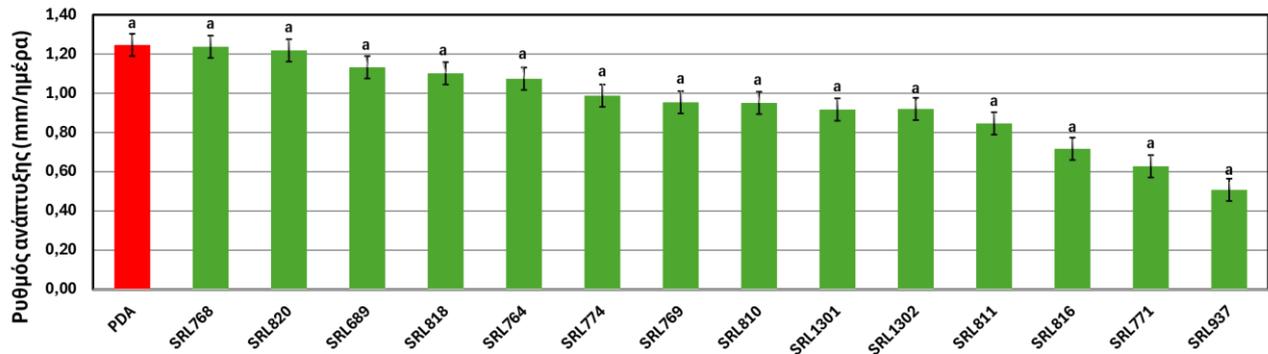
Τύπος βιοδοκιμών	Επέμβαση	Μυκητολογικές παράμετροι			
		Ρυθμός ανάπτυξης (mm/ημέρα)	Αριθμός κονιδίων ($\times 10^5$)/ δισκίο διαμέτρου 5 mm	Πάχος υφών (μm)	Εμβαδόν μικροσκληρωτίων (cm^2)
Δοκιμές πτητικών	V.d./ PDA	1.2 \pm 0.2 a	28.2 \pm 2.7 a	3.2 \pm 0.2 a	5.1 \pm 1.9 a
	V.d./ SRL689	1.1 \pm 0.2 a	29.3 \pm 3.6 a	3.0 \pm 0.1 a	5.1 \pm 1.5 a
	V.d./ SRL764	1.1 \pm 0.2 a	22.0 \pm 2.5 a	3.1 \pm 0.1 a	3.7 \pm 1.8 a
	V.d./ SRL768	1.2 \pm 0.2 a	38.7 \pm 10.1 a	3.3 \pm 0.1 a	5.3 \pm 2.1 a
	V.d./ SRL769	1.1 \pm 0.1 a	39.7 \pm 10.3 a	3.4 \pm 0.2 a	1.6 \pm 1.0 a
	V.d./ SRL771	0.6 \pm 0.0 a	22.4 \pm 6.7 a	3.0 \pm 0.1 a	0.0 \pm 0.0 a
	V.d./ SRL774	1.1 \pm 0.2 a	36.7 \pm 11.2 a	3.3 \pm 0.2 a	4.1 \pm 1.7 a
	V.d./ SRL810	1.1 \pm 0.1 a	28.2 \pm 2.7 a	3.3 \pm 0.2 a	2.0 \pm 1.6 a
	V.d./ SRL811	0.8 \pm 0.1 a	43.3 \pm 7.4 a	3.2 \pm 0.2 a	1.3 \pm 0.9 a
	V.d./ SRL816	0.7 \pm 0.2 a	13.3 \pm 2.7 a	2.7 \pm 0.1 a	2.5 \pm 2.4 a
	V.d./ SRL818	1.1 \pm 0.2 a	20.2 \pm 1.4 a	3.4 \pm 0.2 a	3.5 \pm 1.5 a
	V.d./ SRL820	1.2 \pm 0.2 a	28.8 \pm 4.3 a	3.1 \pm 0.1 a	5.9 \pm 1.5 a
	V.d./ SRL937	0.5 \pm 0.1 a	28.3 \pm 4.8 a	3.1 \pm 0.1 a	0.9 \pm 0.9 a
	V.d./ SRL1301	0.9 \pm 0.2 a	33.4 \pm 9.1 a	2.8 \pm 0.1 a	2.3 \pm 1.5 a
	V.d./ SRL1302	0.9 \pm 0.2 a	24.2 \pm 3.7 a	3.3 \pm 0.2 a	2.6 \pm 1.6 a

* Εντός των στηλών, οι τιμές οι οποίες ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σύμφωνα με τη δοκιμασία Tukey HSD με $P \leq 0.05$.

Πίνακας 4.5.1-6. Μέσοι όροι και τυπικά σφάλματα (\pm) των μετρήσεων των μυκητολογικών παραμέτρων σε δοκιμές πτητικών που προέκυψαν από την αξιολόγηση της αντιμικροβιακής δράσης των 17 βακτηριακών στελεχών έναντι του μύκητα *Verticillium dahliae*.

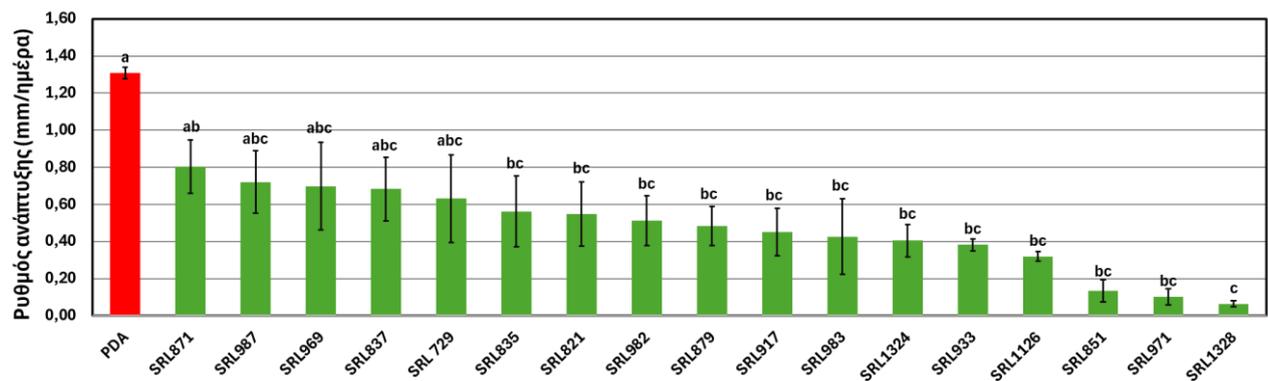
Τύπος βιοδοκιμών	Επέμβαση	Μυκητολογικές παράμετροι			
		Ρυθμός ανάπτυξης (mm/ημέρα)	Αριθμός κονιδίων ($\times 10^5$)/ δισκίο διαμέτρου 5 mm	Πάχος υφών (μm)	Εμβαδόν μικροσκληρωτίων (cm^2)
Δοκιμές πτητικών	V.d./ PDA	1.3 \pm 0.0 a	11.0 \pm 2.3 ab	3.3 \pm 0.1 abc	3.3 \pm 1.6 a
	V.d./ SRL729	0.6 \pm 0.2 abc	9.2 \pm 0.8 ab	2.6 \pm 0.1 def	0.2 \pm 0.2 b
	V.d./ SRL821	0.5 \pm 0.2 bc	13.2 \pm 1.3 ab	3.4 \pm 0.1 ab	0.0 \pm 0.0 b
	V.d./ SRL835	0.6 \pm 0.2 bc	11.0 \pm 1.1 ab	3.8 \pm 0.1 a	0.1 \pm 0.1 b
	V.d./ SRL837	0.7 \pm 0.2 abc	14.8 \pm 5.4 ab	3.4 \pm 0.2 ab	0.9 \pm 0.9 b
	V.d./ SRL851	0.1 \pm 0.1 bc	6.6 \pm 1.2 ab	2.8 \pm 0.1 cdef	0.0 \pm 0.0 b
	V.d./ SRL871	0.8 \pm 0.1 ab	16.3 \pm 4.0 a	3.4 \pm 0.1 ab	0.0 \pm 0.0 b
	V.d./ SRL879	0.5 \pm 0.1 bc	16.3 \pm 4.3 a	3.1 \pm 0.1 bcd	0.0 \pm 0.0 b
	V.d./ SRL917	0.5 \pm 0.1 bc	13.6 \pm 0.5 ab	2.5 \pm 0.1 ef	0.0 \pm 0.0 b
	V.d./ SRL933	0.4 \pm 0.0 bc	5.7 \pm 2.1 ab	2.8 \pm 0.1 bcde	0.0 \pm 0.0 b
	V.d./ SRL969	0.7 \pm 0.2 abc	10.5 \pm 3.7 ab	2.9 \pm 0.1 bcde	0.0 \pm 0.0 b
	V.d./ SRL971	0.1 \pm 0.0 bc	3.9 \pm 0.2 ab	3.2 \pm 0.1 bcd	0.0 \pm 0.0 b
	V.d./ SRL982	0.5 \pm 0.1 bc	6.7 \pm 4.1 ab	3.0 \pm 0.1 bcde	0.0 \pm 0.0 b
	V.d./ SRL983	0.4 \pm 0.2 bc	3.6 \pm 0.8 ab	3.8 \pm 0.2 a	0.0 \pm 0.0 b
	V.d./ SRL987	0.7 \pm 0.2 abc	2.0 \pm 1.0 b	3.2 \pm 0.1 abc	0.7 \pm 0.7 b
	V.d./ SRL1126	0.3 \pm 0.0 bc	5.9 \pm 2.8 ab	2.6 \pm 0.1 def	0.0 \pm 0.0 b
	V.d./ SRL1324	0.4 \pm 0.1 bc	7.6 \pm 2.3 ab	2.8 \pm 0.1 cdef	0.0 \pm 0.0 b
	V.d./ SRL1328	0.1 \pm 0.0 c	1.2 \pm 0.4 b	2.2 \pm 0.1 f	0.0 \pm 0.0 b

* Εντός των στηλών, οι τιμές οι οποίες ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σύμφωνα με τη δοκιμασία Tukey HSD με $P \leq 0.05$.



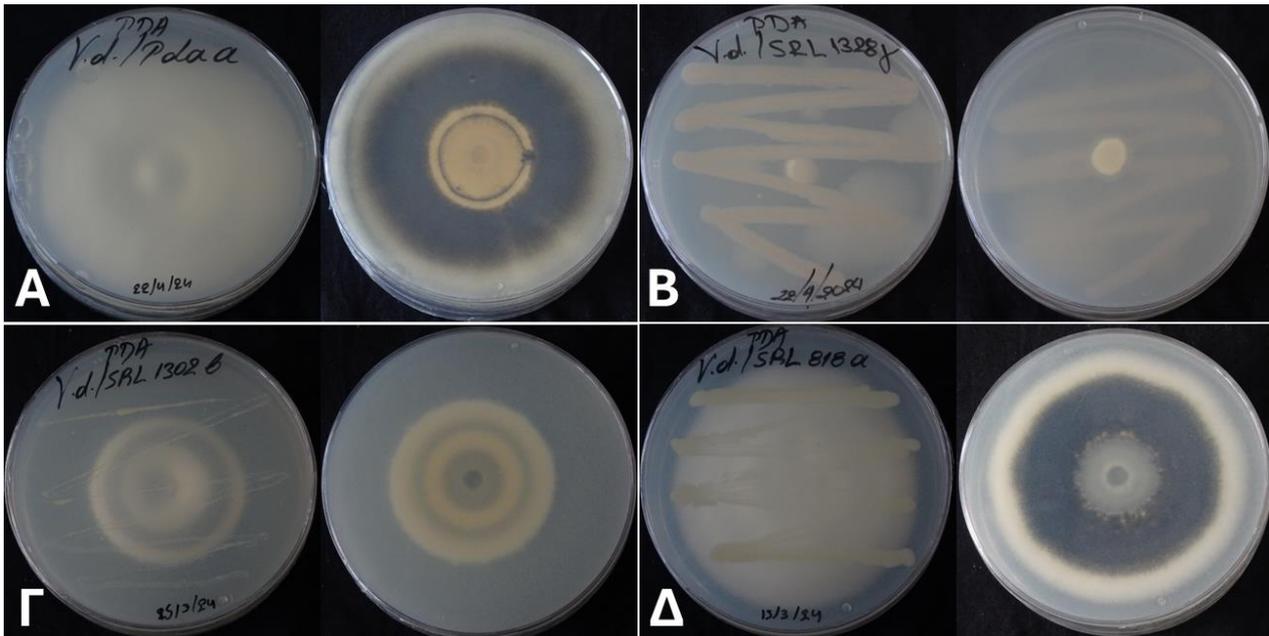
Βακτηριακό στέλεχος

Εικόνα 4.5.1-21. Ρυθμός μυκηλιακής ανάπτυξης (mm/ημέρα) του μύκητα *Verticillium dahliae* (απομόνωση 999-1) υπό την επίδραση των 14 βακτηριακών στελεχών σε δοκιμές πτητικών (φθίνουσα κατάταξη). Η κόκκινη στήλη αντιπροσωπεύει τον μάρτυρα ενώ οι πράσινες τις επεμβάσεις με τα βακτηριακά στελέχη που επέφεραν στατιστικά σημαντική μείωση του ρυθμού ανάπτυξης.



Βακτηριακό στέλεχος

Εικόνα 4.5.1-22. Ρυθμός μυκηλιακής ανάπτυξης (mm/ημέρα) του μύκητα *Verticillium dahliae* (απομόνωση 999-1) υπό την επίδραση των 17 βακτηριακών στελεχών σε δοκιμές πτητικών (φθίνουσα κατάταξη). Η κόκκινη στήλη αντιπροσωπεύει τον μάρτυρα ενώ οι πράσινες τις επεμβάσεις με τα βακτηριακά στελέχη που επέφεραν στατιστικά σημαντική μείωση του ρυθμού ανάπτυξης.



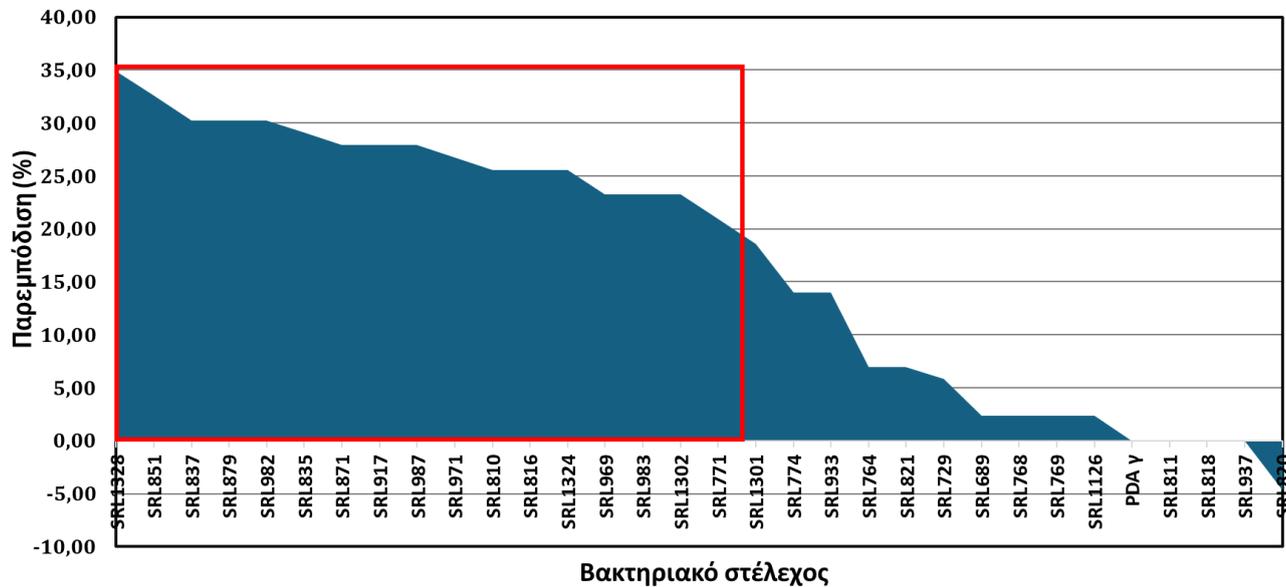
Εικόνα 4.5.1-23. Επίδραση βακτηριακών στελεχών στη μυκηλιακή ανάπτυξη του μύκητα *Verticillium dahliae* (απομόνωση 999-1) που προέκυψαν κατά διεξοδική αξιολόγηση 31 βακτηριακών στελεχών σε δοκιμές πτητικών. Στην εικόνα απεικονίζονται: **A)** μάρτυρας (Control-), καθώς και η παρεμποδιστική δράση των βακτηριακών στελεχών με κωδικό **B)** SRL1328 (Υψηλή παρεμπόδιση στη μυκηλιακή ανάπτυξη) **Γ)** SRL1302 (Μέτρια παρεμπόδιση) και **Δ)** SRL818 (Χωρίς παρεμπόδιση).

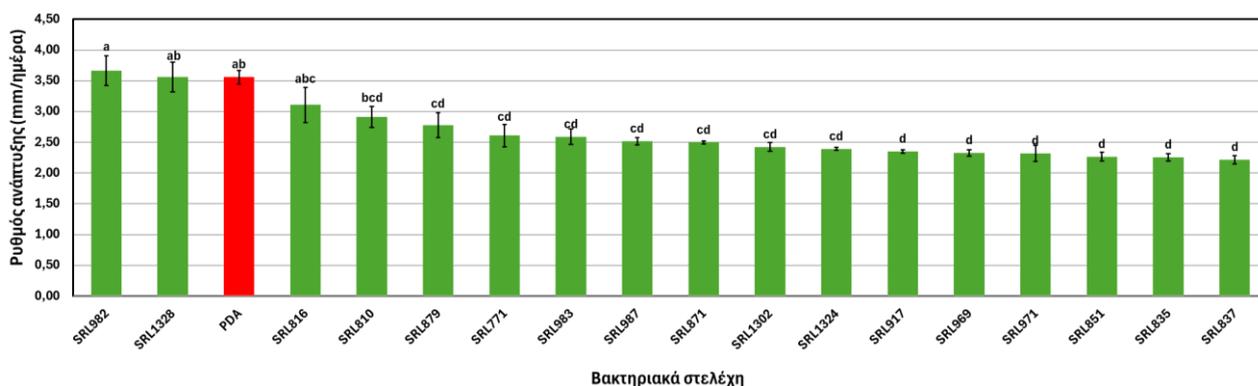
Αποτελέσματα αξιολόγησης της αντιμικροβιακής δράσης των 31 βακτηριακών στελεχών έναντι του παθογόνου *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-cucumerinum* (απομόνωση AFu68A)

Για το μύκητα *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-cucumerinum*, πριν τη διεξοδική αξιολόγηση, προηγήθηκε μια προκαταρκτική αξιολόγηση των 31 βακτηριακών στελεχών έτσι ώστε να επιλεχθούν τα πιο αποτελεσματικά των οποίων η παρεμποδιστική τους δράση ήταν $\geq 20\%$. Βάσει αυτού του κριτηρίου επιλέχθηκαν 17 βακτηριακά στελέχη προκειμένου να αξιολογηθούν περαιτέρω σε διεξοδικές *in-vitro* βιοδοκιμές. Όπως απεικονίζεται στην **Εικόνα 4.5.1-24**, τα 17 βακτηριακά στελέχη με παρεμπόδιση $\geq 20\%$ ήταν τα SRL1328, SRL851, SRL837, SRL879, SRL982, SRL835, SRL871, SRL917, SRL987, SRL971, SRL810, SRL816, SRL1324, SRL969, SRL983, SRL1302 και SRL771. Ενδεικτικά, σημειώνεται ότι τα 3 πιο αποτελεσματικά τα οποία επέδειξαν την υψηλότερη παρεμπόδιση (%) ήταν τα στελέχη SRL1328 (34,88%), SRL851 (32,56%) και SRL837 (30,23%).

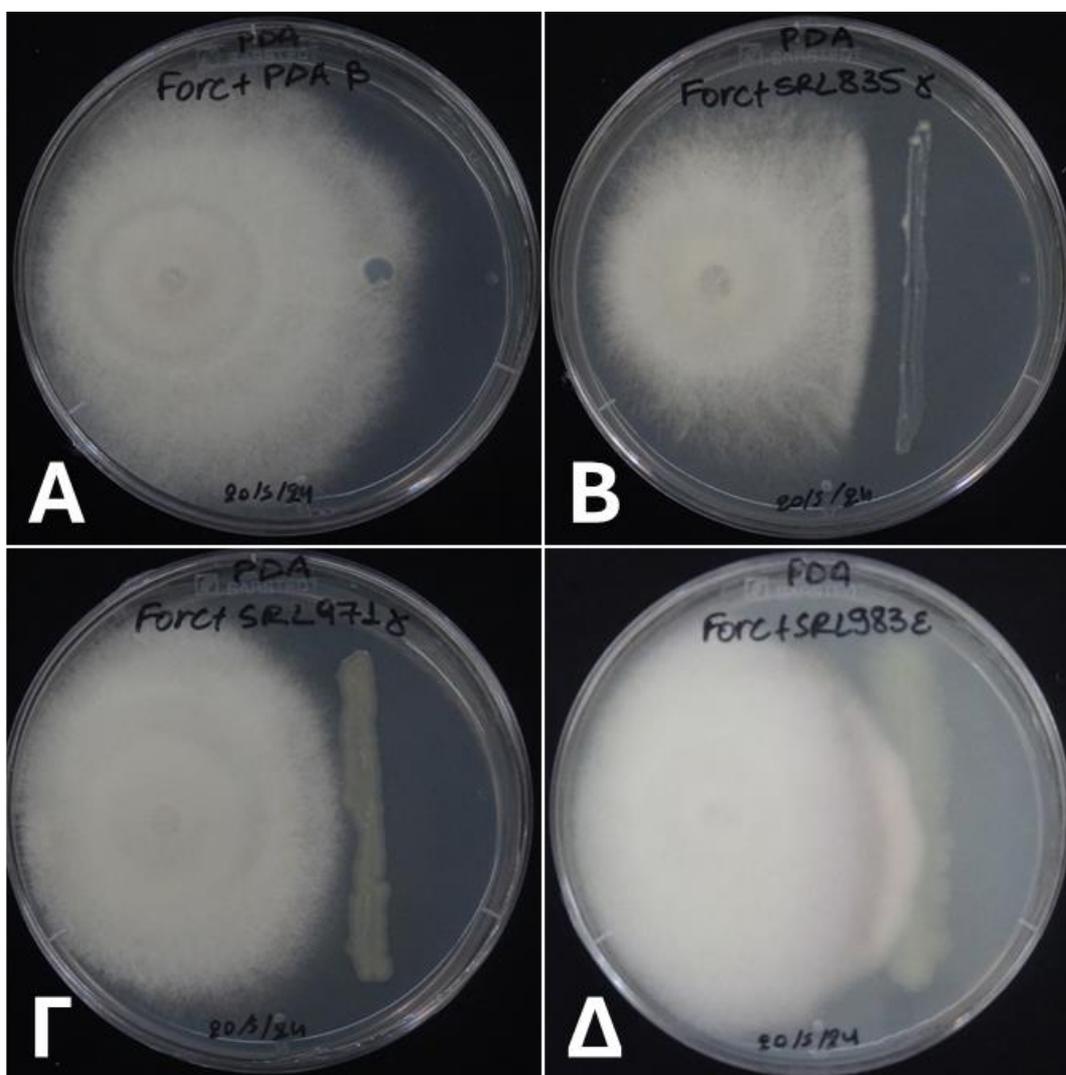
Τα αποτελέσματα της διεξοδικής αξιολόγησης των 17 βακτηριακών στελεχών με τυπικές δοκιμές αντιπαραβολής έναντι του μύκητα *Forc* (AFu68A) καταδεικνύουν ότι 13 βακτηριακά στελέχη προκάλεσαν στατιστικά σημαντική μείωση του ρυθμού ανάπτυξης του μύκητα συγκριτικά με το μάρτυρα (**Εικόνα 4.5.1-24**). Σύμφωνα με την **Εικόνα 4.5.1-25**, τα στελέχη αυτά είναι τα SLR879, SLR771, SLR983, SLR987, SLR871, SLR1302, SLR1324, SLR917, SLR969, SLR971, SLR851, SLR835 και SRL837. Όσον αφορά στο πάχος των υφών, όπως απεικονίζεται στον **Πίνακα 4.5.1-7**, 6 βακτηριακά στελέχη επέφεραν στατιστικά σημαντική μείωση σε σύγκριση με τον μάρτυρα. Τα στελέχη αυτά είναι τα SRL837, SRL879, SRL917, SRL971, SRL982 και SRL1302. Τέλος, κανένα βακτηριακό στέλεχος δεν επηρέασε στατιστικά σημαντικά τον αριθμό των παραγόμενων κονιδίων του *Forc* (**Πίνακας 4.5.1-7**). Από την αξιολόγηση του ρυθμού

της μυκηλιακής ανάπτυξης προκύπτει η υψηλότερη μείωση προήλθε από τα βακτηριακά στελέχη SRL837, SRL835 και SRL851 (Πίνακας 4.5.1-7).





Εικόνα 4.5.1-25. Ρυθμός μυκηλιακής ανάπτυξης (mm/ημέρα) του μύκητα *Fusarium oxysporum f.sp. radicis-cucumerinum* (απομόνωση AFu68A) υπό την επίδραση των 17 βακτηριακών στελεχών σε τυπικές δοκιμές αντιπαραβολής (φθίνουσα κατάταξη). Η κόκκινη στήλη αντιπροσωπεύει τον μάρτυρα ενώ οι πράσινες τις επεμβάσεις με τα βακτηριακά στελέχη που επέφεραν στατιστικά σημαντική μείωση του ρυθμού ανάπτυξης.



Εικόνα 4.5.1-26. Επίδραση βακτηριακών στελεχών στη μυκηλιακή ανάπτυξη του μύκητα *Fusarium oxysporum f.sp. radicis-cucumerinum* (απομόνωση AFu68A) που προέκυψαν κατά διεξοδική αξιολόγηση 17 βακτηριακών στελεχών σε τυπικές δοκιμές αντιπαραβολής. Στην εικόνα απεικονίζονται: **Α)** μάρτυρας (Control-), καθώς και η παρεμποδιστική δράση των βακτηριακών στελεχών με κωδικό **Β)** SRL835 (Υψηλή παρεμπόδιση στη μυκηλιακή ανάπτυξη) **Γ)** SRL971 (Μέτρια παρεμπόδιση) και **Δ)** SRL983 (Χωρίς

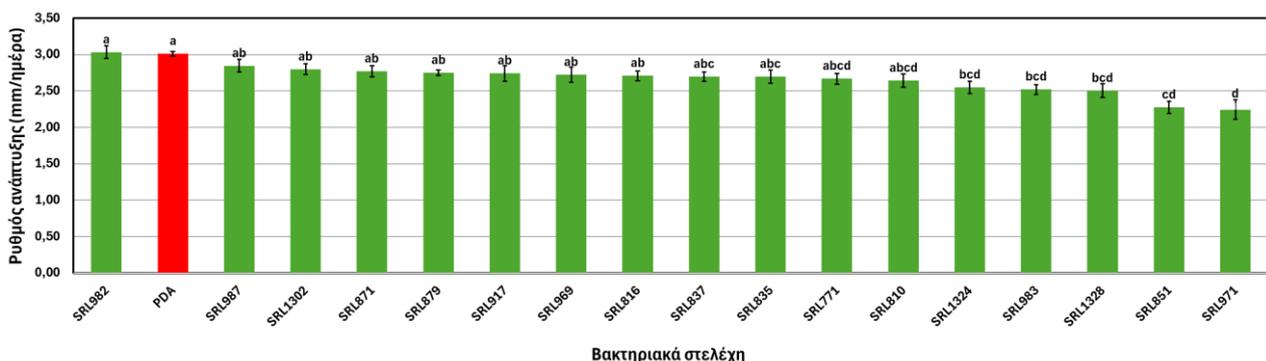
παρεμπόδιση).

Από τα αποτελέσματα της αξιολόγησης των 17 βακτηριακών στελεχών με δοκιμές πτητικών έναντι του μύκητα *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-cucumerinum* (AFu68A) καταδεικνύουν ότι 5 βακτηριακά στελέχη προκάλεσαν στατιστικά σημαντική μείωση του ρυθμού ανάπτυξης του μύκητα συγκριτικά με το μάρτυρα. Τα στελέχη αυτά ήταν τα SRL851, SRL971, SRL983, SRL1324 και SRL1328 (**Εικόνες 4.5.1-27 και 4.5.1-28**). Όσον αφορά στο πάχος των υφών, όπως απεικονίζεται στον **Πίνακα 4.5.1-8**, 8 βακτηριακά στελέχη επέφεραν στατιστικά σημαντική μείωση σε σύγκριση με τον μάρτυρα. Τα στελέχη αυτά είναι τα SRL851, SRL879, SRL917, SRL971, SRL969, SRL983, SRL1302 και SRL1324. Τέλος, 5 βακτηριακά στελέχη μείωσαν στατιστικά σημαντικά τον αριθμό παραγόμενων κονιδίων σύμφωνα με τον **Πίνακα 4.5.1-8**. Τα στελέχη αυτά είναι τα SRL810, SRL816, SRL835, SRL969 και SRL1328.

Πίνακας 4.5.1-8. Μέσοι όροι και τυπικά σφάλματα (\pm) των μετρήσεων των μυκητολογικών παραμέτρων σε δοκιμές πτητικών που προέκυψαν από την αξιολόγηση της αντιμικροβιακής δράσης των 17 βακτηριακών στελεχών έναντι του μύκητα *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-cucumerinum* (απομόνωση AFu68A).

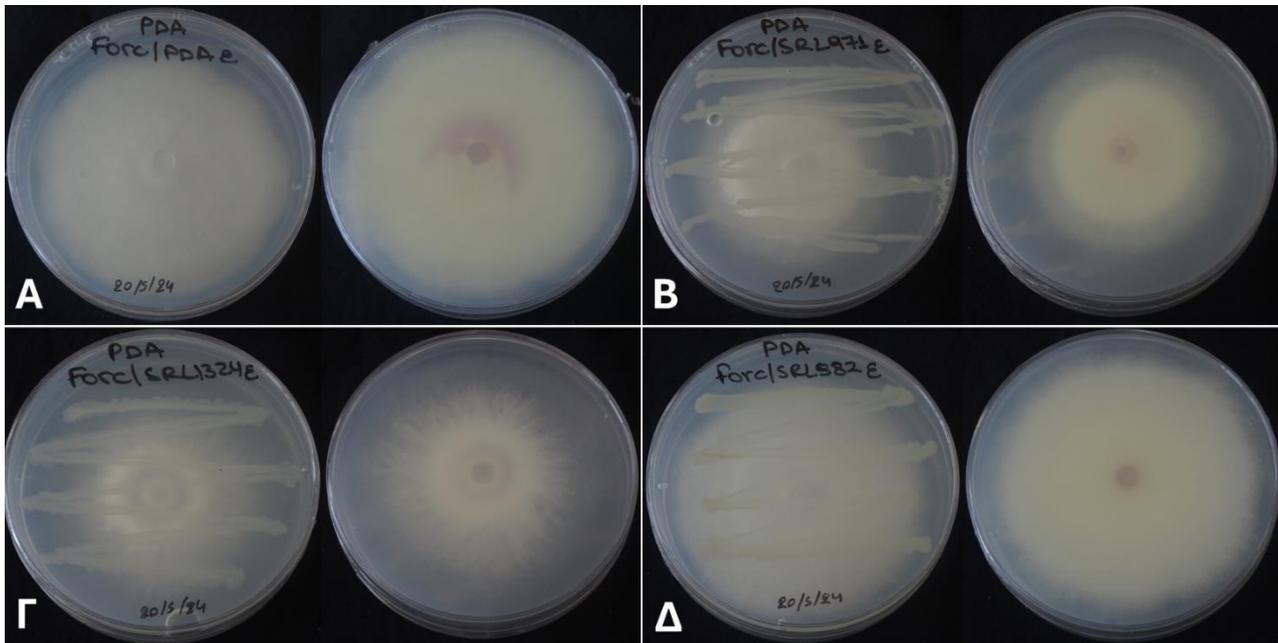
Τύπος βιοδοκιμών	Επέμβαση	Μυκητολογικές παράμετροι		
		Ρυθμός ανάπτυξης (mm/ημέρα)	Αριθμός κονιδίων ($\times 10^5$)/ δισκίο διαμέτρου 5 mm	Πάχος υφών (μm)
Δοκιμές πτητικών (Volatile test)	F.o.r.c./PDA	3.0 \pm 0.0 a	13.2 \pm 4.9 a	6.1 \pm 0.3 a
	F.o.r.c./SRL771	2.7 \pm 0.1 abcd	5.2 \pm 0.3 ab	5.2 \pm 0.2 ab
	F.o.r.c./SRL810	2.6 \pm 0.1 abcd	4.0 \pm 0.9 b	5.4 \pm 0.3 ab
	F.o.r.c./SRL816	2.7 \pm 0.1 ab	2.7 \pm 0.5 b	5.6 \pm 0.3 ab
	F.o.r.c./SRL835	2.7 \pm 0.1 abc	3.7 \pm 1.2 b	5.1 \pm 0.2 ab
	F.o.r.c./SRL837	2.7 \pm 0.1 abc	10.5 \pm 2.6 ab	5.5 \pm 0.2 ab
	F.o.r.c./SRL851	2.3 \pm 0.1 cd	5.7 \pm 2.6 ab	4.7 \pm 0.2 b
	F.o.r.c./SRL871	2.8 \pm 0.1 ab	9.4 \pm 0.7 ab	5.5 \pm 0.3 ab
	F.o.r.c./SRL879	2.8 \pm 0.0 ab	5.2 \pm 0.5 ab	4.9 \pm 0.2 b
	F.o.r.c./SRL917	2.7 \pm 0.1 ab	6.5 \pm 1.1 ab	4.7 \pm 0.2 b
	F.o.r.c./SRL969	2.7 \pm 0.1 ab	3.6 \pm 0.6 b	4.6 \pm 0.2 b
	F.o.r.c./SRL971	2.2 \pm 0.1 d	5.1 \pm 0.8 ab	4.7 \pm 0.2 b
	F.o.r.c./SRL982	3.0 \pm 0.1 a	10.9 \pm 1.8 ab	5.1 \pm 0.2 ab
	F.o.r.c./SRL983	2.5 \pm 0.1 bcd	6.5 \pm 1.3 ab	4.7 \pm 0.2 b
	F.o.r.c./SRL987	2.8 \pm 0.1 ab	4.9 \pm 0.6 ab	5.6 \pm 0.3 ab
	F.o.r.c./SRL1302	2.8 \pm 0.1 ab	5.4 \pm 0.9 ab	4.7 \pm 0.2 b
	F.o.r.c./SRL1324	2.5 \pm 0.1 bcd	5.6 \pm 0.2 ab	4.8 \pm 0.2 b
F.o.r.c./SRL1328	2.5 \pm 0.1 bcd	4.3 \pm 0.3 b	5.3 \pm 0.3 ab	

* Εντός των στηλών, οι τιμές οι οποίες ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σύμφωνα με τη δοκιμασία Tukey HSD με $P \leq 0.05$.



Εικόνα 4.5.1-27. Ρυθμός μυκηλιακής ανάπτυξης (mm/ημέρα) του μύκητα *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-cucumerinum* (απομόνωση AFu68A) υπό την επίδραση των 17 βακτηριακών στελεχών σε δοκιμές πτητικών (φθίνουσα κατάταξη). Η κόκκινη στήλη αντιπροσωπεύει τον μάρτυρα ενώ οι πράσινες τις

επεμβάσεις με τα βακτηριακά στελέχη που επέφεραν στατιστικά σημαντική μείωση του ρυθμού ανάπτυξης.



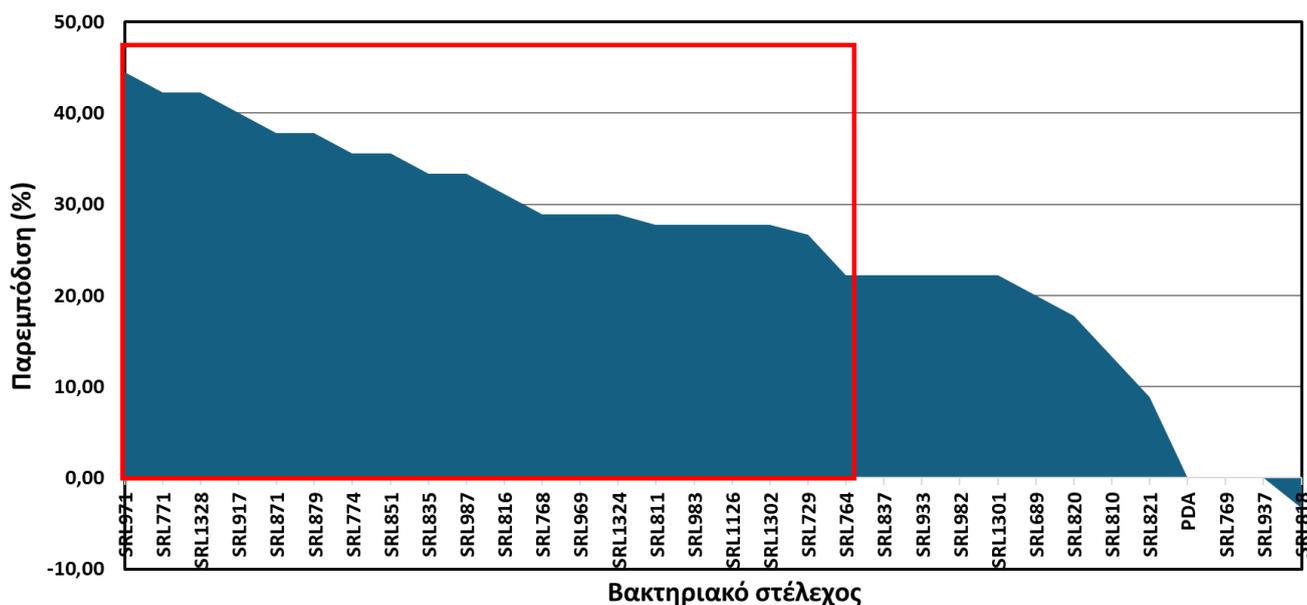
Εικόνα 4.5.1-28. Επίδραση βακτηριακών στελεχών στη μυκηλιακή ανάπτυξη του μύκητα *Fusarium oxysporum f.sp. radicis-cucumerinum* (απομόνωση AFu68A) που προέκυψαν κατά διεξοδική αξιολόγηση 17 βακτηριακών στελεχών σε δοκιμές πτητικών. Στην εικόνα απεικονίζονται: **Α)** μάρτυρας (Control-), καθώς και η παρεμποδιστική δράση των βακτηριακών στελεχών με κωδικό **Β)** SRL971 (Υψηλή παρεμπόδιση στη μυκηλιακή ανάπτυξη) **Γ)** SRL1324 (Μέτρια παρεμπόδιση) και **Δ)** SRL982 (Χωρίς παρεμπόδιση).

Αποτελέσματα αξιολόγησης της αντιμικροβιακής δράσης των 31 βακτηριακών στελεχών έναντι του παθογόνου *Botrytis cinerea* (απομόνωση B.14.9)

Για το μύκητα *Botrytis cinerea*, πριν τη διεξοδική αξιολόγηση, προηγήθηκε μια προκαταρκτική αξιολόγηση των 31 βακτηριακών στελεχών έτσι ώστε να επιλεγθούν τα πιο αποτελεσματικά των οποίων η παρεμποδιστική τους δράση ήταν $\geq 20\%$. Βάσει αυτού του κριτηρίου επιλέχθηκαν 20 βακτηριακά στελέχη προκειμένου να αξιολογηθούν περαιτέρω σε διεξοδικές *in-vitro* βιοδοκιμές. Όπως απεικονίζεται στην **Εικόνα 4.5.1-29**, τα 20 βακτηριακά στελέχη με παρεμπόδιση $\geq 20\%$ ήταν τα SRL971, SRL771, SRL1328, SRL917, SRL871, SRL879, SRL774, SRL851, SRL835, SRL987, SRL816, SRL768, SRL969, SRL1324, SRL811, SRL983, SRL1126, SRL1302, SRL729 και SRL764. Ενδεικτικά, σημειώνεται ότι τα 3 πιο αποτελεσματικά τα οποία επέδειξαν την υψηλότερη παρεμπόδιση (%) ήταν τα στελέχη SRL971 (36,79%), SRL1328 (34,26%) και SRL771 (31,76%).

Τα αποτελέσματα της διεξοδικής αξιολόγησης των 20 βακτηριακών στελεχών με τυπικές δοκιμές αντιπαραβολής έναντι του μύκητα *B.cinerea* (B.14.9) καταδεικνύουν ότι και τα 20 βακτηριακά στελέχη προκάλεσαν στατιστικά σημαντική μείωση του ρυθμού ανάπτυξης του μύκητα συγκριτικά με το μάρτυρα. Σύμφωνα με την **Εικόνα 4.5.1-30**, τα στελέχη αυτά είναι τα SRL971, SRL771, SRL1328, SRL917, SRL871, SRL879, SRL774, SRL851, SRL835, SRL987, SRL816, SRL768, SRL969, SRL1324, SRL811, SRL983, SRL1126, SRL1302, SRL729 και SRL764 (**Εικόνα 4.5.1-31**). Όσον αφορά στο πάχος των υφών, όπως απεικονίζεται στον **Πίνακα 4.5.1-9**, 6 βακτηριακά στελέχη επέφεραν στατιστικά σημαντική μείωση σε σύγκριση με τον μάρτυρα. Τα στελέχη αυτά είναι τα SRL768, SRL771, SRL774, SRL816, SRL851 και SRL1324. Σχετικά με τον

αριθμό παραγόμενων σκληρωτίων, 1 βακτήριο αύξησε στατιστικά σημαντικά τον αριθμό των παραγόμενων σκληρωτίων σύμφωνα με τον **Πίνακα 4.5.1-9**. Τέλος, 6 βακτηριακά στελέχη μείωσαν στατιστικά σημαντικά τον αριθμό παραγόμενων κονιδίων του μύκητα *B. cinerea dahliae*. Τα στελέχη αυτά ήταν τα SRL768, SRL969, SRL971, SRL983, SRL1324 και SRL1328 (**Πίνακας 4.5.1-9**). Από την αξιολόγηση του ρυθμού της μυκηλιακής ανάπτυξης προκύπτει η υψηλότερη μείωση προήλθε από τα βακτηριακά στελέχη SRL971, SRL1328 και SRL771 (**Πίνακας 4.5.1-9**).



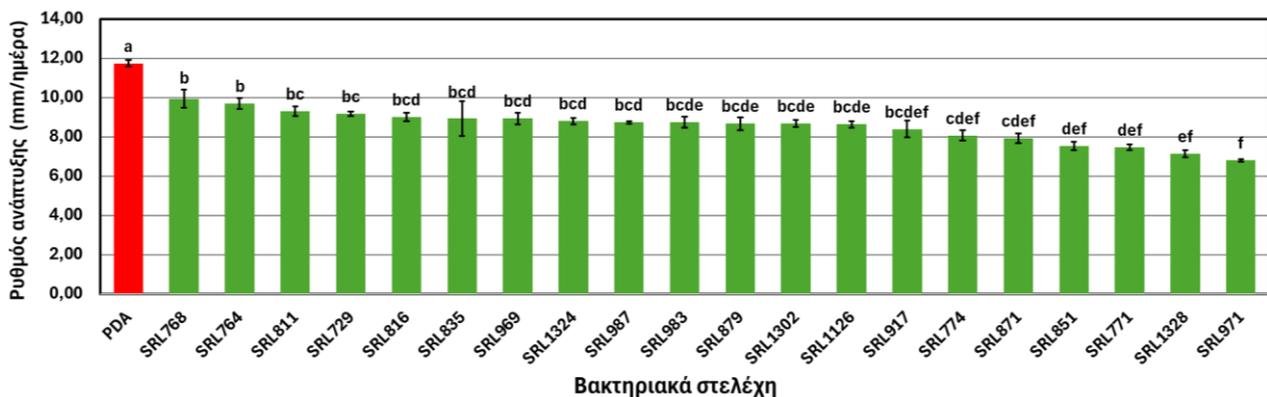
Εικόνα 4.5.1-29. Παρεμπόδιση (%) του ρυθμού της μυκηλιακής ανάπτυξης (mm/ημέρα) του παθογόνου *Botrytis cinerea* (απομόνωση B.14.9) από τα 31 βακτηριακά στελέχη σε τυπικές δοκιμές αντιπαραβολής, στο πλαίσιο προκαταρκτικής αξιολόγησης. Στο κόκκινο πλαίσιο περιλαμβάνονται τα 20 πιο αποτελεσματικά βακτηριακά στελέχη τα οποία εξετάστηκαν περαιτέρω σε διεξοδικές *in-vitro* βιοδοκιμές.

Πίνακας 4.5.1-9. Μέσοι όροι και τυπικά σφάλματα (\pm) των μετρήσεων των μυκητολογικών παραμέτρων σε τυπικές δοκιμές αντιπαραβολής που προέκυψαν από την αξιολόγηση της αντιμικροβιακής δράσης των

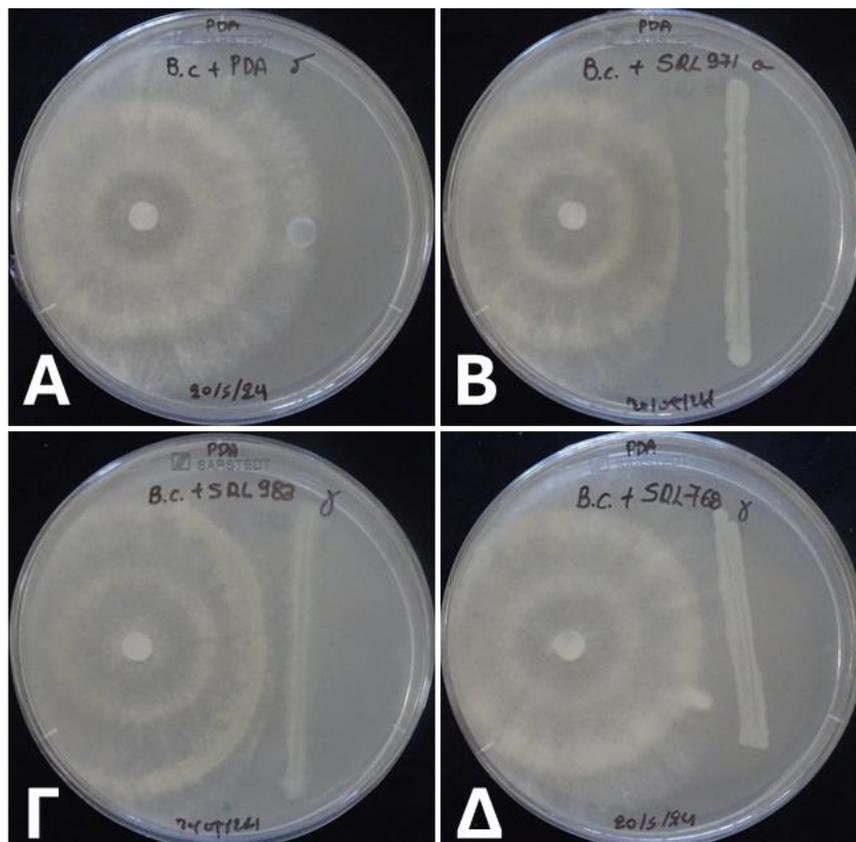
20 βακτηριακών στελεχών έναντι του μύκητα *Botrytis cinerea* (απομόνωση B.14.9).

Τύπος βιοδοκιμών	Επέμβαση	Μυκητολογικές παράμετροι			
		Ρυθμός ανάπτυξης (mm/ημέρα)	Αριθμός κονιδίων ($\times 10^5$)/ δίσκιο διαμέτρου 5 mm	Πάχος υφών (μm)	Αριθμός σκληρωτίων
Δοκιμές αντιπαραβολής (Confrontation test)	B.c.+PDA	11.7±0.2 a	13.7±1.6 a	8.8±0.2 ab	2.0±1.1 b
	B.c.+SRL729	9.2±0.1 bc	11.8±1.5 abc	8.2±0.4 abcde	0.6±0.6 b
	B.c.+SRL764	9.7±0.3 b	10.7±2.8 abcd	8.7±0.3 ab	8.8±3.7 a
	B.c.+SRL768	9.9±0.5 b	4.1±1.3 cde	7.0±0.3 cdef	0.0±0.0 b
	B.c.+SRL771	7.5±0.2 def	6.7±1.1 abcde	4.5±0.3 g	0.0±0.0 b
	B.c.+SRL774	8.1±0.3 cdef	6.2±0.8 abcde	5.8±0.4 fg	1.0±1.0 b
	B.c.+SRL811	9.3±0.2 bc	8.6±1.4 abcde	9.5±0.4 a	1.0±1.0 b
	B.c.+SRL816	9.0±0.2 bcd	9.7±1.3 abcde	4.2±0.1 g	0.8±0.4 b
	B.c.+SRL835	8.9±0.9 bcd	12.2±1.6 abc	9.0±0.4 ab	0.8±0.8 b
	B.c.+SRL851	7.5±0.2 def	12.6±2.5 abc	6.9±0.4 def	4.6±1.7 ab
	B.c.+SRL871	7.9±0.2 cdef	7.0±1.9 abcde	8.7±0.3 abc	0.0±0.0 b
	B.c.+SRL879	8.7±0.3 bcde	6.1±2.9 abcde	8.6±0.3 abcd	0.4±0.2 b
	B.c.+SRL917	8.4±0.4 bcdef	5.0±1.9 abcde	7.8±0.4 abcde	0.4±0.4 b
	B.c.+SRL969	8.9±0.3 bcd	3.9±0.5 cde	7.6±0.4 bcde	0.0±0.0 b
	B.c.+SRL971	6.8±0.1 f	1.2±0.3 e	9.3±0.3 ab	5.2±2.5 ab
	B.c.+SRL983	8.7±0.3 bcde	4.4±0.6 bcd	8.7±0.3 ab	0.6±0.6 b
	B.c.+SRL987	8.7±0.1 bcd	5.3±0.8 abcde	8.1±0.3 abcde	1.2±0.7 b
	B.c.+SRL1126	8.6±0.2 bcde	5.7±1.3 abcde	8.8±0.4 ab	1.8±1.1 b
	B.c.+SRL1302	8.7±0.2 bcde	13.6±4.1 ab	9.1±0.3 ab	0.0±0.0 b
	B.c.+SRL1324	8.8±0.2 bcd	3.4±0.8 cde	6.5±0.4 ef	0.0±0.0 b
B.c.+SRL1328	7.1±0.2 ef	1.9±1.0 de	8.6±0.4 abcd	4.2±2.1 ab	

* Εντός των στηλών, οι τιμές οι οποίες ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σύμφωνα με τη δοκιμασία *Tukey HSD* με $P \leq 0.05$.



Εικόνα 4.5.1-30. Ρυθμός μυκηλιακής ανάπτυξης (mm/ημέρα) του μύκητα *Botrytis cinerea* (απομόνωση B.14.9) υπό την επίδραση των 20 βακτηριακών στελεχών σε τυπικές δοκιμές αντιπαραβολής (φθίνουσα κατάταξη). Η κόκκινη στήλη αντιπροσωπεύει τον μάρτυρα ενώ οι πράσινες τις επεμβάσεις με τα βακτηριακά στελέχη που επέφεραν στατιστικά σημαντική μείωση του ρυθμού ανάπτυξης.



Εικόνα 4.5.1-7. Επίδραση βακτηριακών στελεχών στη μυκηλιακή ανάπτυξη του μύκητα *Botrytis cinerea* (απομόνωση B.14.9) που προέκυψαν κατά διεξοδική αξιολόγηση 20 βακτηριακών στελεχών σε τυπικές δοκιμές αντιπαραβολής. Στην εικόνα απεικονίζονται: **Α)** μάρτυρας (Control-), καθώς και η παρεμποδιστική δράση των βακτηριακών στελεχών με κωδικό **Β)** SRL971 (Υψηλή παρεμπόδιση στη μυκηλιακή ανάπτυξη) **Γ)** SRL983 (Μέτρια παρεμπόδιση) και **Δ)** SRL768 (Χωρίς παρεμπόδιση).

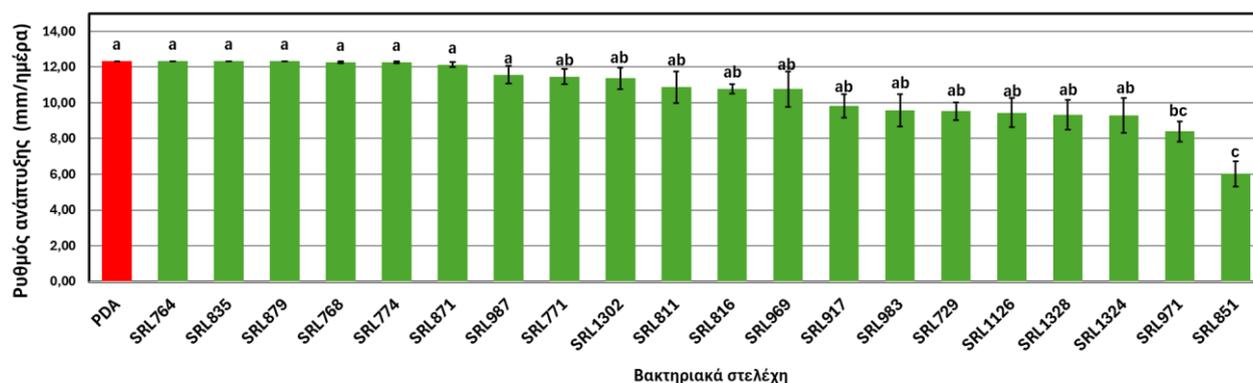
Από τα αποτελέσματα της αξιολόγησης των 20 βακτηριακών στελεχών με δοκιμές πτητικών έναντι του μύκητα *Botrytis cinerea* (B.14.9) καταδεικνύουν ότι 2 βακτηριακά στελέχη προκάλεσαν στατιστικά σημαντική μείωση του ρυθμού ανάπτυξης του μύκητα συγκριτικά με το μάρτυρα. Τα στελέχη αυτά ήταν τα SRL851 και SRL971 (**Εικόνες 4.5.1-32 και 4.5.1-33**). Αναφορικά με το πάχος των υφών, όπως απεικονίζεται στον **Πίνακα 4.5.1-10**, 13 βακτηριακά στελέχη επέφεραν στατιστικά σημαντική μείωση σε σύγκριση με τον μάρτυρα. Τα στελέχη αυτά είναι τα SRL729, SRL771, SRL816, SRL851, SRL917, SRL969, SRL971, SRL987, SRL1126, SRL1302, SRL1324, SRL1328 και SRL983. Επιπροσθέτως, δεν παρατηρήθηκε κάποια στατιστικά σημαντική επίδραση αναφορικά με τον αριθμό των παραγόμενων σκληρωτίων (**Πίνακας 4.5.1-9**). Τέλος, κανένα βακτηριακό στέλεχος δεν επηρέασε στατιστικά σημαντικά τον αριθμό παραγόμενων κονιδίων σύμφωνα με τον **Πίνακα 4.5.1-10**.

Πίνακας 4.5.1-10. Μέσοι όροι και τυπικά σφάλματα (\pm) των μετρήσεων των μυκητολογικών παραμέτρων σε δοκιμές πτητικών που προέκυψαν από την αξιολόγηση της αντιμικροβιακής δράσης των 20 βακτηριακών

στελεχών έναντι του μύκητα *Botrytis cinerea* (απομόνωση B.14.9).

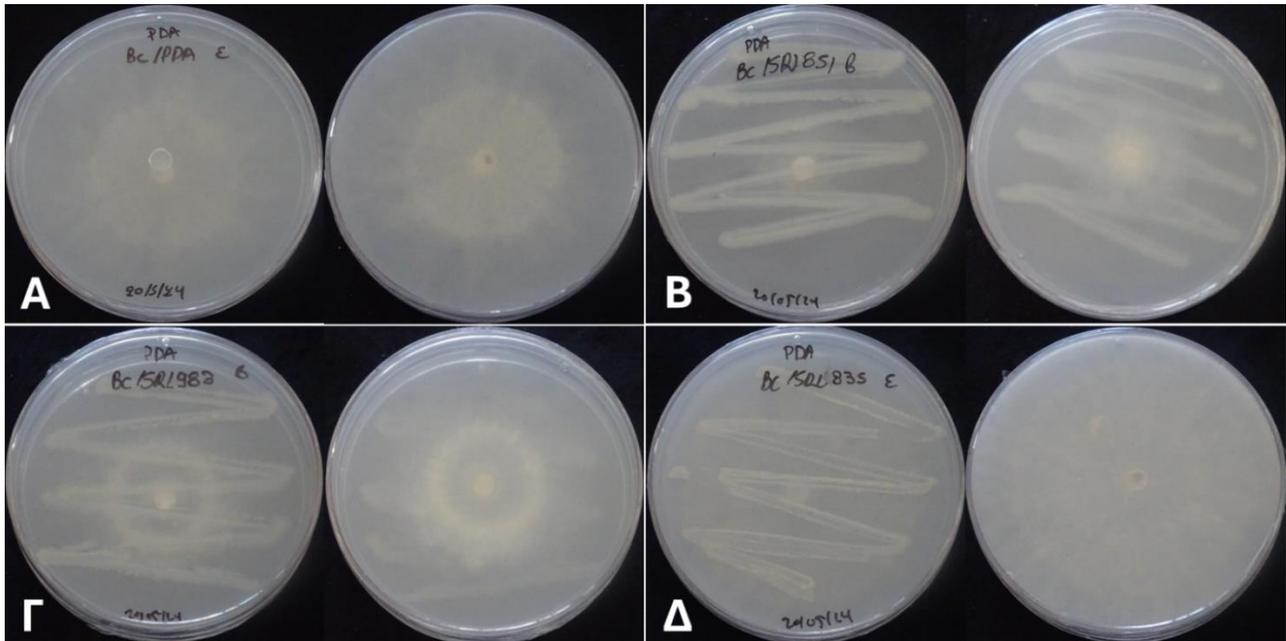
Τύπος βιοδοκιμών	Επέμβαση	Μυκητολογικές παράμετροι			
		Ρυθμός ανάπτυξης (mm/ημέρα)	Αριθμός κονιδίων ($\times 10^5$)/ δισκίο διαμέτρου 5 mm	Πάχος υφών (μm)	Αριθμός σκληροτίων
Δοκιμές πτητικών (Volatile test)	B.c./PDA	12.3±0.0 a	6.2±1.0 a	9.1±0.4 ab	0.0±0.0 a
	B.c./SRL729	9.5±0.5 ab	1.3±0.4 a	5.8±0.3 fgh	0.0±0.0 a
	B.c./SRL764	12.3±0.0 a	2.8±0.9 a	10.0±0.4 a	0.0±0.0 a
	B.c./SRL768	12.3±0.1 a	2.5±0.8 a	8.1±0.4 abcde	0.0±0.0 a
	B.c./SRL771	11.5±0.4 ab	5.8±1.3 a	5.9±0.6 fgh	0.0±0.0 a
	B.c./SRL774	12.3±0.1 a	3.2±1.2 a	7.5±0.4 bcdef	0.0±0.0 a
	B.c./SRL811	10.9±0.9 ab	1.4±0.4 a	8.6±0.3 abcd	0.0±0.0 a
	B.c./SRL816	10.8±0.3 ab	0.0±0.0 a	5.5±0.4 gh	0.0±0.0 a
	B.c./SRL835	12.3±0.0 a	1.6±0.6 a	8.9±0.4 abc	0.0±0.0 a
	B.c./SRL851	6.0±0.7 c	0.8±0.8 a	5.3±0.3 h	0.0±0.0 a
	B.c./SRL871	12.1±0.1 a	2.0±0.6 a	7.3±0.5 bcdefg	0.0±0.0 a
	B.c./SRL879	12.3±0.0 a	0.7±0.3 a	7.5±0.4 bcdef	0.0±0.0 a
	B.c./SRL917	9.8±0.7 ab	1.4±0.5 a	6.1±0.3 fgh	0.0±0.0 a
	B.c./SRL969	10.8±1.0 ab	0.7±0.6 a	6.2±0.3 efgh	0.0±0.0 a
	B.c./SRL971	8.4±0.6 bc	11.6±10.2 a	6.1±0.4 fgh	0.0±0.0 a
	B.c./SRL983	9.6±0.9 ab	0.2±0.1 a	6.9±0.4 cdefgh	0.0±0.0 a
	B.c./SRL987	11.6±0.5 a	3.3±0.9 a	5.7±0.4 fgh	0.0±0.0 a
	B.c./SRL1126	9.4±0.8 ab	0.9±0.4 a	6.8±0.4 defgh	0.0±0.0 a
	B.c./SRL1302	11.4±0.6 ab	0.6±0.2 a	6.5±0.3 efgh	0.0±0.0 a
	B.c./SRL1324	9.3±1.0 ab	0.7±0.5 a	6.0±0.4 fgh	0.0±0.0 a
B.c./SRL1328	9.3±0.8 ab	7.6±1.9 a	5.5±0.3 gh	0.0±0.0 a	

* Εντός των στηλών, οι τιμές οι οποίες ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σύμφωνα με τη δοκιμασία *Tukey HSD* με $P \leq 0.05$.



Εικόνα 4.5.1-32. Ρυθμός μυκηλιακής ανάπτυξης (mm/ημέρα) του μύκητα *Botrytis cinerea* (απομόνωση B.14.9) υπό την επίδραση των 20 βακτηριακών στελεχών σε δοκιμές πτητικών (φθίνουσα κατάταξη). Η κόκκινη στήλη αντιπροσωπεύει τον μάρτυρα ενώ οι πράσινες τις επεμβάσεις με τα βακτηριακά στελέχη που

επέφεραν στατιστικά σημαντική μείωση του ρυθμού ανάπτυξης.



Εικόνα 4.5.1-33. Επίδραση βακτηριακών στελεχών στη μυκηλιακή ανάπτυξη του μύκητα *Botrytis cinerea* (απομόνωση B.14.9) που προέκυψαν κατά διεξοδική αξιολόγηση 20 βακτηριακών στελεχών σε δοκιμές πτητικών. Στην εικόνα απεικονίζονται: **A)** μάρτυρας (Control-), καθώς και η παρεμποδιστική δράση των βακτηριακών στελεχών με κωδικό **B)** SRL851 (Υψηλή παρεμπόδιση στη μυκηλιακή ανάπτυξη) **Γ)** SRL983 (Μέτρια παρεμπόδιση) και **Δ)** SRL835 (Χωρίς παρεμπόδιση).

2.2.7 Μοριακή ταυτοποίηση μικροβιακών απομονώσεων που συλλέχθηκαν από καρπούς μήλων σε συνεργασία με το πρόγραμμα LIFE-PureAgroH2O-(Εργ Δρ Ε. Μαρκέλλου)

Πραγματοποιήθηκε απομόνωση DNA από 20 διαφορετικές μικροβιακές απομονώσεις που είχε στην κατοχή του το Εργ. Μυκητολογίας (ΜΦΙ). Το κάθε απομονωμένο DNA χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα για την ενίσχυση της ITS περιοχής και με τα τρία ζεύγη εκκινητών (D1/D2-NL4, ITS1-ITS4, ITS2-ITS3). Τα καλύτερα προϊόντα ενίσχυσης προετοιμάστηκαν για Sanger Sequencing με χρήση του μηχανήματος SeqStudio™ Genetic Analyzer System with SmartStart (ThermoFisher SCIENTIFIC) που κατέχει το ΜΦΙ. Τα αποτελέσματα της αλληλούχισης παρουσιάζονται στον **Πίνακα 4.5.1-11**.

Πίνακας 4.5.1-11: Ταυτοποίηση γενών και ειδών μικροβιακών απομονώσεων του Εργαστηρίου Μυκητολογίας του ΜΦΙ

Κωδικός	Είδος μικροβιακής απομόνωσης
4.1-12	<i>Candida vartiovaarae</i>
4.1-14	<i>Metschnikowia sp.</i>
4.1-15	<i>Candida oleophila / Yarrowia lipolytica</i>
5.1-1	<i>Candida vartiovaarae / Cyberlindnera sp.</i>

5.1-2	<i>Candida railenensis</i> / <i>Candida oleophila</i>
5.1-4	<i>Candida vartiovaarae</i>
5.1-5	<i>Candida vartiovaarae</i> / <i>Cyberlindnera sp.</i>
5.1-8	<i>Candida vartiovaarae</i>
5.1-10	<i>Candida vartiovaarae</i> / <i>Cyberlindnera sp.</i>
5.1-12	<i>Candida vartiovaarae</i> / <i>Cyberlindnera sp.</i>
4.0-1	<i>Metschnikowia sp.</i>
4.0-3	<i>Metschnikowia sp.</i>
4.0-4	<i>Metschnikowia sp.</i>
4.1-1	<i>Candida vartiovaarae</i> / <i>Cyberlindnera sp.</i>
4.1-3	<i>Candida vartiovaarae</i> / <i>Cyberlindnera sp.</i>
4.1-6	<i>Saccharomyces sp.</i>
4.1-11	<i>Saccharomyces sp.</i>

***In vitro* καλλιέργειες ενδοφυτικών μικροβιακών απομονώσεων του γένους *Kushneria* και ωμοκλήτων του γένους *Phytophthora* σε διαφορετικά θρεπτικά μέσα**

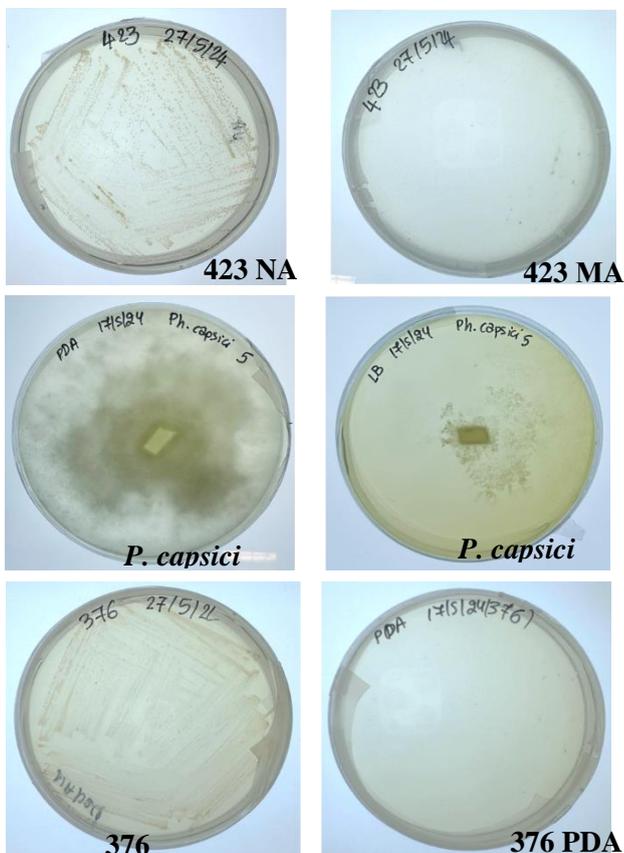
Στον **Πίνακα 4.1.5-12** και στην **Εικόνα 4.5.1.-33** παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των βιοδοκιμών. Παρατηρήθηκε ότι στο σύνολό τους, τα βακτηριακά στελέχη δεν αναπτύσσονταν στα θρεπτικά μέσα MA, PDA και PDA-B (64% του κανονικού σε ποσότητα υποστρώματος ανα λίτρο), στα οποία αναπτύσσονταν ικανοποιητικά τα στελέχη ωμοκλήτων. Αντιθέτως, τα στελέχη ωμοκλήτων δεν αναπτύχθηκαν ικανοποιητικά στο θρεπτικό μέσο LB, το οποίο ευνοούσε την ανάπτυξη των βακτηριακών στελεχών. Το θρεπτικό μέσο στο οποίο παρατηρήθηκε καλή ανάπτυξη τόσο του βιολογικού παράγοντα όσο και του παθογόνου ήταν το NA ενώ στο NA + 1% NaCl το είδος *P. capsici* αναπτυσσόταν καλύτερα.

Πίνακας 4.5.1- 12: Συνοπτική παρουσίαση αξιολόγησης ανάπτυξης βακτηριακών στελεχών του γένους *Kushneria* και στελεχών των ωμοκλήτων *Phytophthora nicotianae* (Pn) και *P. capsici* (Pc) σε πολλαπλά θρεπτικά υποστρώματα ανάπτυξης. Για την αξιολόγηση ανάπτυξης των ωμοκλήτων εκτιμήθηκε η διάμετρος (μ.ο. δύο κατευθύνσεων) της αποικίας. Για τα βακτήρια δηλώνεται η ανάπτυξη με Yes/No.

A/A	Στέλεχος	Θρεπτικό μέσο ανάπτυξης	Αποτέλεσμα ανάπτυξης (cm διάμετρος)
1	Pn Δ3586/7	PDA	8,1
2		PDA-B	7,6
3		NA	1,8

4		NA+1%NaCl	2,7
5		MA	9,0
6		LB	6,0
7	Pn BPIC 1206	PDA	8,1
8		PDA-B	5,4
9		NA	5,0
10		NA+1%NaCl	6,0
11		MA	9,0
12		LB	5,0
13	Pn BPIC 1921	PDA	8,1
14		PDA-B	3,1
15		NA	5,0
16		NA+1%NaCl	5,0
17		MA	9,0
18		LB	5,0
19	Pc BPIC 1934	PDA	4,5
20		PDA-B	3,6
21		NA	6,0
22		NA+1%NaCl	5,0
23		MA	9,0
24		LB	0,9
25	Pc 5	PDA	9,0
26		PDA-B	8,1
27		NA	7,2
28		NA+1%NaCl	6,3
29		MA	9,0
30		LB	5,0
ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ			
31	412	PDA	no
32		PDA-B	no
35		MA	no
36		LB	yes
37	423	PDA	no
38		PDA-B	no
39		NA	yes
40		NA+1%NaCl	yes
41		MA	no
43	426	PDA	no
44		PDA-B	no

45		NA	yes
46		NA+1%NaCl	yes
47		MA	no
49	376	PDA	no
50		PDA-B	no
51		NA	yes
52		NA+1%NaCl	yes
53		MA	no
55	388	PDA	no
56		PDA-B	no
57		NA	yes
58		NA+1%NaCl	yes
59		MA	no



Εικόνα 4.5.1- 33: Ενδεικτικές φωτογραφίες ανάπτυξης στελεχών του γένους *Kushneria* και του ωμόκητα *P. capsici* σε διάφορα στερεά θρεπτικά μέσα. NA: Nutrient Agar, MA: Maize agar, PDA: Potato dextrose agar, LB: Lysogeny Broth

Kushneria* ενάντια σε ωομύκητες του γένους *Phytophthora

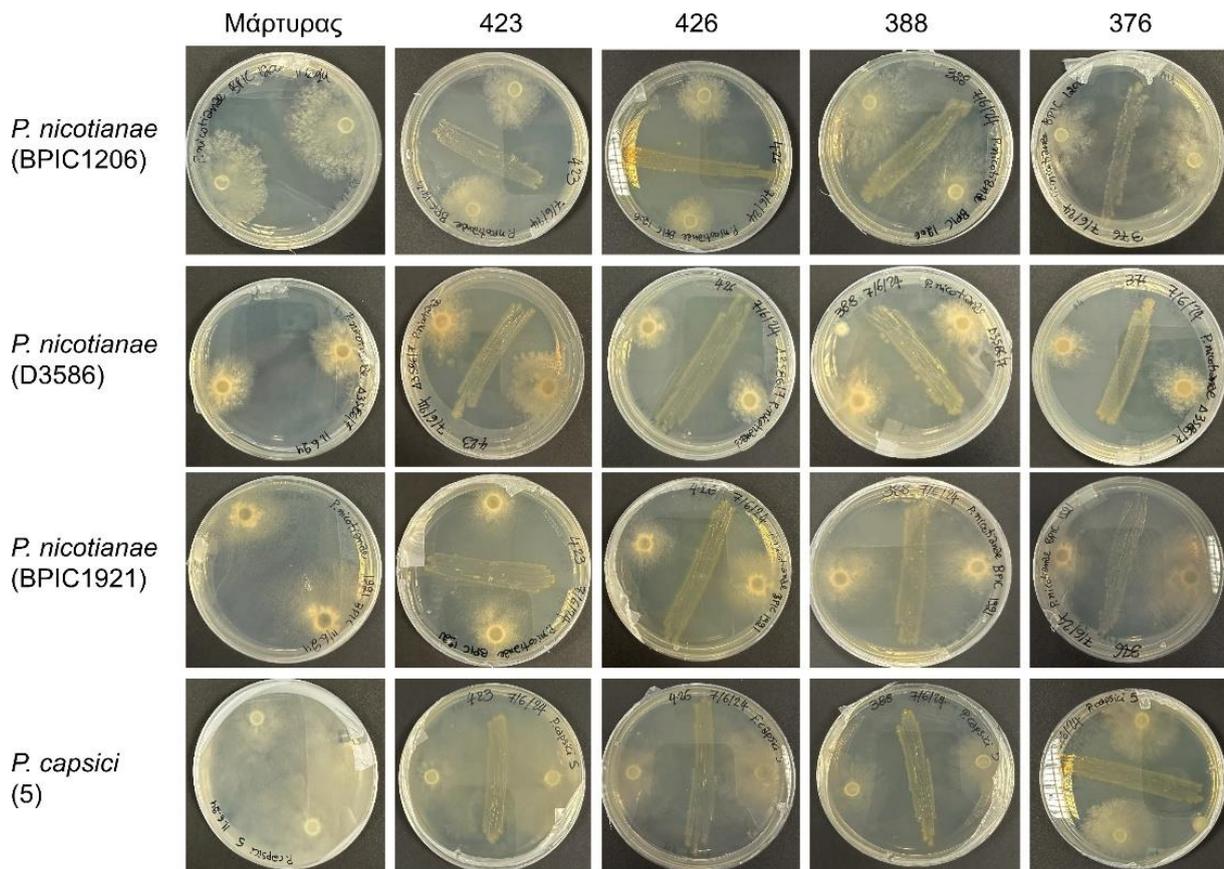
Στην **Εικόνα 4.5.1-34** και στον **Πίνακα 4.5.1-13**, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των δοκιμών. Από τις δοκιμές στα τρία διαφορετικά θρεπτικά μέσα, το NA με 1% NaCl έδωσε τα καλύτερα αποτελέσματα όσον αφορά στην ανάπτυξη τόσο των βακτηριακών στελεχών όσο και των παθογόνων. Τα αποτελέσματα των βιοδοκιμών αντιπαραβολής έδειξαν ότι, το κάθε στέλεχος του γένους *Kushneria*, επηρεάζει διαφορετικά την ανάπτυξη του κάθε στελέχους των ωομυκήτων, ακόμα και εντός του ίδιου είδους. Τη μεγαλύτερη ομοιογένεια στις βιοδοκιμές εμφάνισε το βακτηριακό στέλεχος 423, το οποίο παρουσίασε παρεμπόδιση της ανάπτυξης του μυκηλίου, σε όλα τα στελέχη του γένους *Phytophthora*, μειώνοντας την εξάπλωση των αποικιών του ωομυκήτα, ειδικότερα στις βιοδοκιμές με τα κάτωθι στελέχη και θρεπτικά μέσα ανάπτυξης: Pn1921+NA1%NaCl, Pn1206+LB και Pc5+LB. Το ποσοστό παρεμπόδισης έφτανε έως και 67,5% στο στέλεχος Pn1206. Το βακτηριακό στέλεχος 426 παρουσίασε την μέγιστη παρεμπόδιση στην δοκιμή Pn1206+LB με ποσοστό 57,50%. Το μέγιστο ποσοστό παρεμπόδισης που παρουσίασε το βακτηριακό στέλεχος 388 ήταν στην δοκιμή Pc1934+NA1%NaCl με 42,31%, ενώ στις υπόλοιπες δοκιμές τα ποσοστά κυμάνθηκαν σε χαμηλότερα επίπεδα. Τέλος, το βακτηριακό στέλεχος 376 παρουσίασε υψηλή παρεμπόδιση στην δοκιμή Pn 1206+LB με ποσοστό 62,50%, και ακολούθησαν οι δοκιμές Pc1934+NA1%NaCl και PnΔ3586/7+LB με ποσοστά 46,15% και 43,33%, αντίστοιχα. Επιπλέον, ενδιαφέρον παρουσίασε η σταθερή εικόνα παρεμπόδισης που παρουσίασαν όλα τα βακτηριακά στελέχη έναντι του στελέχους Pn1206 στις δοκιμές με το θρεπτικό μέσο LB. Βάσει των αποτελεσμάτων στο μέλλον θα πρέπει να διερευνηθεί ο τρόπος με τον οποίο τα βακτηριακά στελέχη παρεμπόδιζουν την ανάπτυξη των παθογόνων αυτών ωομυκήτων.

Πίνακας 4.5.1- 13: Η επίδραση των στελεχών *Kushneria* στην ανάπτυξη του μυκηλίου στελεχών δύο ειδών ωομυκήτων και ειδικότερα των *Phytophthora nicotianae* και *P. capsici*.

Ανάπτυξη αποικιών - % συγκριτικά με τον μάρτυρα									
Ημέρες ανάπτυξης	18d					11d			
	Θρεπτικό μέσο					LB			
	NA+1% NaCl		NA			LB			
Στελέχη ωομυκήτα ¹	Pc5	Pc 1934	Pn 1206	Pn 1921	Pn 1921	Pc5	Pn 1921	Pn Δ3586/7	Pn 1206
Στελέχη <i>Kushneria</i>									
423	15,00	11.54	10,00	50,00	6.67	50	30.44	16.67	67.50
426	21.67	0,00	24,00	33.33	26.67	20	0,00	33.33	57.50
388	33.33	42.31	0,00	28.33	11.11	-	0,00	10,00	-
376	25,00	46.15	20,00	25,00	11.11	10	0,00	43.33	62.50

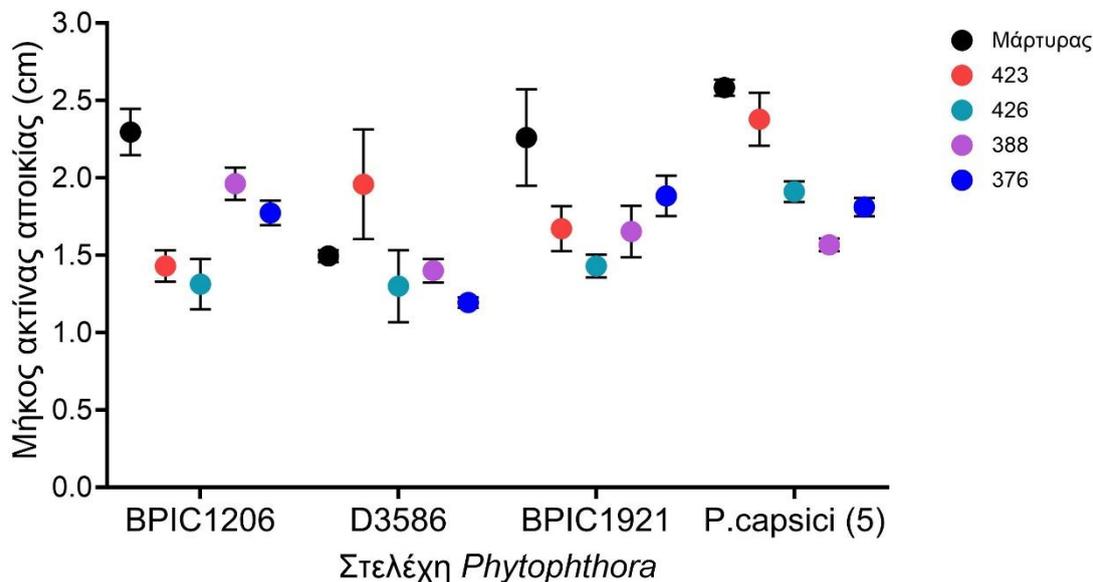
Σημείωση:

1. Pc= *P. capsici*, Pn= *P. nicotianae*. Οι αριθμοί δηλώνουν στελέχη.
2. Στις βιοδοκιμές με τα στελέχη Pc 5+NA, Pc 1934+NA, και Pn 1206+NA, δεν παρατηρήθηκε παρεμπόδιση ανάπτυξης των ωομυκήτων.
3. Στις βιοδοκιμές με τα στελέχη Pc 1934+LB, Pn Δ3586/7+NA+1% NaCl και Pn Δ3586/7+NA δεν αναπτύχθηκαν στα υποστρώματα οι ωομυκήτες.



Εικόνα 4.5.1-34: Δοκιμές αντιπαραβολής βακτηριακών στελεχών του γένους *Kushneria* έναντι στελεχών που ανήκουν σε δύο είδη του γένους *Phytophthora* σε διάφορα θρεπτικά μέσα.

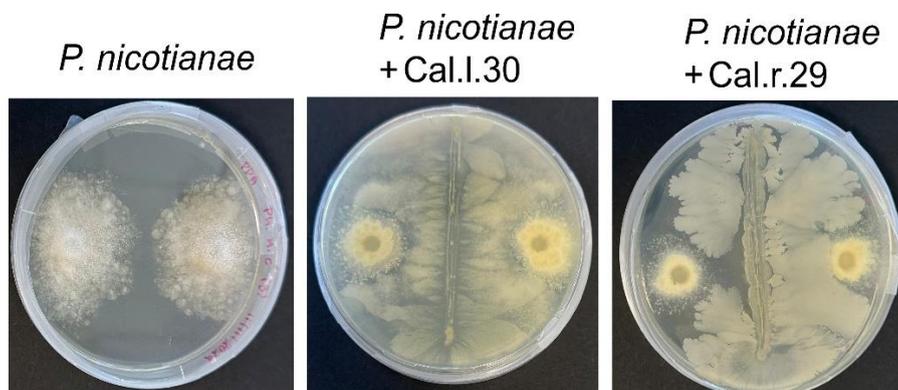
Δοκιμή αντιπαραβολής



Γράφημα 4.5.1- 1: Αποτελέσματα δοκιμής αντιπαραβολής μικροβιακών απομονώσεων του γένους *Kushneria* με τρία διαφορετικά στελέχη του ωμούκητα *Phytophthora nicotianae* και ένα στέλεχος του ωμούκητα *Phytophthora capsici*. Χρησιμοποιήθηκαν δύο τεχνικές επαναλήψεις για κάθε δοκιμή αντιπαραβολής.

In vitro* βιοδοκιμές αντιπαραβολής μικροβιακών απομονώσεων των γενών *Bacillus*, *Kushneria* και του στελέχους ζυμομούκητα 248 ενάντια στον ωμούκητα *Phytophthora nicotianae

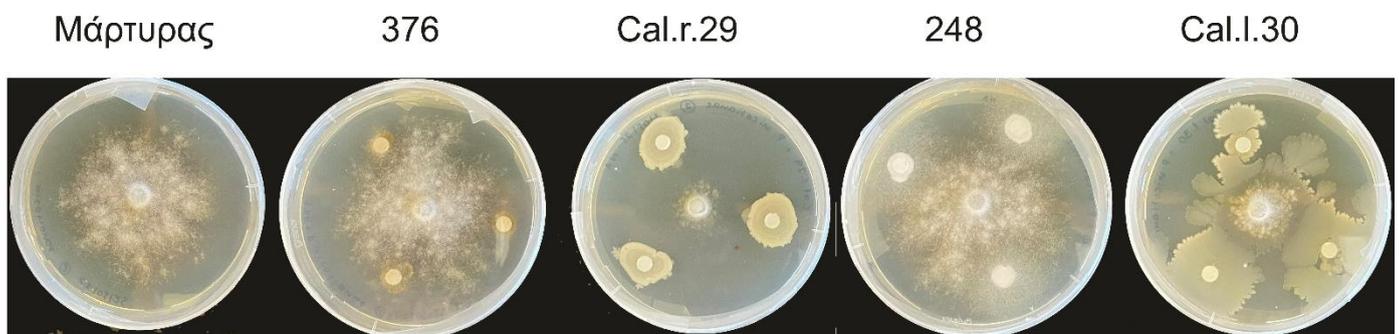
Ενδεικτικά αποτελέσματα των βιοδοκιμών παρουσιάζονται στην **Εικόνας 4.5.1-35** και **-5**. Στην **Εικόνα 5.4.1-35** φαίνεται χαρακτηριστικά η κατάληψη της επιφανείας των τρυβλίων από τα βακτηριακά στελέχη *Bacillus* Cal.l.30 και Cal.r.29 και η σημαντική μείωση της ανάπτυξης του ωμούκητα σε θρεπτικό υπόστρωμα PDA.



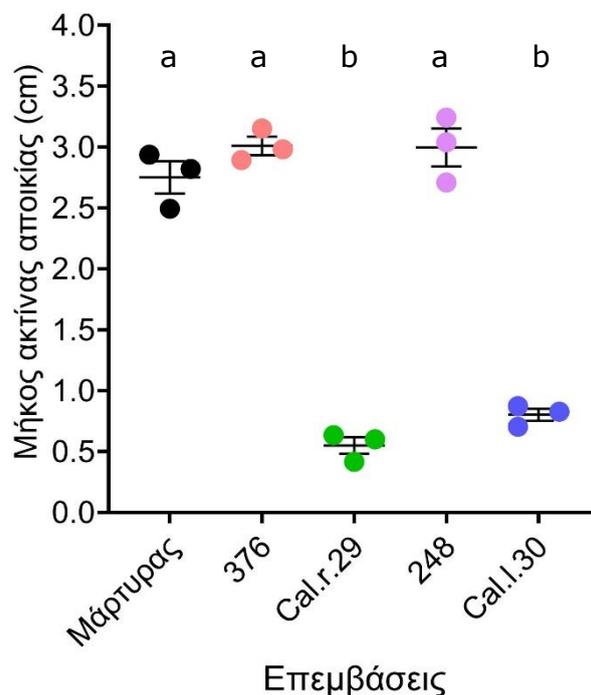
Εικόνα 4.5.1- 35: Ενδεικτικές φωτογραφίες βιοδοκιμών αντιπαραβολής δύο στελεχών

του γένους *Bacillus* ενάντια στον ωομύκητα *P. nicotianae* (στέλεχος ΒΡΥΑ) σε PDA.

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκαν δοκιμές αντιπαραβολής με ένα στέλεχος του γένους *Kushneria* (κωδικός 376) και με το στέλεχος ζυμομύκητα 248. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην **Εικόνα 4.5.1-36**. Στη συγκεκριμένη δοκιμή πραγματοποιήθηκε αλλαγή του θρεπτικού υποστρώματος σε NA για να μπορεί να αναπτυχθεί το στέλεχος 376 και υπάρχει σύγκριση μεταξύ των μικροβιακών απομονώσεων. Τα αποτελέσματα έδειξαν επανάληψη της σημαντικής ανασταλτικής δράσης των στελεχών Cal.l.30 και Cal.r.29 του γένους *Bacillus* στην ανάπτυξη του παθογόνου, ενώ τα στελέχη μικροβιακών απομονώσεων 376 και 248 φαίνεται να μην έχουν καμία επίδραση στην ανάπτυξη του παθογόνου.



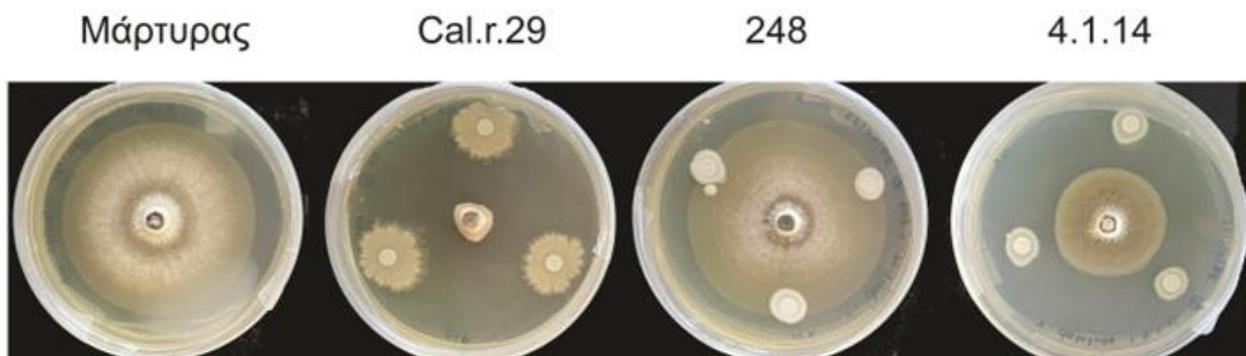
Εικόνα 4.5.1- 37: Ενδεικτικές φωτογραφίες βιοδοκιμών αντιπαραβολής μικροβιακών απομονώσεων των γενών *Bacillus*, *Kushneria* και του στελέχους 248 ενάντια στον ωομύκητα *Phytophthora nicotianae* (στέλεχος ΒΡΥΑ) σε NA, 10 μέρες μετά τη μεταφορά των μικροοργανισμών στο τρυβλίο.



Γράφημα 4.5.1- 2: Αποτελέσματα δοκιμής αντιπαραβολής μικροβιακών απομονώσεων του γένους *Kushneria* (στέλεχος 376), του στελέχους 248 και δύο στελεχών του γένους *Bacillus* (Cal.r.29, Cal.l.30) με τον ωμομύκητα *Phytophthora nicotianae* (κωδικός ΒΡΥΑ). Χρησιμοποιήθηκαν τρεις τεχνικές επαναλήψεις για κάθε δοκιμή αντιπαραβολής.

In vitro* βιοδοκιμές αντιπαραβολής μικροβιακών απομονώσεων των γενών *Bacillus*, *Metschnikowia* και του στελέχους ζυμομύκητα 248 ενάντια στον μύκητα *Verticillium dahliae

Ενδεικτικά αποτελέσματα των βιοδοκιμών αντιπαραβολής μικροβιακών απομονώσεων των γενών *Bacillus*, *Metschnikowia* και του στελέχους 248 ενάντια στον μύκητα *Verticillium dahliae* παρουσιάζονται στην **Εικόνα 4.5.1-38**. Στην **Εικόνα 4.5.1-38** φαίνεται χαρακτηριστικά η κατασταλτική δράση στην ανάπτυξη του παθογόνου από το βακτηριακό στέλεχος *Bacillus* Cal.r.29 και η σημαντική μείωση της ανάπτυξης του παθογόνου από το στέλεχος 4.1.14 του γένους *Metschnikowia* σε θρεπτικό υπόστρωμα ΝΑ. Αντίθετα, η βιοδοκιμή αντιπαραβολής μεταξύ του παθογόνου και του στελέχους 248 δείχνει ότι το στέλεχος 248 δεν έχει επίδραση στην ανάπτυξη του μύκητα.



Εικόνα 4.5.1-38: Ενδεικτικές φωτογραφίες βιοδοκιμών αντιπαραβολής μικροβιακών απομονώσεων των γενών *Bacillus* (Cal.r.29), *Metschnikowia* (4.1.14) και του στελέχους 248 ενάντια στον μύκητα *Verticillium dahliae* σε θρεπτικό υπόστρωμα ΝΑ, 25 μέρες μετά τη μεταφορά των μικροοργανισμών στο τρυβλίο.

***In vitro* βιοδοκιμές συμβατότητας μικροβιακών απομονώσεων του γένους *Bacillus* με το στέλεχος ζυμομύκητα 248**

Λαμβάνοντας υπόψιν αποτελέσματα από άλλες δράσεις του προγράμματος (4.5.2) όπου οι μικροβιακές απομονώσεις του γένους *Bacillus* Cal.l.30 και Cal.r.29 και το στέλεχος 248 έδειξαν αξιόλογα αποτελέσματα ενάντια σε φυτοπαθογόνους μύκητες, θελήσαμε να μελετήσουμε τη συμβατότητα των στελεχών για πιθανή συνδυασμένη εφαρμογή. Τα

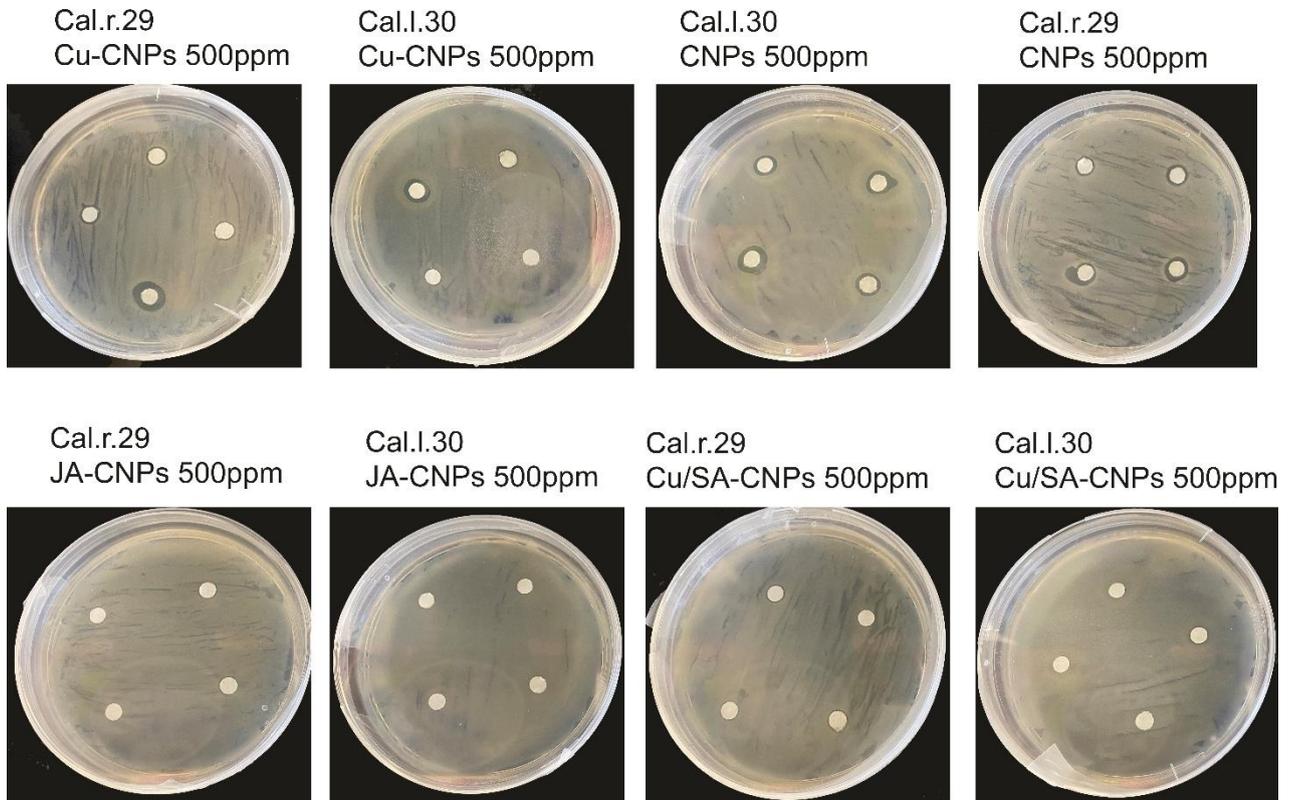
αποτελέσματα της δοκιμής συμβατότητας παρουσιάζονται στην **Εικόνα 4.5.1- 39**, στην οποία φαίνεται να έχουν κανονική ανάπτυξη τα στελέχη στους αναφερόμενους συνδυασμούς.



Εικόνα 4.5.1-39: Ενδεικτικές φωτογραφίες βιοδοκιμών συμβατότητας μικροβιακών απομονώσεων των γενών *Bacillus* (Cal.r.29, Cal.l.30), *Metschnikowia* (4.1.14) και του στελέχους ζυμομύκητα 248 σε θρεπτικό υπόστρωμα NA, 3 μέρες μετά τη μεταφορά των μικροοργανισμών στο τρυβλίο.

***In vitro* βιοδοκιμές συμβατότητας μικροβιακών απομονώσεων του γένους *Bacillus* με σκευάσματα νανοσωματιδίων χιτοζάνης**

Για να ελέγξουμε αν οι μικροβιακές απομονώσεις του γένους *Bacillus* Cal.l.30 και Cal.r.29, που παρήγαγαν σημαντικά αποτελέσματα σύμφωνα με άλλες εργασίες του προγράμματος (Παραδοτέο 4.5.2), μπορούν να συνδυαστούν με άλλα καινοτόμα σκευάσματα αντιμετώπισης φυτοπαθογόνων μυκήτων, όπως τα νανοσωματίδια χιτοζάνης που αξιολογήθηκαν στην Ενότητα Εργασίας 3, πραγματοποιήθηκαν βιοδοκιμές συμβατότητας. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην **Εικόνα 4.5.1-40**.



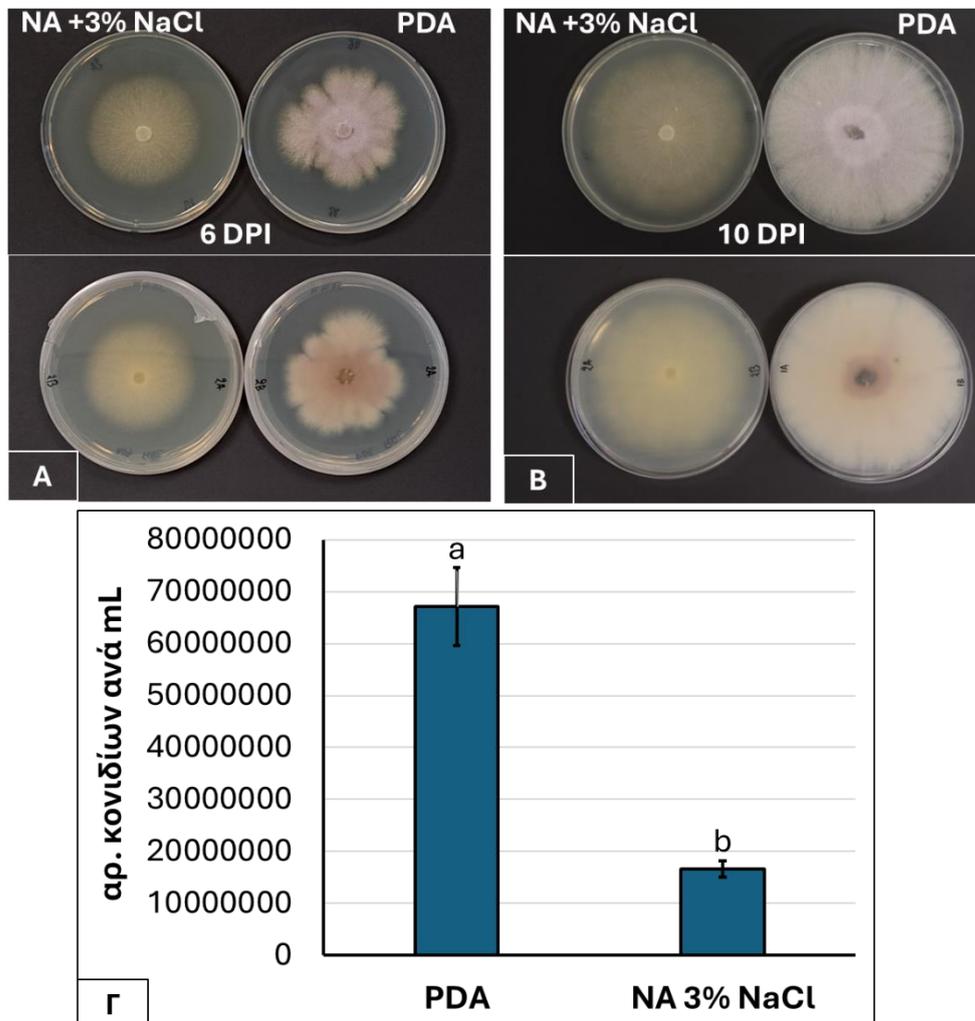
Εικόνα 4.5.1- 40: Ενδεικτικές φωτογραφίες βιοδοκιμών συμβατότητας μικροβιακών απομονώσεων των γενών *Bacillus* (Cal.r.29, Cal.l.30) και τριών σκευασμάτων νανοσωματιδίων χιτοζάνης σε θρεπτικό υπόστρωμα NA, 2 μέρες μετά τη μεταφορά των μικροοργανισμών στο τρυβλίο.

Τα αποτελέσματα των βιοδοκιμών συμβατότητας έδειξαν ότι η παρουσία νανοσωματιδίων χιτοζάνης ελεύθερα (CNP) ή που περιείχαν συζευγμένο χαλκό (Cu-CNP) δημιούργησαν ζώνη παρεμπόδισης στα στελέχη Cal.l.30 και Cal.r.29 στο σημείο επαφής (**Εικόνα 4.5.1- 40**). Αντίθετα, η παρουσία νανοσωματιδίων χιτοζάνης που περιείχαν συζευγμένο ιασημονικό οξύ (JA-CNP) ή που περιείχαν συζευγμένο συνδυασμό χαλκό και σαλικυλικού οξέος (Cu/SA-CNP) δεν φάνηκε να επηρεάζουν αρνητικά την ανάπτυξη των στελεχών στο σημείο επαφής.

In vitro* βιοδοκιμές αντιπαραβολής στελεχών του γένους *Kushneria* ενάντια του μύκητα *Fusarium oxysporum f. sp. radicis lycopersici

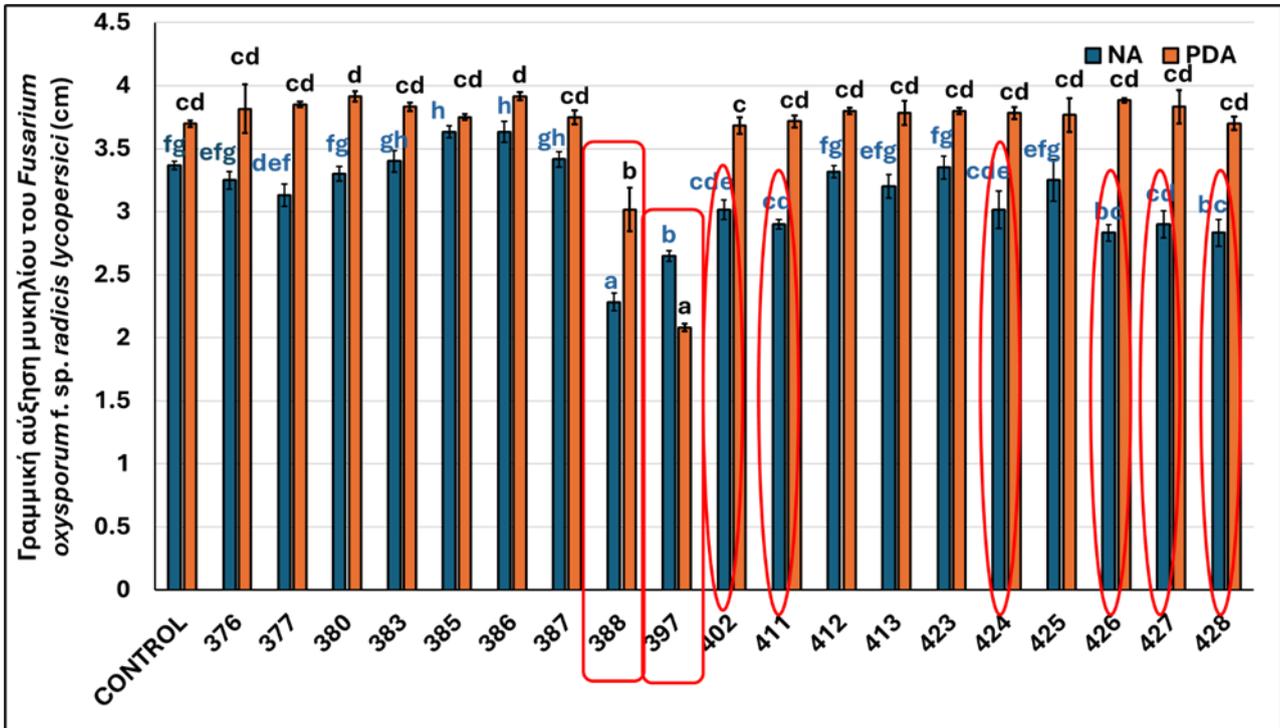
Στο NA με 3% NaCl (w/v), η ανάπτυξη των βακτηριακών στελεχών ήταν έντονη, εμφανίζοντας τον χαρακτηριστικό πορτοκαλί φαινότυπο. Η γραμμική αύξηση του μυκηλίου του *FORL* δεν επηρεάστηκε σημαντικά, σε αντίθεση με την παραγωγή κονιδίων, η οποία μειώθηκε η οποία μειώθηκε σημαντικά κατά περίπου 5×10^7 κονίδια /mL στο NA με 3% NaCl (w/v) (**Εικόνα 4.5.1-41**). Στο PDA, η ανάπτυξη των

ενδοφυτικών απομονώσεων ήταν περιορισμένη, ενώ η ανάπτυξη του μύκητα ήταν έντονη (**Εικόνα 4.5.1-9 και Γράφημα 4.5.1-3**).



Εικόνα 4.5.1- 41 και Γράφημα 4.5.1- 3: Ανάπτυξη του μύκητα *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* (FORL) σε Nutrient Agar (NA) και Potato Dextrose Agar (PDA). Η γραμμική αύξηση του μυκηλίου δεν επηρεάζεται σημαντικά (Α) έξι και (Β) δέκα μέρες μετά τον εμβολιασμό των τριβλίων (days post inoculation-dpi), ενώ (Γ) η παραγωγή κωνιδίων μειώνεται σημαντικά κατά περίπου 5×10^7 κωνίδια /mL στο NA με 3% NaCl (w/v).

Η μυκηλιακή ανάπτυξη του FORL μειώθηκε παρουσία των βακτηριακών στελεχών 388 και 397 στα δύο θρεπτικά υλικά (NA και PDA), ενώ στο NA παρατηρήθηκε μείωση της ανάπτυξης και παρουσία των απομονώσεων 424, 426, 427 και 428 (**Γράφημα 4.5.1-4**). Η παρατηρούμενη *in vitro* αναστολή υποδηλώνει παρεμποδιστική δράση μέσω πιθανής παραγωγής βιοδραστικών ενώσεων. Στα *in planta* πειράματα, η επίδραση ήταν ακόμη πιο αξιοσημείωτη, υποδεικνύοντας ότι τα βακτηριακά στελέχη δρουν ως διεγερτές της άμυνας του φυτού, ενισχύοντας τους φυσικούς αμυντικούς μηχανισμούς του ξενιστή και περιορίζοντας την ανάπτυξη και εξάπλωση του FORL.



Γράφημα 4.5.1- 4: Επίδραση των βακτηριακών στελεχών στην μυκηλιακή ανάπτυξη του μύκητα *Fusarium oxysporum f. sp. radicis lycopersici* σε Nutrient Agar (NA) (μπλέ στήλες) και Potato Dextrose Agar (PDA) (πορτοκαλί στήλες) σε in vitro δοκιμή αντιπαραβολής στις 10 μέρες μετά τον εμβολιασμό των τριβλίων. Οι κάθετες γραμμές πάνω στις στήλες αντιπροσωπεύουν το τυπικό σφάλμα, ενώ στήλες με διαφορετικά γράμματα διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σύμφωνα με το Fisher's LSD multiple range test ($P \leq 0,05$).

3 ΣΥΝΟΨΗ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Σε *in vitro* δοκιμές αξιολογήθηκαν 91 βακτηριακές απομονώσεις από διάφορα βακτηριακά γένη και Φύλα έναντι των φυτοπαθογόνων *C. michiganensis*, *Ralstonia solanacearum*, *Paracidovorax (Acidovorax) citrulli* και *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. Πέντε απομονώσεις των γενών *Brevibacillus* spp. και *Pseudomonas* sp. (SRL1302, SRL987, SRL917, SRL764, SRL689) ανέστειλαν την ανάπτυξη και των τεσσάρων παθογόνων. Συνολικά, 21 απομονώσεις ανέστειλαν το *X. campestris*, 17 το *P. citrulli*, 11 τη *R. solanacearum* και 19 τη *C. michiganensis*, με το στελέχος SRL769 να εμφανίζει τη μεγαλύτερη συνολική ανασταλτική δράση. Επιπλέον, σε 78 απομονώσεις που αξιολογήθηκαν με δύο μεθόδους παρεμπόδισης, τα στελέχη GL2, GL4, GL5, GL32, GL40, SRL768, SRL769 και SRL1302 επέδειξαν ισχυρή ανασταλτική δράση έναντι της *C. michiganensis*, ενώ μόνο τα στελέχη GL5, SRL987, SRL879 και SRL981 είχαν παρεμποδιστική δράση έναντι του *A. citrulli*.

Ενδοφυτικές απομονώσεις *Bacillus* επέδειξαν έντονη ανασταλτική δράση έναντι μυκήτων και ωομυκήτων (*Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum*, *Verticillium dahliae*, *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*, *Phytophthora nicotianae*), μέσω άμεσου ανταγωνισμού και παραγωγής αντιμικροβιακών μεταβολιτών. Από 31 στελέχη έναντι *V. dahliae*, 27 μείωσαν τον ρυθμό ανάπτυξης, 15 το πάχος υφών, 8 το εμβαδόν μικροσκληρωτίων και 6 τον αριθμό κονιδίων. Από 17 στελέχη έναντι *F. oxysporum*, 13 μείωσαν τον ρυθμό ανάπτυξης και 6 το πάχος υφών, ενώ στις δοκιμές πτητικών 5 μείωσαν τον ρυθμό ανάπτυξης, 8 το πάχος υφών και 5 τον αριθμό κονιδίων. Από 20 στελέχη έναντι *B. cinerea*, όλα μείωσαν τον ρυθμό ανάπτυξης, 6 το πάχος υφών, 1 τον αριθμό σκληρωτίων και 6 τον αριθμό κονιδίων. Στα στελέχη *Kushneria* παρατηρήθηκε παραλλακτικότητα ως προς την αποτελεσματικότητα έναντι *P. nicotianae* και *F. oxysporum* f. sp. *radicis lycopersici*, ενώ τα ζυμομύκητα δεν εμφάνισαν ανασταλτική δράση.

Τα πλέον αποτελεσματικά μικροβιακά στελέχη αξιολογήθηκαν σε *in planta* βιοδοκιμές (Π.4.5.2) για επιβεβαίωση της *in vivo* δράσης τους, ενώ μπορούν να συνδυαστούν μεταξύ τους ή με νέας γενιάς σκευάσματα, όπως νανοσκευάσματα χιτοζάνης συζευγμένης με σαλικυλικό ή γιασμονικό οξύ, προσφέροντας βιώσιμη και πολυμορφική στρατηγική φυτοπροστασίας.

4 ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι

Βιβλιογραφικές Αναφορές

Chaurasia, B., Pandey, A., Palni, L. M. S., Trivedi, P., Kumar, B., and Colvin, N. (2005). Diffusible and volatile compounds produced by an antagonistic *Bacillus subtilis* strain cause structural deformations in pathogenic fungi *in vitro*. *Microbiological Research*, 160, 75–81.

Christakis, C. A., Daskalogiannis, G., Chatzaki, A., Markakis, E. A., Mermigka, G., Sagia, A., Rizzo, G. F., Catara, V., Lagkouvardos, I., Studholme, D. J., & Sarris, P. F. (2021). Endophytic bacterial isolates from halophytes demonstrate phytopathogen biocontrol and plant growth promotion under high salinity. *Frontiers in Microbiology*, 1001.

Katinakis, P. (2023). Compatible Consortium of Endophytic *Bacillus halotolerans* Strains Cal.l.30 and Cal.f.4 Promotes Plant Growth and Induces Systemic Resistance against *Botrytis cinerea*. *Biology (Basel)*. 27;12(6):779. doi: 10.3390/biology12060779.

Lahlali, R., Bajii, M., and Jijakli, M. H. (2007). Isolation and evaluation of bacteria and fungi as biological control agents against *Rhizoctonia solani*. *Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences*72, 973–982.

Ligoxigakis, E.K., Markakis, E.A. 2012. Incidence and pathogenicity of races and isolates of *Verticillium dahliae* in Crete, southern Greece. *Phytoparasitica* 40:493-506.

Malandrakis, A. A., Krasagakis, N., Kavroulakis, N., Ilias, A., Tsagkarakou, A., Vontas, J., & Markakis, E. (2022). Fungicide resistance frequencies of *Botrytis cinerea* greenhouse isolates and molecular detection of a novel SDHI resistance mutation. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 183, 105058.

Margaritopoulou, M., Nastos, S., Kotsaridis, K., Maratos, M., Fotopoulou, E., Tsalgatiidou, P.C., Venieraki, A., Markellou, E. (2026). Biocontrol potential of *Bacillus halotolerans* Cal.l.30 and *Bacillus velezensis* Cal.r.29 against cucumber powdery mildew. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 141, 102994. doi.org/10.1016/j.pmp.2025.102994.

Markakis, E.A., Fountoulakis, M.S., Daskalakis, G.C., Kokkinis, M., Ligoxigakis, E.K. 2016. The suppressive effect of compost amendments on *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-cucumerinum* in cucumber and *Verticillium dahliae* in eggplant. *Crop Protection* 79:70-79.

Markakis, E.A., Krasagakis, N., Tzortzakakis, E.A., Tsaniklidis, G., Lagogianni, C.S., Ligoxigakis, E.K., Pardavella, I.V., Goumas, D.E. 2021. Investigation of interactions between *Meloidogyne javanica* and three soil-borne fungi against susceptible plant

hosts. *Journal of Phytopathology* 169:98-111.

Pavlou, G.C., Vakalounakis, D.J., Ligoixigakis, E.K. (2002). Control of root and stem rot of cucumber, caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum*, by grafting onto resis-tant rootstocks. *Plant Dis.* 86:379-382

Pavlou, G.C., Vakalounakis, D.J. (2005). Biological control of root and stem rot of greenhouse cucumber, caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum*, by lettuce soil amendment. *Crop Protection*, 24(2), 135–140.
<https://doi.org/10.1016/J.CROPRO.2004.07.003>.

Song, J, Win, J., Tian, M., Schornack, S., Kaschani, F., Ilyas, M., Van der Hoorn, R.A.L., Kamoun, S. 2009. Apoplastic effectors secreted by two unrelated eukaryotic plant pathogens target the tomato defense protease Rcr3. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*106, 1654–1659.

Tsalgatidou, PC., Thomludi, EE., Baira, E., Papadimitriou, K., Skagia, A., Venieraki, A., Katinakis, P. (2022). Integrated Genomic and Metabolomic Analysis Illuminates Key Secreted Metabolites Produced by the Novel Endophyte *Bacillus halotolerans* Cal.l.30 Involved in Diverse Biological Control Activities. *Microorganisms*. 9;10(2):399. doi: 10.3390/microorganisms10020399

Tsalgatidou, PC., Thomludi, EE., Nifakos, K., Delis, C., Venieraki, A., Katinakis, P. (2023). *Calendula officinalis*-A Great Source of Plant Growth Promoting Endophytic Bacteria (PGPEB) and Biological Control Agents (BCA). *Microorganisms*. 13;11(1):206. doi: 10.3390/microorganisms11010206

Tsalgatidou, PC., Thomludi, EE., Delis, C., Nifakos, K., Zambounis, A., Venieraki, A., Katinakis, P. (2023). Compatible Consortium of Endophytic *Bacillus halotolerans* Strains Cal.l.30 and Cal.f.4 Promotes Plant Growth and Induces Systemic Resistance against *Botrytis cinerea*. *Biology (Basel)*. 27;12(6):779. doi: 10.3390/biology12060779.

P.C. Tsalgatidou, E.-E. Thomludi, E. Baira, K. Papadimitriou, A. Skagia, A. Venieraki, P. Katinakis, Integrated genomic and metabolomic analysis illuminates key secreted metabolites produced by the novel endophyte *Bacillus halotolerans* Cal. l. 30 involved in diverse biological control activities, *Microorganisms* 10(2) (2022) 399.

P.C. Tsalgatidou, E.-E. Thomludi, K. Nifakos, C. Delis, A. Venieraki, P. Katinakis, *Calendula officinalis*—a great source of plant growth promoting endophytic bacteria (PGPEB) and biological control agents (BCA), *Microorganisms* 11(1) (2023) 206.

L. Zhu, J. Huang, X. Lu, C. Zhou, Development of plant systemic resistance by beneficial rhizobacteria: Recognition, initiation, elicitation and regulation, *Frontiers in Plant Science* 13 (2022) 952397.

S.K. Goswami, V. Singh, H. Chakdar, P. Choudhary, Harmful effects of fungicides- Current status, *International Journal of Agriculture, Environment and Biotechnology* 11(779) (2018) 1011-1019.

D. Fernández-Ortuño, J.A. Torés, A. De Vicente, A. Pérez-García, Mechanisms of resistance to QoI fungicides in phytopathogenic fungi, *International Microbiology* 11(1) (2008) 1.

M. Ongena, P. Jacques, Bacillus lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol, *Trends in microbiology* 16(3) (2008) 115-125.

R.A. Butcher, F.C. Schroeder, M.A. Fischbach, P.D. Straight, R. Kolter, C.T. Walsh, J. Clardy, The identification of bacillaene, the product of the PksX megacomplex in *Bacillus subtilis*, *Proceedings of the national academy of sciences* 104(5) (2007) 1506-1509.

J.J. May, T.M. Wendrich, M.A. Marahiel, The *dhb* operon of *Bacillus subtilis* encodes the biosynthetic template for the catecholic siderophore 2, 3-dihydroxybenzoate-glycine-threonine trimeric ester bacillibactin, *Journal of Biological Chemistry* 276(10) (2001) 7209-7217.

E.-E. Thomludi, P.C. Tsalgatidou, E. Baira, K. Papadimitriou, A. Venieraki, P. Katinakis, Genomic and metabolomic insights into secondary metabolites of the novel *Bacillus halotolerans* Hil4, an endophyte with promising antagonistic activity against gray mold and plant growth promoting potential, *Microorganisms* 9(12) (2021) 2508.

H.B. Slama, H. Cherif-Silini, A. Chenari Bouket, M. Qader, A. Silini, B. Yahiaoui, F.N. Alenezi, L. Luptakova, M.A. Triki, A. Vallat, Screening for *Fusarium* antagonistic bacteria from contrasting niches designated the endophyte *Bacillus halotolerans* as plant warden against *Fusarium*, *Frontiers in Microbiology* 9 (2019) 3236.

5 Παράρτημα ΙΙ

Πίνακας 4.5.1-2. Νουκλεοτιδική αλληλουχία του ζεύγους των εκκινητών 27f/1492r, που χρησιμοποιήθηκαν για την αλληλούχιση του 16s rDNA των ενδοφυτικών βακτηριακών απομονώσεων.

Εκκινητές	Αλληλουχία (5'→3')
27f	CGAGAGTTTGATCCTGGCTCAG
1492r	CGCGGGTTACCTTGTTACGACTT