



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

### Παραδοτέο Π.4.5.2: Αποτελέσματα *in vivo* - *in planta* βιοδοκιμών ενδοφυτικών μικροβιακών απομονώσεων ενάντια σε μύκητες, ωομύκητες και βακτήρια

#### Πληροφορίες για το έγγραφο

Αριθμός παραδοτέου: Π.4.5.2

Ενότητα εργασίας: ΕΕ4

Επικεφαλής δικαιούχος: [ΙΤΕ]

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

Έκδοση: 1

Είδος Παραδοτέου: [Έκθεση]

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 (EN): 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	ΤΙΤΛΟΣ..... ΣΦΑΛΜΑ! ΔΕΝ ΕΧΕΙ ΟΡΙΣΤΕΙ ΣΕΛΙΔΟΔΕΙΚΤΗΣ.	
2.2	ΤΙΤΛΟΣ..... ΣΦΑΛΜΑ! ΔΕΝ ΕΧΕΙ ΟΡΙΣΤΕΙ ΣΕΛΙΔΟΔΕΙΚΤΗΣ.	
3	ΣΥΝΟΨΗ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ .....	88
4	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ .....	89

## 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 ουσιών 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 4.5.2

Σκοπός του παραδοτέου Π4.5.2 είναι να μελετηθούν και να αξιολογηθούν ένα εύρος ενδοφυτικών μικροβίων ως προς την *in vivo / in planta* 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). Η χρήση των βιολογικών παραγόντων ως εναλλακτικά «σκευάσματα» των χημικών σκευασμάτων είναι επιτακτική. Επομένως, είναι απαραίτητη η μελέτη και η αξιολόγηση ενός εύρους βιολογικών απομονώσεων ενάντια σε διάφορα παθοσυστήματα, με σκοπό να βρεθούν και να καταγραφούν οι ευεργετικές επιδράσεις τους στη μείωση των ασθενειών. Τέλος, τα ενδοφυτικά μικρόβια έχουν ένα πλεονέκτημα, καθώς έχουν ήδη προσαρμοστεί στο περιβάλλον του φυτού από το οποίο έχουν προκύψει. Παρόλα αυτά, είναι επιτακτική η μελέτη και η αξιολόγησή τους και εκτός του φυτού – ξενιστή και σε άλλα φυτικά είδη, καθώς το μικροβίωμα του κάθε φυτού, το μικροβίωμα του εδάφους και περιβαλλοντικές συνθήκες είναι αυτές που θα κρίνουν τελικά το αποτέλεσμα ενάντια στα φυτοπαθογόνα.

### **Σκοπός του παρόντος εγγράφου**

Στην παρούσα υποενότητα εργασίας 4.5.2 μελετήθηκαν και αξιολογήθηκαν ένα εύρος από ενδοφυτικές βιολογικές απομονώσεις ενάντια σε φυτοπαθογόνα βακτήρια και φυτοπαθογόνους μύκητες/ωομύκητες και σε διαφορετικά παθοσυστήματα.

### **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 Προετοιμασία και επιλογή μικροβιακών στελεχών για τις *in vivo* – *in planta* βιοδοκιμές ενάντια σε μύκητες, ωομύκητες και βακτήρια (Εργ. Καθ. Π. Σαρρή)

Για την αξιολόγηση των ενδοφυτικών βακτηριακών απομονώσεων ενάντια σε φυτοπαθογόνα βακτήρια και φυτοπαθογόνους μύκητες και ωομύκητες, σε *in planta* βιοδοκιμές, επιλέχθηκαν συγκεκριμένες βακτηριακές απομονώσεις (**Πίνακας 4.5.2-1**), στηριζόμενοι στα *in vitro* αποτελέσματα (βλ. Π4.5.1). Οι βιοδοκιμές αυτές διεξήχθησαν στο εργαστήριο «Βιοτεχνολογικών Εφαρμογών και Φυτοπροστασίας» του Καθ. Δ. Γκούμα στο Τμήμα Γεωπονίας (ΕΛΜΕΠΑ), στο εργαστήριο Μυκητολογίας του Ινστιτούτου Τροπικών, Ελιάς και Αμπέλου (ΕΛΓΟ-ΔΗΜΗΤΡΑ) του Καθ. Ε. Μαρκάκη και στο εργαστήριο Μυκητολογίας του Μπενάκειου Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου (ΜΦΙ) της Δρ. Α. Μαρκέλλου.

**Πίνακας 4.5.2-1.** Απεικόνιση των 51 βακτηριακών απομονώσεων και των γενών τους, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για περαιτέρω *in planta* μελέτες.

Απομόνωση	Γένος	Φορέας
SRL376	<i>Kushneria</i> sp.	ΜΦΙ
SRL377	<i>Kushneria</i> sp.	ΜΦΙ
SRL380	<i>Kushneria</i> sp.	ΜΦΙ
SRL383	<i>Kushneria</i> sp.	ΜΦΙ
SRL385	<i>Kushneria</i> sp.	ΜΦΙ
SRL386	<i>Kushneria</i> sp.	ΜΦΙ
SRL387	<i>Kushneria</i> sp.	ΜΦΙ
SRL388	<i>Kushneria</i> sp.	ΜΦΙ
SRL397	<i>Bacillus</i> sp.	ΜΦΙ
SRL402	<i>Kushneria</i> sp.	ΜΦΙ
SRL404	<i>Kushneria</i> sp.	ΜΦΙ
SRL411	<i>Kushneria</i> sp.	ΜΦΙ
SRL412	<i>Kushneria</i> sp.	ΜΦΙ
SRL413	<i>Kushneria</i> sp.	ΜΦΙ
SRL423	<i>Kushneria</i> sp.	ΜΦΙ
SRL424	<i>Kushneria</i> sp.	ΜΦΙ
SRL425	<i>Kushneria</i> sp.	ΜΦΙ
SRL426	<i>Kushneria</i> sp.	ΜΦΙ
SRL427	<i>Kushneria</i> sp.	ΜΦΙ
SRL428	<i>Kushneria</i> sp.	ΜΦΙ
SRL689	<i>Brevibacillus</i> sp.	ΕΛΜΕΠΑ/ΕΛΓΟ-ΔΗΜΗΤΡΑ
SRL729	<i>Bacillus</i> sp.	ΕΛΜΕΠΑ/ΕΛΓΟ-ΔΗΜΗΤΡΑ
SRL764	<i>Brevibacillus</i> sp.	ΕΛΜΕΠΑ/ΕΛΓΟ-ΔΗΜΗΤΡΑ

SRL768	<i>Bacillus</i> sp.	ΕΛΜΕΠΑ/ΕΛΓΟ-ΔΗΜΗΤΡΑ
SRL769	<i>Pseudomonas</i> sp.	ΕΛΜΕΠΑ/ΕΛΓΟ-ΔΗΜΗΤΡΑ
SRL771	<i>Bacillus</i> sp.	ΕΛΜΕΠΑ/ΕΛΓΟ-ΔΗΜΗΤΡΑ
SRL774	<i>Bacillus</i> sp.	ΕΛΜΕΠΑ/ΕΛΓΟ-ΔΗΜΗΤΡΑ
SRL810	<i>Brevibacillus</i> sp.	ΕΛΜΕΠΑ/ΕΛΓΟ-ΔΗΜΗΤΡΑ
SRL811	<i>Bacillus</i> sp.	ΕΛΜΕΠΑ/ΕΛΓΟ-ΔΗΜΗΤΡΑ
SRL816	<i>Bacillus</i> sp.	ΕΛΜΕΠΑ/ΕΛΓΟ-ΔΗΜΗΤΡΑ
SRL818	<i>Pseudomonas</i> sp.	ΕΛΜΕΠΑ/ΕΛΓΟ-ΔΗΜΗΤΡΑ
SRL820	<i>Bacillus</i> sp.	ΕΛΜΕΠΑ/ΕΛΓΟ-ΔΗΜΗΤΡΑ
SRL821	<i>Pseudomonas</i> sp.	ΕΛΜΕΠΑ/ΕΛΓΟ-ΔΗΜΗΤΡΑ
SRL835	<i>Brevibacillus</i> sp.	ΕΛΜΕΠΑ/ΕΛΓΟ-ΔΗΜΗΤΡΑ
SRL837	<i>Brevibacillus</i> sp.	ΕΛΜΕΠΑ/ΕΛΓΟ-ΔΗΜΗΤΡΑ
SRL851	<i>Pseudomonas</i> sp.	ΕΛΜΕΠΑ/ΕΛΓΟ-ΔΗΜΗΤΡΑ
SRL871	<i>Brevibacillus</i> sp.	ΕΛΜΕΠΑ/ΕΛΓΟ-ΔΗΜΗΤΡΑ
SRL879	<i>Brevibacillus</i> sp.	ΕΛΜΕΠΑ/ΕΛΓΟ-ΔΗΜΗΤΡΑ
SRL917	<i>Pseudomonas</i> sp.	ΕΛΜΕΠΑ/ΕΛΓΟ-ΔΗΜΗΤΡΑ
SRL933	<i>Bacillus</i> sp.	ΕΛΜΕΠΑ/ΕΛΓΟ-ΔΗΜΗΤΡΑ
SRL937	<i>Pseudomonas</i> sp.	ΕΛΜΕΠΑ/ΕΛΓΟ-ΔΗΜΗΤΡΑ
SRL969	<i>Pseudomonas</i> sp.	ΕΛΜΕΠΑ/ΕΛΓΟ-ΔΗΜΗΤΡΑ
SRL971	<i>Pseudomonas</i> sp.	ΕΛΜΕΠΑ/ΕΛΓΟ-ΔΗΜΗΤΡΑ
SRL982	<i>Pseudomonas</i> sp.	ΕΛΜΕΠΑ/ΕΛΓΟ-ΔΗΜΗΤΡΑ
SRL983	<i>Pseudomonas</i> sp.	ΕΛΜΕΠΑ/ΕΛΓΟ-ΔΗΜΗΤΡΑ
SRL987	<i>Brevibacillus</i> sp.	ΕΛΜΕΠΑ/ΕΛΓΟ-ΔΗΜΗΤΡΑ
SRL1126	<i>Pseudomonas</i> sp.	ΕΛΜΕΠΑ/ΕΛΓΟ-ΔΗΜΗΤΡΑ
SRL1301	<i>Brevibacillus</i> sp.	ΕΛΜΕΠΑ/ΕΛΓΟ-ΔΗΜΗΤΡΑ
SRL1302	<i>Brevibacillus</i> sp.	ΕΛΜΕΠΑ/ΕΛΓΟ-ΔΗΜΗΤΡΑ
SRL1324	<i>Pseudomonas</i> sp.	ΕΛΜΕΠΑ/ΕΛΓΟ-ΔΗΜΗΤΡΑ
SRL1328	<i>Pseudomonas</i> sp.	ΕΛΜΕΠΑ/ΕΛΓΟ-ΔΗΜΗΤΡΑ

Όλες οι παραπάνω βακτηριακές απομονώσεις αναπτύχθηκαν σε πλούσιο θρεπτικό μέσο Nutrient Agar (NA) σε τρυβλία Petri, και ακολούθως δόθηκαν στους συνεργαζόμενους φορείς, προκειμένου να αξιολογηθούν σε *in planta* βιοδοκιμές σε διάφορα παθοσυστήματα.

### 2.1.2 Αποτελέσματα *in vivo* - *in planta* βιοδοκιμών ενδοφυτικών μικροβιακών απομονώσεων ενάντια σε βακτήρια (Εργ. κ. Γκούμα)

#### A. Ανταγωνιστικά βακτήρια έναντι του *Clavibacter michiganensis*

**Συνθήκες Ανάπτυξης Φυτών.** Για την μελέτη του *Clavibacter michiganensis* (Cm), χρησιμοποιήθηκαν αυτόριζα φυτάρια τομάτας (*Solanum lycopersicum*) και συγκεκριμένα το υβρίδιο "Elpida". Τα σπορόφυτα τομάτας, αφότου προχώρησαν στο απαραίτητο στάδιο ανάπτυξης, μεταφυτεύθηκαν σε ατομικά γλαστράκια (χωρητικότητας 100ml), με οργανικό υπόστρωμα (Substrat Neuhaus mottes - Npro 647). Η ανάπτυξη των φυταρίων έγινε σε θαλάμους ανάπτυξης με ελεγχόμενες συνθήκες. Συγκεκριμένα, η θερμοκρασία ήταν σταθερή (25° C), με φωτοπερίοδο 16

ωρών (16 ώρες φως, 8 ώρες σκοτάδι) και ένταση φωτός στο 2.5  $\mu\text{mol/J}$  (λαμπτήρες Lumatek ATS 200w Pro/ ρύθμιση στο 40% της έντασης φωτός). Η κάλυψη των υδατικών αναγκών πραγματοποιήθηκε ανάλογα με το στάδιο ανάπτυξης και τις ανάγκες των φυτών. Με την εμφάνιση τροφοπενιών στα φύλλα, εφαρμόζονταν βιολογικό υδατοδιαλυτό λίπασμα (Fitofill, Farma-Chem SA) με ριζοπότισμα. Τέλος πραγματοποιήθηκε υποστύλωση, όταν το μήκος των φυτών υπερσκέλιζε το βάρος που μπορούσε να αντέξει η διατομή του βλαστού.

**Παρασκευή θρεπτικών υποστρωμάτων.** Για την παρασκευή του 400 ml στερεού θρεπτικού υποστρώματος NAG (Nutrient Agar Glucose) (Condalab), σε φιάλη Duran των 500ml προστίθενται 400ml απιονισμένου νερού, 9,2gr (NAG), 1gr γλυκόζης (Glucose) και 3,2gr χλωριούχο νάτριο (Sodium chloride). Αναδεύεται καλά έως την ομογενοποίηση του μείγματος, έπειτα τοποθετείται σε κλίβανο αποστείρωσης σε θερμοκρασία 121 οC για 15 λεπτά. Τέλος το υλικό όσο είναι σε υγρή μορφή απλώνεται υπό στείρες συνθήκες σε τρυβλία Petri, όπου σε κάθε τρυβλίο αντιστοιχεί η ποσότητα των 20ml υποστρώματος. Για την παρασκευή 400 ml υγρού θρεπτικού υποστρώματος TSB (Trypticasein Soy Broth) (Condalab), σε φιάλη Duran των 500ml προστίθενται 400 ml απιονισμένου νερού και 12gr TSB, Αναδεύεται έως την ομογενοποίηση του μείγματος και έπειτα τοποθετείται σε κλίβανο αποστείρωσης σε θερμοκρασία 121οC για 15 λεπτά. Για την παραγωγή ρυθμιστικού διαλύματος PBS (Condalab), σε συγκέντρωση 10x με τελικό όγκο διαλύματος 1 L, σε φιάλη Duran του 1 L (1000ml) προστίθενται 800ml αποστειρωμένο νερό, 80 gr χλωριούχο νάτριο (NaCl), 2 gr χλωριούχο κάλιο (KCl), 18.1 gr όξινο φωσφορικό νάτριο ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) και 2.4 gr δισόξινο φωσφορικό κάλιο ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ). Έπειτα συμπληρώνεται με αποστειρωμένο νερό, μέχρι τελικό όγκο διαλύματος 1L.

**Ανταγωνιστικά βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν.** Τα ανταγωνιστικά βακτήρια καθώς και τα φυτοπαθογόνα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν παρουσιάζονται στον **Πίνακα 4.5.2-2**. Επιλέχθηκαν μεταξύ άλλων από προηγούμενη εργασία στην ίδια ενότητα.

**Πίνακας 4.5.2-2.** Βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη.

Βακτήρια	Γένος / Είδος
Ανταγωνιστικά βακτήρια	
*GL2	<i>Bacillus</i> sp.
GL4	<i>Bacillus</i> sp.
GL5	<i>Bacillus</i> sp.
GL32	<i>Bacillus</i> sp.
GL40	<i>Bacillus</i> sp.
**SRL768	<i>Brevibacillus</i> sp.
SRL769	<i>Pseudomonas</i> sp.
SRL1302	<i>Bacillus</i> sp.
Φυτοπαθογόνα στελέχη	
HMU4521	<i>Clavibacter michiganensis</i>
HMU4783	

\*GL: (Goumas Lab), \*\*SRL: (Sarris Lab)

**Παρασκευή αιωρημάτων ανταγωνιστικών βακτηρίων για ριζοπότισμα.** Για την παρασκευή αιωρημάτων βακίλων για ριζοπότισμα λήφθηκαν μοναδιαίες αποικίες από κάθε βάκιλο οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν για την επιμόλυνση 5 ml υγρού θρεπτικού υποστρώματος TSB, με καθένα από τα ανταγωνιστικά βακτήρια. Οι καλλιέργειες επώαστηκαν υπό συνεχή ανάδευση (140 rpm/min) σε θερμοκρασία 25°C για 48 ώρες. Οι καλλιέργειες αυτές χρησιμοποιήθηκαν για την επιμόλυνση μεγαλύτερου όγκου θρεπτικού (100 ml) τοποθετημένες σε κωνικές φιάλες όγκου (250 ml). Η επώαση αυτών πραγματοποιήθηκε υπό συνεχή ανάδευση σε θερμοκρασία 25°C για 48 ώρες. Στη συνέχεια οι καλλιέργειες φυγοκεντρήθηκαν στα 4000 g για 15 λεπτά οπότε και απομακρύνθηκε το υπερκείμενο. Τα ιζήματα επαναιωρήθηκαν σε 1 X PBS, και πραγματοποιήθηκε νέα φυγοκέντρηση. Ακολούθησε επαναιώρηση του ιζήματος σε 1 x PBS και μέτρηση της οπτικής πυκνότητας στο 600 nm (Optical Density, OD) στο φωτόμετρο (Shimadzu UV – 1900i Plus). Για κάθε ανταγωνιστικό βακτήριο δημιουργήθηκε αιώρημα σε 1 X PBS με  $OD_{600} = 0.1$ .

**Ριζοπότισμα φυτών με τα ανταγωνιστικά βακτήρια.** Η εφαρμογή των βακτηρίων στα σπορόφυτα τομάτας πραγματοποιήθηκε με ριζοπότισμα. Πιο συγκεκριμένα, τα φυτά διαμοιράστηκαν με γνώμονα τον αριθμό των μεταχειρίσεων – επεμβάσεων με το βακτήριο βιοελέγχου. Σε κάθε ατομική γλάστρα εφαρμόζονταν 20 ml βακτηριακού αιωρήματος. Η ποσότητα σε ml που χρησιμοποιήθηκε είναι άμεσα συνυφασμένη με την υδατοικανότητα που έχει ο συγκεκριμένος όγκος (0,1L) υποστρώματος.

**Τεχνητή μόλυνση φυτών με στελέχη του βακτηρίου *C. michiganensis*.** Η μόλυνση των σπορόφυτων τομάτας με το φυτοπαθογόνο βακτήριο (Cm) πραγματοποιήθηκε πέντε ημέρες μετά το ριζοπότισμα με τα ανταγωνιστικά βακτήρια. Τα φυτοπαθογόνα στελέχη του Cm (Πίνακας 1) καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό NAG για διάστημα δύο ημερών. Ακολούθησε δημιουργία αιωρήματος καθενός εκ των δύο στελεχών και φωτομέτρηση. Στη συνέχεια δημιουργήθηκε μίγμα αιωρήματος των δύο στελεχών με  $OD_{600} 0,002$  η οποία αντιστοιχεί σε  $10^8$  cfu/ml. Το μίγμα αυτό χρησιμοποιήθηκε για τις τεχνητές μολύνσεις των φυτών τομάτας. Αναλυτικότερα, στο σημείο του υποκοτυλίου (στον βλαστό του φυτού και περίπου 0,5-1cm κάτω από τις κοτυληδόνες), δημιουργήθηκε μικρή οπή με την χρήση μιας αποστειρωμένης, ανοξειδωτής, κωνικούς, μειούμενης διατομής βελόνας η οποία είχε κλίση 45° έως το μέσον αυτού (ηθμαγγειώδεις δεσμίδες) ως προς τον βλαστό. Έπειτα με την χρήση μικροπιπέτας, παραλαμβάνονταν 5 μl αιωρήματος τα οποία αντιστοιχούν σε περίπου  $10^7$  cfu/ml του Cm ανά θέση μόλυνσης και τοποθετούνταν στο σημείο της πληγής, ώστε να διεισδύσουν τα βακτηριακά κύτταρα στους ιστούς του ξυλώματος και να επιτευχθεί διασυστηματική μόλυνση. Τέλος τα εργαλεία, έπειτα από κάθε μόλυνση, απολυμαίνονταν με διάλυμα αιθανόλης 70% (β/ο). Η ίδια διαδικασία πραγματοποιήθηκε για την δημιουργία φυτών - ελέγχου όπου αντί για τη χρήση βακτηριακού αιωρήματος χρησιμοποιήθηκε αποστειρωμένο νερό. Τέλος, κάθε μεταχείριση περιελάμβανε από 10 ή 12 φυτά τομάτας.

**Προσδιορισμός βακτηριακού φορτίου του *C. michiganensis* στους φυτικούς ιστούς.** Κάθε μεταχείριση περιλάμβανε από 10 ή 12 φυτά τομάτας. Ανάλογα την συμπτωματολογική τους εικόνα (αριθμός φύλλων που εμφάνιζαν μάρανση) κατατάσσονταν στην αντίστοιχη κατηγορία (κατηγορία 1: 0-1 φύλλα, κατηγορία 2: 2-3 φύλλα, κατηγορία 3: 4-5 φύλλα). Από κάθε επέμβαση χρησιμοποιήθηκαν 9 φυτά,

δηλαδή, λήφθηκαν 3 δείγματα, όπου κάθε δείγμα περιείχε φυτά και από τις τρεις κατηγορίες. Αναλυτικότερα, από κάθε φυτό αφαιρούνταν τα φύλλα του, ώστε να μείνει ο βλαστός (μονοστέλεχο). Έπειτα, από το σημείο της μόλυνσης, όπου εξαιτίας της προσβολής από το βακτήριο εμφανίζει έλκος, μετρούνταν επτά εκατοστά προς το ακραίο μερίστωμα και σε εκείνο το σημείο γινόντουσαν δύο εγκάρσιες τομές, ώστε να παραλειφθεί τμήμα του βλαστού σε σχήμα ροδέλας. Με την βοήθεια αναλυτικού ζυγού, καταγράφονταν, η ακριβής μάζα του κάθε δείγματος. Έπειτα προστίθετο αποστειρωμένο νερό σε αναλογία 5ml / γραμμάριο φυτικού ιστού. Εν συνεχεία συνθλίβονταν οι φυτικού ιστοί, ώστε να μπορέσουν να απελευθερωθούν τα βακτήρια στο διάλυμα, συλλέγονταν 0,5ml από τα δείγματα και τοποθετούνταν σε μικροσωληνίσκο όπου εμπεριείχε 0,5 ml γλυκερόλης 50% (ο/ο). Για να μπορέσει να γίνει ποσοτικός προσδιορισμός του βακτηριακού φορτίου, έγιναν έξι διαδοχικές 1:10 αραιώσεις. Πέντε ml από κάθε αραιώση τοποθετήθηκε σε NAG και επώαστηκε στους 26°C για δύο ημέρες. Οι αποικίες που αναπτύχθηκαν, καταμετρήθηκαν και υπολογίστηκε ο αριθμός αποικιών ανά ml στο αρχικό εκχύλισμα βακτηρίων το Colony Forming Units (CFU)

**Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων.** Τα αποτελέσματα, αναλύθηκαν σε πίνακες και διαγράμματα, υπολογίζοντας την τυπική απόκλιση για στατιστικώς διαφορές (One Way ANOVA). Τα αποτελέσματα των οποίων αναφέρονται παρακάτω.

## **B. Ανταγωνιστικά βακτήρια έναντι του *Acidovorax citrulli***

**Παρασκευή θρεπτικών υποστρωμάτων.** Για την παρασκευή των θρεπτικών ακολουθήθηκε η μεθοδολογία που περιγράφεται στην ενότητα **A** για το φυτοπαθογόνο Cm.

**Ανταγωνιστικά βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν.** Οι βάκιλοι καθώς και τα φυτοπαθογόνα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν παρουσιάζονται στον **Πίνακα 4.5.2-3**.

**Πίνακας 4.5.2-3.** Βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη.

<b>Βακτήρια</b>	<b>Γένος / Είδος</b>
Ανταγωνιστικά βακτήρια	
*GL5	<i>Bacillus</i> sp.
**SRL871	<i>Brevibacillus</i> sp.
SRL879	<i>Brevibacillus</i> sp.
Φυτοπαθογόνα στελέχη	
HMU50810	<i>Acidovorax citrulli</i>
*GL: (Goumas Lab), **SRL: (Sarris Lab)	

**Παρασκευή αιωρημάτων βακίλων για ριζοπότισμα.** Για την παρασκευή αιωρημάτων βακίλων για μόλυνση των σπόρων ακολουθήθηκε η μεθοδολογία που περιγράφεται στην **A** για το φυτοπαθογόνο Cm. Στο αιώρημα επιπλέον προστέθηκε μυκητοκτόνο (1 gr/lit) (Morgan 80WG).

**Μόλυνση σπόρων καρπουζιάς.** Χρησιμοποιήθηκαν σπόροι καρπουζιού (*Citrullus*

*lanatus*) ποικιλίας Cesarea F1. Αρχικά, οι σπόροι εμβαπτίστηκαν σε 40 ml βακτηριακού αιωρήματος σε σωλήνες τύπου φάλλον 50 ml και επώαστηκαν στους 4°C για 24 h ενώ ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε αποστειρωμένο PBS χωρίς βακτήρια. Μετά την επώαση των σπόρων στο αιώρημα, ο σωλήνας με τους βυθισμένους σπόρους στο αιώρημα τοποθετήθηκε σε ειδική συσκευή αντλίας κενού (Millipore) όπου εφαρμόστηκε υποπίεση -80 kPa για 5 min. Ο σωλήνας ανακινήθηκε και η διαδικασία επαναλήφθηκε για άλλα 5 min. Στη συνέχεια το βακτηριακό αιώρημα απομακρύνθηκε και οι σπόροι τοποθετήθηκαν σε αποστειρωμένο χαρτί Whatman για 15 min ώστε να απορροφηθεί η περίσσεια του αιωρήματος. Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε και για τον αρνητικό μάρτυρα.

**Προετοιμασία του εδάφους με τα ανταγωνιστικά βακτήρια.** Η εφαρμογή του αιωρήματος των βακίλων πραγματοποιήθηκε σε ειδικά σκεύη διαμέτρου 15 cm τα οποία περιείχαν οργανικό υπόστρωμα (Substrat Neuhaus mottes – Npro 647). Ακολούθησε η προσεκτική τοποθέτηση των σπόρων, η κάλυψή τους με βερμικουλίτη και διαβροχή αυτού με το αντίστοιχο αιώρημα ανταγωνιστικού βακτηρίου. Τα σκεύη τοποθετήθηκαν σε κλειστά διαφανή δοχεία ώστε να εξασφαλιστούν υψηλά επίπεδα σχετικής υγρασίας και τοποθετήθηκαν σε θαλάμους ανάπτυξης με ελεγχόμενες συνθήκες. Συγκεκριμένα, η θερμοκρασία ήταν σταθερή (25° C), με φωτοπερίοδο 16 ωρών (16 ώρες φως, 8 ώρες σκοτάδι) Τα σκεύη περιείχαν τον ίδιο αριθμό σπόρων (20-25). Για κάθε επέμβαση έγιναν δύο βιολογικές επαναλήψεις, ενώ σε κάθε βιολογική πραγματοποιήθηκαν δύο τεχνικές επαναλήψεις ανά επέμβαση. Στα πειράματα περιλαμβάνονταν θετικός και αρνητικός μάρτυρας.

**Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων.** Τα αποτελέσματα, αναλύθηκαν σε πίνακες και διαγράμματα, υπολογίζοντας την τυπική απόκλιση για στατιστικές διαφορές (One Way ANOVA). Τα αποτελέσματα των οποίων αναφέρονται παρακάτω.

### **2.1.3 Σχεδιασμός πειραμάτων βιοδοκιμών στα παθοσυστήματα Αγγουριά-*Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-cucumerinum*, Μελιτζάνα-*Verticillium dahliae*, Τομάτα-*Verticillium dahliae* και Τομάτα-*Botrytis cinerea***

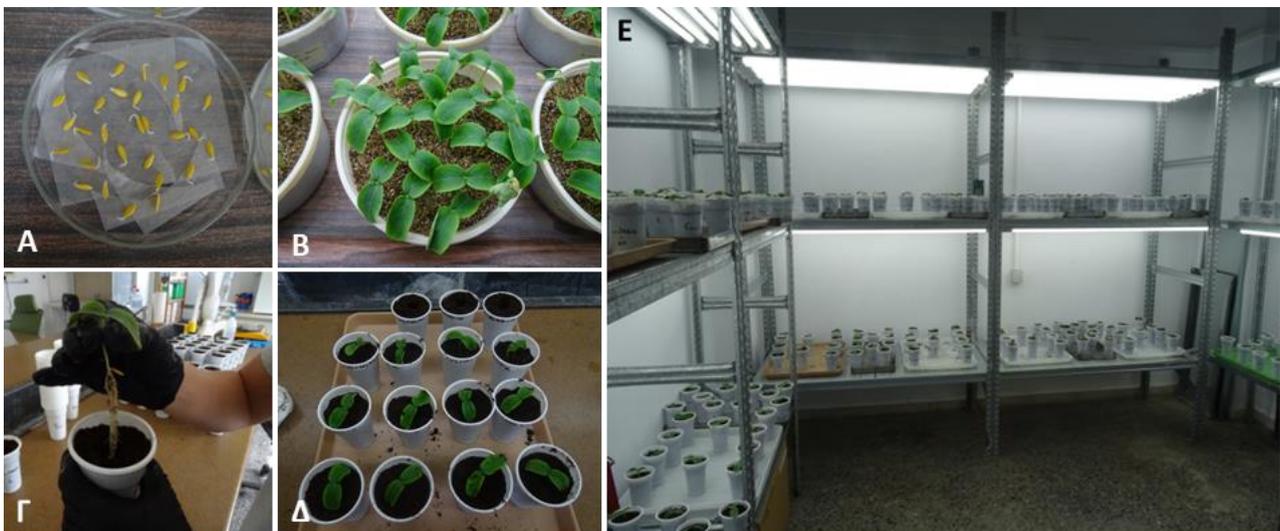
Για τη διεκπεραίωση των *in-planta* βιοδοκιμών χρησιμοποιήθηκαν οι ίδιες απομονώσεις με το προηγούμενο πακέτο εργασίας Παραδοτέο Π.4.5.1.: *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-cucumerinum* (AFu68a), *Verticillium dahliae* (999-1) και *Botrytis cinerea* (B.14.9). Το φυτικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε ήταν για την αγγουριά το υβρίδιο Jungle RZ F1, για τη μελιτζάνα η ποικιλία Black Beauty και για τη τομάτα το υβρίδιο Belladonna F1.

Για τα παθοσυστήματα 1) Αγγουριά-*Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-cucumerinum*, 2) Μελιτζάνα-*Verticillium dahliae*, 3) Τομάτα-*Verticillium dahliae* που αφορούν εδαφογενή παθογόνα, η μεθοδολογία που ακολουθήθηκε ήταν η ίδια. Κάθε πείραμα περιλάμβανε α) φυτά που ριζοποτήθηκαν με νερό και αποτέλεσαν την επέμβαση του αρνητικού μάρτυρα β) φυτά τα οποία μολύνθηκαν με κονιδιακό αιώρημα του εκάστοτε μύκητα χωρίς την εφαρμογή οποιουδήποτε βακτηριακού στελέχους τα οποία αποτέλεσαν την επέμβαση του θετικού μάρτυρα και γ) φυτά τα οποία μολύνθηκαν με κονιδιακό αιώρημα του εκάστοτε μύκητα αφού προηγουμένως είχαν δεχθεί εφαρμογή

(ριζοπότισμα) με βακτηριακά αιωρήματα στελεχών που επιλέχθηκαν από τις *in-vitro* βιοδοκιμές (Παραδοτέο Π.4.5.1). Για το παθοσύστημα 4) *Τομάτα-Botrytis cinerea* που αφορά εναέριο παθογόνο, το πείραμα περιλάμβανε α) φυλλάρια τομάτας στα οποία εναποτέθηκαν σταγόνες με νερό και αποτέλεσαν την επέμβαση του αρνητικού μάρτυρα β) φυλλάρια στα οποία εναποτέθηκαν σταγόνες κονιδιακού αιωρήματος του μύκητα χωρίς την εφαρμογή οποιουδήποτε βακτηριακού στελέχους τα οποία αποτέλεσαν την επέμβαση του θετικού μάρτυρα και γ) φυλλάρια στα οποία εναποτέθηκαν σταγόνες κονιδιακού αιωρήματος του μύκητα αφού προηγουμένως είχαν εμβαπτιστεί σε βακτηριακά αιωρήματα στελεχών που επιλέχθηκαν από τις *in-vitro* βιοδοκιμές (Παραδοτέο Π.4.5.1).

Για κάθε παθοσύστημα επιλέχθηκαν τα βακτηριακά στελέχη που επέδειξαν στατιστικά σημαντική μείωση στο ρυθμό μυκηλιακής ανάπτυξης του εκάστοτε παθογόνου στις *in-vitro* δοκιμές αντιπαραβολής (Παραδοτέο Π.4.5.1).

Για την παραγωγή των σπορόφυτων, σπόροι υποβλήθηκαν σε διαδικασία προβλάστησης και στην συνέχεια μεταφέρθηκαν σε υπόστρωμα βερμικουλίτη προκειμένου να αναπτυχθούν ομοιόμορφα νεαρά φυτάρια. Στην συνέχεια, τα νεαρά φυτάρια μεταφυτεύτηκαν στο στάδιο των κοτυληδόνων σε γλαστράκια όγκου 250 ml (**Εικόνα 4.5.2-1**) και μεταφέρθηκαν σε θάλαμο ελεγχόμενων συνθηκών (**Εικόνα 4.5.2-1Ε**).



**Εικόνα 4.5.2-1.** Α-Β. Προβλάστηση σπόρων αγγουριάς (υβρίδιο Jungla RZ F1) και μεταφορά σε υπόστρωμα βερμικουλίτη για ανάπτυξη νεαρών φυταρίων και Γ-Ε. Μεταφύτευση νεαρών φυταρίων σε ποτήρια όγκου 250 ml και μεταφορά τους σε θάλαμο ελεγχόμενων συνθηκών.

## Προετοιμασία και εφαρμογή βιολογικών παραγόντων

Τα υπό εξέταση βακτηριακά στελέχη αφού καλλιεργήθηκαν σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα Potato Dextrose Agar (PDA), εμβολιάστηκαν σε κωνικές φιάλες όγκου 500 ml που περιείχαν 200 ml υγρού θρεπτικού υποστρώματος Trypticase Soy Broth (TSB). Στην συνέχεια, οι κωνικές τοποθετήθηκαν σε περιστρεφόμενο επωαστήριο όπου και παρέμειναν για 48 ώρες σε συνθήκες σκότους στους 24 °C. Με το πέρας των 48 ωρών, πραγματοποιήθηκε η εφαρμογή των βιολογικών παραγόντων. Πιο συγκεκριμένα, το περιεχόμενο των κωνικών τοποθετήθηκε ισόποσα σε σωληνάρια Falcon και φυγοκεντρήθηκε στις 3.000 rpm για 10 λεπτά (**Εικόνα 4.5.2-2Α-Ζ**). Ακολούθησε

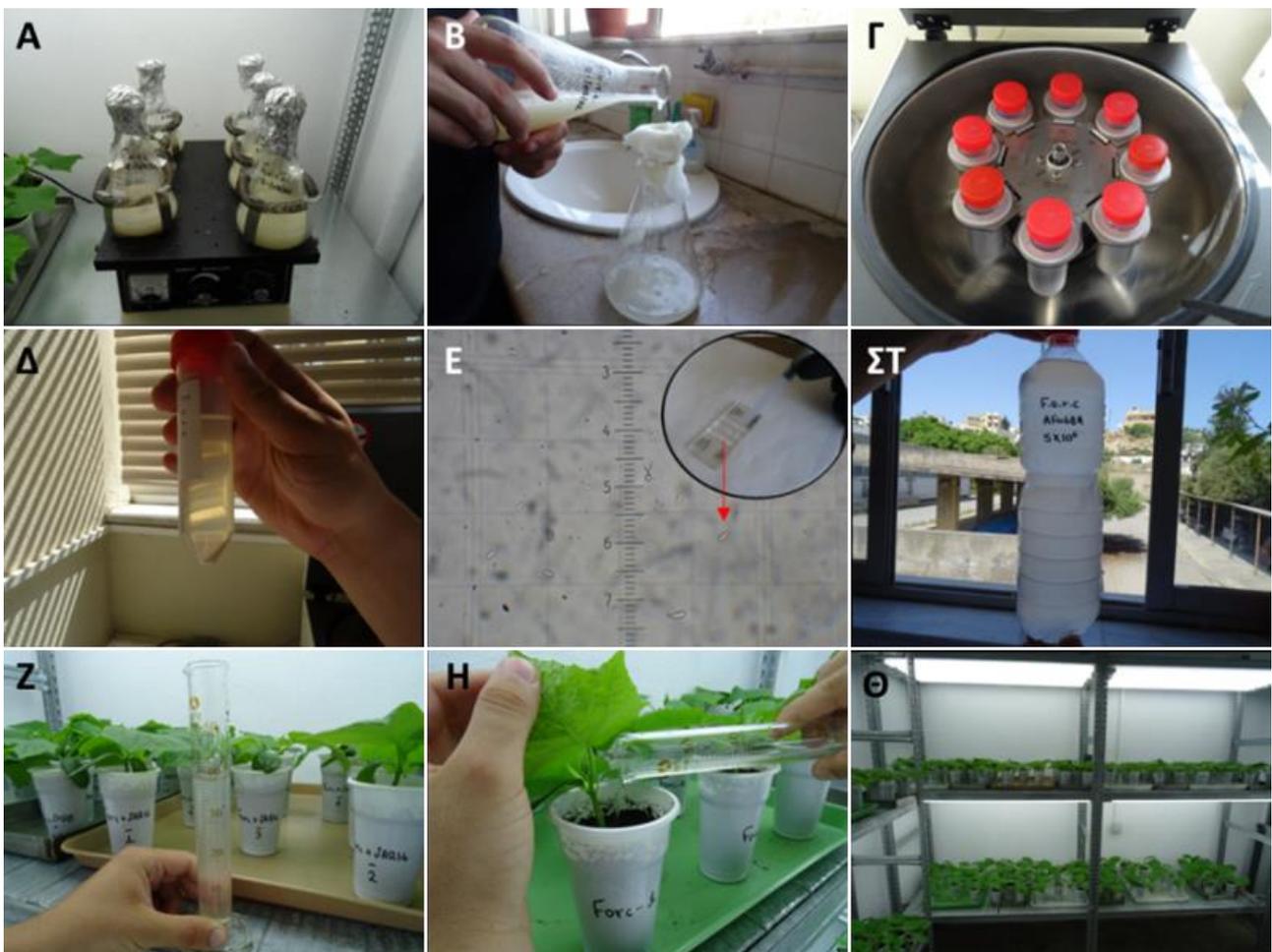
απομάκρυνση του υπερκείμενου υγρού και επαναιωρηματοποίηση του ιζήματος των βακτηριακών κυττάρων με την προσθήκη απεσταγμένου νερού. Έπειτα, πραγματοποιήθηκε φωτομέτρηση του βακτηριακού αιωρήματος (σε αραιώση 1/10) στα 600 nm στο φασματοφωτόμετρο προκειμένου να εκτιμηθεί η συγκέντρωση των βακτηριακών κυττάρων colony-forming units ανά χιλιοστόλιτρο (cfu/ml). Η συγκέντρωση των βακτηριακών κυττάρων του εκάστοτε βακτηριακού στελέχους εκτιμήθηκε βάσει της απορρόφησης με την χρήση της ψηφιακής πλατφόρμας: <http://www.labtools.us/bacterial-cell-number-od600/> και ρυθμίστηκε με τρόπο τέτοιο έτσι ώστε όλες οι συγκεντρώσεις να είναι της τάξης του  $\times 10^8$  cfu/ml. Έπειτα, πραγματοποιήθηκε ριζοπότισμα των φυτών με 40 ml βακτηριακού αιωρήματος του κάθε βιολογικού παράγοντα για τα παθοσυστήματα 1) Αγγουριά-*F.o.r.c.* και 3) Τομάτα-*V. dahliae* και 20 ml αιωρήματος για το παθοσύστημα 2) Μελιτζάνα-*V. dahliae*. Τέλος, για το παθοσύστημα 4) Τομάτα-*Botrytis cinerea*, τα αποκομμένα φυλλάρια εμβαπίστηκαν για 2 λεπτά μέσα σε ποτήρια που περιείχαν αιωρήματα των επιλεγμένων βακτηριακών στελεχών (**Εικόνα 4.5.2-2H-I**).



**Εικόνα 4.5.2-2. Α.** Βακτηριακό στέλεχος σε PDA, **Β.** Υγρή καλλιέργεια βακτηριακού στελέχους, **Γ-Δ.** Φυγοκέντρηση βακτηριακού αιωρήματος για δημιουργία ιζήματος και **Ε-ΣΤ.** Προετοιμασία επιθυμητής συγκέντρωσης και εφαρμογή βιολογικού παράγοντα σε φυτά αγγουριάς με ριζοπότισμα. **Η-Ι.** Εφαρμογή βακτηριακού στελέχους σε φυλλάρια τομάτας.

## Τεχνητή μόλυνση φυτών με κονιδιακό αιώρημα του μύκητα

Για τη δημιουργία κονιδιακού αιωρήματος πραγματοποιήθηκε εμβολιασμός νεαρής καλλιέργειας του εκάστοτε μύκητα σε κωνικές φιάλες όγκου 500 ml που περιείχαν 200 ml υγρού θρεπτικού υποστρώματος Potato Dextrose Broth (PDB). Στην συνέχεια, οι κωνικές τοποθετήθηκαν σε περιστρεφόμενο επωαστικό θάλαμο σε 160 rpm, στους 24 °C και σε συνθήκες σκότους για 2 ημέρες για το μύκητα *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-cucumerinum* και 6 ημέρες για τον μύκητα *Verticillium dahliae*, αντίστοιχα. Με το πέρασ ημερών, το περιεχόμενο των κωνικών, διηθήθηκε από τετραπλό τούλι για να απομακρυνθούν τα μυκήλια και στην συνέχεια τοποθετήθηκε ισόποσα σε σωλήνες Falcon. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 3.000 rpm για 10 λεπτά, απομάκρυνση του υπερκείμενου υγρού και επαναιωρηματοποίηση του ιζήματος των κονιδίων σε απεσταγμένο νερό. Η συγκέντρωση εκτιμήθηκε με την χρήση αιματοκυτταρομέτρου υπό μεγέθυνση μικροσκοπίου και ακολούθησαν οι κατάλληλες αραιώσεις προκειμένου να δημιουργηθεί η επιθυμητή συγκέντρωση (**Εικόνα 4.5.2-3**). Για το παθοσύστημα τομάτα-*Botrytis cinerea*, σε τρυβλίο με φρέσκια και πλήρως σποροποιημένη καλλιέργεια προστέθηκε απεσταγμένο νερό και πάρθηκε κονιδιακό αιώρημα το οποίο αραιώθηκε στη επιθυμητή συγκέντρωση.

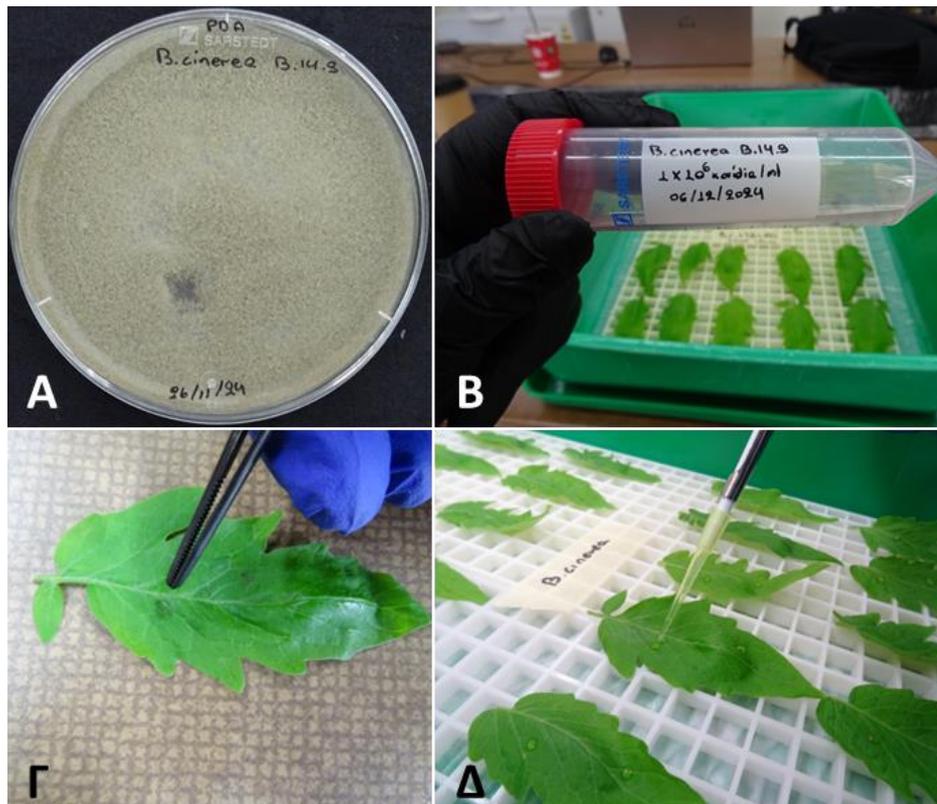


**Εικόνα 4.5.2-3. Α-Δ.** Διήθηση υγρής καλλιέργειας του μύκητα *F.o.r.c.* και φυγοκέντρηση της για τη δημιουργία ιζήματος, **Ε-ΣΤ.** Εκτίμηση συγκέντρωσης του πυκνού κονιδιακού αιωρήματος στο αιματοκυτταρομέτρο υπό μεγέθυνση μικροσκοπίου για τη παρασκευή αραιωμένου κονιδιακού αιωρήματος συγκέντρωσης  $5 \times 10^6$  κονίδια/ml και **Ζ-Θ.** Ριζοπότισμα φυτών αγγουριάς με 40 ml κονιδιακού αιωρήματος του παθογόνου.

Τόσο στο 2<sup>ο</sup> πείραμα (παθοσύστημα Μελιτζάνα-*Verticillium dahliae*), όσο και στο 3<sup>ο</sup> πείραμα (παθοσύστημα Τομάτα-*Verticillium dahliae*), η τεχνητή μόλυνση με τον μύκητα *V. dahliae* (απομόνωση 999-1) πραγματοποιήθηκε επτά ημέρες μετά την εφαρμογή των βιολογικών παραγόντων όταν τα φυτά ευρίσκονταν στο στάδιο του 3<sup>ου</sup> πραγματικού φύλλου. Πιο συγκεκριμένα, στο εδαφικό υπόστρωμα κάθε φυτού δημιουργήθηκαν τρεις οπές με την χρήση ακροφυσίου (1 ml) έτσι ώστε αφενός να δημιουργηθούν πληγές στην ρίζα και αφετέρου να έρθει σε άμεση επαφή το κονιδιακό αιώρημα με το ριζικό σύστημα του φυτού. Κάθε φυτό ριζοποτήθηκε με 20 ml κονιδιακού αιωρήματος συγκέντρωσης  $5 \times 10^6$  κονίδια/ml ενώ τα φυτά του αρνητικού μάρτυρα ριζοποτήθηκαν με 20 ml απεσταγμένου νερού (**Εικόνα 4.5.2-4**). Αντίστοιχα, στο 1<sup>ο</sup> πείραμα (παθοσύστημα Αγγουριά-*Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-cucumerinum*), έξι ημέρες μετά την εφαρμογή των βιολογικών παραγόντων πραγματοποιήθηκε τεχνητή μόλυνση όταν τα φυτά ευρίσκονταν στο στάδιο του 2<sup>ου</sup> πραγματικού φύλλου με το μύκητα *F.o.r.c.* (απομόνωση AFu68A) με 40 ml κονιδιακού αιωρήματος συγκέντρωσης  $5 \times 10^6$  κονίδια/ml. Τέλος, η θερμοκρασία του θαλάμου ελεγχόμενων συνθηκών ρυθμίστηκε στους 18°C καθώς σε αυτή την θερμοκρασία ευνοείται η μόλυνση από το παθογόνο (Vakalounakis 1996). Αναφορικά με το 4<sup>ο</sup> πείραμα (παθοσύστημα Τομάτα-*Botrytis cinerea*), δύο ημέρες μετά την εφαρμογή των βιολογικών παραγόντων πραγματοποιήθηκε τεχνητή μόλυνση στα αποκομμένα φυλλάρια τομάτας (2<sup>ο</sup> ή και το 3<sup>ο</sup> πραγματικό φύλλο) με το μύκητα *B. cinerea* (απομόνωση B.14.9). Συγκεκριμένα, 2 σταγόνες όγκου 10 μl και συγκέντρωσης  $1 \times 10^6$  κονίδια/ml εναποτέθηκαν σε κάθε φυλλάριο μέσα σε κουτιά τα οποία τοποθετήθηκαν σε συνθήκες 20 °C και φωτοπερίοδο 12 ωρών (**Εικόνα 4.5.2-5**).



**Εικόνα 4.5.2-4.** Α-Γ. Τεχνητή μόλυνση φυτών μελιτζάνας και Δ-ΣΤ. Φυτών τομάτας με το μύκητα *Verticillium dahliae*.



Εικόνα 4.5.2-5. Τεχνητή μόλυνση φυλλαρίων τομάτας με τον μύκητα *Botrytis cinerea*.

## Καταγραφή παραμέτρων ασθένειας και φυτικής ανάπτυξης

Η καταγραφή των συμπτωμάτων των τεχνητά μολυσμένων φυτών με τον μύκητα *F.o.r.c.* (παθοσύστημα 1) Αγγουριά-*F,o,r,c,*) πραγματοποιήθηκε στις 9, 12, 16, 19, 23 και 26 ημέρες από τη μόλυνση. Για την εκτίμηση της έντασης της ασθένειας του κάθε φυτού χρησιμοποιήθηκε μια αυθαίρετη 5-βάθμια κλίμακα όπου: 0= Υγιές φυτό, 1= φυτό με νανισμό και γενικευμένη χλώρωση, 2= φυτό με νανισμό, γενικευμένη χλώρωση και ένα φύλλο μαραμένο ή κίτρινο, 3= φυτό με νανισμό, γενικευμένη χλώρωση και δύο έως τρία φύλλα μαραμένα ή κίτρινα και 4= φυτό τελείως ή μερικώς νεκρωμένο. Έπειτα, βάσει των μετρήσεων που ελήφθησαν, υπολογίστηκε το εμβαδόν κάτω από την καμπύλη εξέλιξης της ασθένειας (Area Under Disease Progress Curve, AUDPC) σύμφωνα με την μέθοδο της τραπεζοειδούς ολοκλήρωσης (Campel and Madden, 1990). Η ασθένεια εκφράστηκε ως ποσοστό επί του μεγαλύτερου εμβαδού που θα ορίζονταν αν επιτυγχανόταν η υψηλότερη δυνατή ασθένεια από την έναρξη έως την λήξη του πειράματος που αναφέρεται ως «Σχετική AUDPC» (Korolev et al., 2001). Τέλος, την τελευταία ημέρα των μετρήσεων του πειράματος πραγματοποιήθηκε καταγραφή του μήκους των ελκών (mm) που εμφάνιζαν τα τεχνητά μολυσμένα φυτά στα στελέχη.

Η καταγραφή συμπτωμάτων για τα παθοσυστήματα 2) Τομάτα-*V. dahliae* και 3) Μελιτζάνα-*V. dahliae* πραγματοποιήθηκαν στις 8, 10, 14, 17, 20, 24 και 27 και 8, 11, 15, 18 και 22 ημέρες από τη μόλυνση, αντίστοιχα. Για την εκτίμηση της έντασης της ασθένειας του κάθε φυτού καταγράφηκε ο αριθμός των συμπτωματικών φύλλων προς το σύνολο των φύλλων του φυτού και Ένταση της ασθένειας εκφράστηκε ως ποσοστό επί τοις εκατό (%). Έπειτα, από τα δεδομένα της έντασης της ασθένειας υπολογίστηκε

το εμβαδόν κάτω από την καμπύλη εξέλιξης της ασθένειας (Area Under Disease Progress Curve, AUDPC) σύμφωνα με την μέθοδο της τραπεζοειδούς ολοκλήρωσης (Campel and Madden, 1990). Η ασθένεια εκφράστηκε ως ποσοστό επί του μεγαλύτερου εμβαδού που θα ορίζονταν αν επιτυχανόταν η υψηλότερη δυνατή ασθένεια από την έναρξη έως την λήξη του πειράματος που αναφέρεται ως «Σχετική AUDPC» (Korolev et al., 2001). Η σοβαρότητα της ασθένειας υπολογίστηκε ως το ποσοστό των μολυσμένων φύλλων. Μολυσμένα από βερτισιλλίωση φυτά θεωρήθηκαν μόνο εκείνα όπου η τελική ένταση της ασθένειας ήταν  $\geq 15\%$ , προκειμένου να αποφευχθεί να θεωρηθούν ως μολυσμένα φυτά που εκδήλωσαν ηπιότερα συμπτώματα λόγω γήρανσης ή ελλιπούς θρέψης. Τέλος, η θνησιμότητα εκτιμήθηκε ως το ποσοστό των νεκρών φυτών (ως νεκρά θεωρήθηκαν τα φυτά με τελική ένταση ασθένειας  $\geq 80\%$ ).

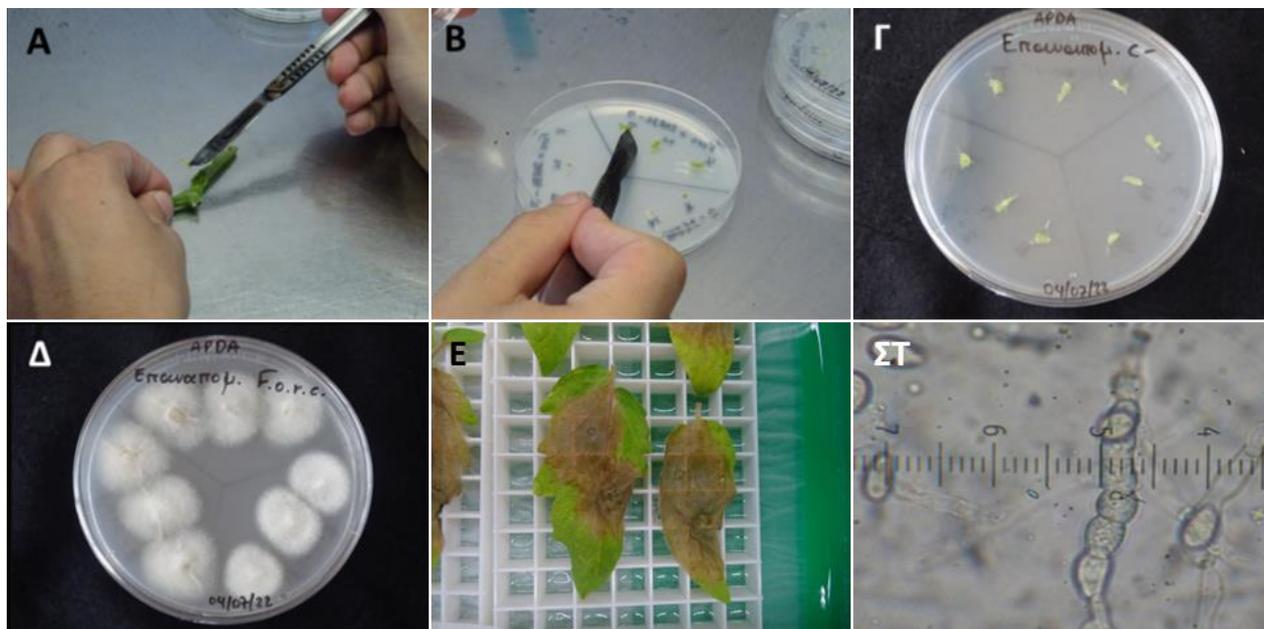
Για το παθοσύστημα 4) Τομάτα-*Botrytis cinerea* η καταγραφή των συμπτωμάτων των τεχνητά μολυσμένων φυλλαρίων πραγματοποιήθηκε 1, 2, 3, 4, 5 και 6 ημέρες από την μόλυνση. Η εκτίμηση της έντασης της ασθένειας πραγματοποιήθηκε μετρώντας της διάμετρο ανάπτυξης (σε mm) της σήψης ή/και της μυκηλιακής αποικίας που αναπτύχθηκε στις φυτικές επιφάνειες με τη χρήση χάρακα. Έπειτα, από τα αποτελέσματα υπολογίστηκε το εμβαδόν κάτω από την καμπύλη εξέλιξης της ασθένειας (Area Under Disease Progress Curve, AUDPC) σύμφωνα με την μέθοδο της τραπεζοειδούς ολοκλήρωσης (Campel and Madden, 1990).

Τέλος, εκτός από τις παραμέτρους της ασθένειας καταγράφηκαν και παράμετροι φυτικής ανάπτυξης προκειμένου να εξεταστεί εάν τα υπό αξιολόγηση βακτηριακά στελέχη προάγουν την φυτική βιομάζα. Οι παράμετροι φυτικής ανάπτυξης καταγράφηκαν κατά την τελευταία καταγραφή των συμπτωμάτων από τη μόλυνση. Πιο συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκαν καταγραφές που αφορούσαν στο συνολικό αριθμό των φύλλων (συμπτωματικών και μη) και στο ύψος (cm) των φυτών. Τέλος, τα φυτά αποκόπηκαν στο στέλεχος, στο ύψος της επιφάνειας του χώματος, και ζυγίστηκαν ώστε να καταγραφεί το νωπό τους βάρος (gr).

## Επιβεβαίωση της παρουσίας του παθογόνου στους μολυσμένους φυτικούς ιστούς

Για την επιβεβαίωση της παρουσίας του εκάστοτε παθογόνου, με το οποίο πραγματοποιήθηκαν οι τεχνητές μολύνσεις, πραγματοποιήθηκαν μικροβιακές επαναπομονώσεις σε τριβλία με οξινομένο στερεό ενδιαίτημα πατάτας-δεξτρόζης-άγαρ (APDA). Συγκεκριμένα, από κάθε στέλεχος αφαιρέθηκαν τα φύλλα, ακούθησε επιφανειακή απολύμανση με αιθανόλη σε θάλαμο αναστρεφόμενης νηματικής ροής, αφαιρέθηκε ο φλοιός από το στέλεχος με τη χρήση απολυμασμένου νυστεριού και από κάθε στέλεχος αποκόπηκαν τρία τεμαχίδια αγγειώδους ιστού (από τη βάση, τη μέση και την κορυφή του κάθε στελέχους) και τοποθετήθηκαν με ασηπτικό τρόπο σε τρυβλία με θρεπτικό ενδιαίτημα APDA (**Εικόνα 4.5.2-6Α-Δ**). Ακολούθησε επώαση σε συνθήκες σκότους και θερμοκρασία 24° C. Ανά τακτά χρονικά διαστήματα λήφθηκαν μετρήσεις της συχνότητα επαναπομόνωσης του μύκητα από τα τεμαχίδια αγγειώδους ιστού.

Προκειμένου να επιβεβαιωθεί η παρουσία του *B. cinerea* στην επιφάνεια των φυλλαρίων τομάτας, τμήμα μυκηλίου (εξάνθηση) αποσπάστηκε από την επιφάνεια με τη χρήση αποστειρωμένης ανατομικής βελόνας και προετοιμάστηκε παρασκευάσμα για τη μικροσκοπική παρατήρηση του μύκητα (**Εικόνα 4.5.2-6Ε-ΣΤ**).



**Εικόνα 4.5.2-6. A-B.** Διαδικασία επαναπομόνωσης του παθογόνου από στελέχη φυτών αγγουριάς, **Γ-Δ.** Τρυβλία επαναπομονώσεων φυτών αρνητικού και θετικού μάρτυρα, αντίστοιχα. **Ε-Δ.** Μικροσκοπική παρατήρηση παρασκευάσματος από την εξάνθηση του μύκητα *B. cinerea* που αναπτύχθηκε επιφυτικά, για επιβεβαίωση της παρουσίας του παθογόνου.

### Στατιστική ανάλυση

Για τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε ανάλυση διακύμανσης της διασποράς (Analysis of Variance, ANOVA) προκειμένου να υπολογιστεί η σημαντικότητα των επιμέρους επεμβάσεων στις *in-planta* βιοδοκιμές. Όπου οι μεταβλητές δεν ακολούθησαν την κανονική κατανομή, τα δεδομένα μετασχηματίστηκαν σύμφωνα με την μετατροπή του τόξου ημιτόνιο ( $\arcsin$ ) πριν από την εφαρμογή της μεθόδου ανάλυσης της διασποράς. Επίσης, πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων για τον εντοπισμό στατιστικών διαφορών μεταξύ των επεμβάσεων χρησιμοποιώντας τη στατιστική δοκιμασία του  $F$  ( $p \leq 0.05$ ). Εφόσον διαπιστώθηκαν στατιστικές διαφορές, τα αποτελέσματα υποβλήθηκαν σε διαχωρισμό των μέσων όρων σύμφωνα με τη στατιστική δοκιμασία του *Tukey*. Τέλος, υπολογίστηκαν οι μέσοι όροι (Mean), οι τυπικές αποκλίσεις (Standard Deviation) και τα τυπικά σφάλματα (Standard Error) των μετρήσεων.

#### 2.1.4 *In vivo-in planta* δοκιμές σε φυτά αγγουριάς και μελιτζάνας μετά από μόλυνση με Forc και Vd

Για τις *in vivo - in planta* δοκιμές, χρησιμοποιήθηκαν φυτά αγγουριάς (δύο εμπορικές ποικιλίες, SS1 και SB2) και μελιτζάνας, τα οποία καλλιεργήθηκαν σε αποστειρωμένο υπόστρωμα (οργανική ουσία, περλίτης, βερμικουλίτης) υπό ελεγχόμενες συνθήκες θερμοκηπίου (20°C, 16 h φως/8 h σκοτάδι). Η μόλυνση με *F. oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum* έγινε με εναιώρημα χλαμυδοσπορίων ( $10^5$  spores/mL), ενώ η μόλυνση με *V. dahliae* με εναιώρημα κονιδίων αντίστοιχης συγκέντρωσης. Οι εφαρμογές των ενδοφυτικών στελεχών πραγματοποιήθηκαν είτε ως ριζοπότισμα ( $10^8$  cfu/mL), είτε ως διαφυλλικός ψεκασμός, είτε ως seed biopriming πριν τη σπορά. Καταγράφηκαν

μορφολογικές και φυτοπαθολογικές παράμετροι (ύψος φυτού, βάρος υπέργειου και ριζικού συστήματος, διάμετρος βλαστού, εμφάνιση έλκων, εξέλιξη ασθένειας, καρποφορία).

Για τη μελέτη των μηχανισμών άμυνας, συλλέχθηκαν δείγματα φύλλων και πραγματοποιήθηκε απομόνωση RNA, μέτρηση συγκέντρωσης, σύνθεση cDNA και ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου (RT-qPCR) για τα γονίδια PR1 και PR4, με γονίδιο αναφοράς την actin. Τα δεδομένα αναλύθηκαν στατιστικά με ANOVA.

### **Ιn vivo βιοδοκιμές σε κοτυληδόνες με μικροβιακές απομονώσεις στο παθοσύστημα αγγούρι - *Podosphaera xanthii***

#### **A. Μικροβιακές απομονώσεις στελεχών του γένους *Bacillus***

Πραγματοποιήθηκαν *in vivo* βιοδοκιμές σε κοτυληδόνες αγγουριάς σε θαλάμους ελεγχόμενων συνθηκών, για να αξιολογηθεί η δράση των βακτηριακών στελεχών Cal.l.30 και Cal.r.29 βιολογικών παραγόντων του γένους *Bacillus* (Βενιαράκη, ΓΠΑ) στη βλαστικότητα των κονιδίων του μύκητα. Ακόμη, τα στελέχη δοκιμάστηκαν σε διάφορες συγκεντρώσεις και οι καλλιέργειες τους διαχωρίστηκαν με φυγοκέντρηση στο ίζημα (pellet) που περιείχε τα βακτηριακά κύτταρα και στο υπερκείμενο (sup) το οποίο περιείχε τους δευτερογενείς μεταβολίτες που είχαν εκκριθεί από τα βακτήρια ή ήταν προσδεμένοι στα βακτηριακά σπόρια, στο θρεπτικό υλικό. Χρησιμοποιήθηκαν οι κοτυληδόνες από φυτά αγγουριού Pilos (υβρίδια F1 γενιάς με ευαισθησία στο ωίδιο) ηλικίας 16 ημερών.

Πραγματοποιήθηκαν δώδεκα επεμβάσεις στο πείραμα οι οποίες αναφέρονται στον **Πίνακα 4.5.2- 4**.

**Πίνακας 4.5.2- 4:** Λίστα των επεμβάσεων και των αντίστοιχων κωδικών που χρησιμοποιήθηκαν για την αξιολόγηση των μικροβιακών απομονώσεων στελεχών του γένους *Bacillus* ενάντια στο μύκητα *Podosphaera xanthii* σε κοτυληδόνες αγγουριού.

<b>Επεμβάσεις</b>	<b>Κωδικοί</b>
Απεσταγμένο και αποστειρωμένο νερό	H <sub>2</sub> O
Αποστειρωμένο θρεπτικό υλικό LB	LB
Καλλιέργεια του Cal.r.29	29
Καλλιέργεια του Cal.r.29, αραιωμένη κατά δέκα φορές	29 10 <sup>-1</sup>
Καλλιέργεια του Cal.r.29, αραιωμένη κατά εκατό φορές	29 10 <sup>-2</sup>
Ίζημα της καλλιέργειας του Cal.r.29	29 pellet
Υπερκείμενο της καλλιέργειας του Cal.r.29	29 sup
Καλλιέργεια του Cal.l.30	30
Καλλιέργεια του Cal.l.30, αραιωμένη κατά δέκα φορές	30 10 <sup>-1</sup>
Καλλιέργεια του Cal.l.30, αραιωμένη κατά εκατό φορές	30 10 <sup>-2</sup>
Ίζημα της καλλιέργειας του Cal.l.30	30 pellet
Υπερκείμενο της καλλιέργειας του Cal.l.30	30 sup

Η επέμβαση H<sub>2</sub>O χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας ενώ η επέμβαση LB έγινε για να

προσδιοριστεί αν το θρεπτικό υλικό το οποίο χρησιμοποιήθηκε για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών είχε επίδραση στην βλαστικότητα των κονιδίων. Η μελέτη της ανάπτυξης των κονιδίων έγινε σε τρεις κοτυληδόνες ανά επέμβαση.

Για τα τρυβλία Petri, κόπηκαν διηθητικά χαρτιά σε σχήμα κύκλου ίσης διαμέτρου με τα τρυβλία (9cm). Οι διηθητικοί δίσκοι αποστειρώθηκαν σε κλίβανο ξηρής αποστείρωσης στους 150°C για 90 λεπτά. Σε κάθε τρυβλίο, μεταφέρθηκαν δύο διηθητικοί δίσκοι με λαβίδα και προστέθηκαν με πιπέτα 5 ml αποστειρωμένου και απεσταγμένου νερού. Με τον τρόπο αυτό, διατηρήθηκαν υψηλά επίπεδα υγρασίας στα τρυβλία. Η προετοιμασία των τρυβλίων έγινε μέσα σε θάλαμο νηματικής ροής. Προκειμένου να διατηρηθεί η σπαργή τους, οι κοτυληδόνες συλλέχθηκαν από το γυάλινο θερμοκήπιο και μεταφέρθηκαν σε δόσεις στο εργαστήριο μέσα σε σακούλες με υγρό βαμβάκι.

Οι καλλιέργειες διαχωρίστηκαν σε ίζημα και υπερκείμενο με φυγκέντριση στις 5.000 στροφές ανά λεπτό για 10 λεπτά. Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε με πιπέτα σε σωλήνα falcon των 50 ml ενώ τα βακτηριακά κύτταρα επαναιωρήθηκαν σε διάλυμα  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  10 mM ίσης ποσότητας με την καλλιέργεια που φυγοκεντρήθηκε.

Κάθε επέμβαση μεταφέρθηκε σε ξεχωριστό τρυβλίο Petri. Οι κοτυληδόνες εμβαπτίστηκαν για λίγα δευτερόλεπτα στις επεμβάσεις με λαβίδα και ύστερα αφέθηκαν για λίγα λεπτά σε αποστειρωμένα διηθητικά χαρτιά πάνω σε αλουμινόχαρτο για να στεγνώσουν. Οι κοτυληδόνες μεταφέρθηκαν με λαβίδα στα τρυβλία με τους υγρούς διηθητικούς δίσκους. Μεταξύ των επεμβάσεων οι λαβίδα εμβαπτιζόταν σε οινόπνευμα και θερμαινόταν σε φλόγα ώστε να αποφευχθούν οι επιμολύνσεις μεταξύ των επεμβάσεων.

#### Τεχνητή μόλυνση

Αφού μεταφέρθηκαν όλες οι κοτυληδόνες σε τρυβλία, έγινε παρασκευή του αιωρήματος κονιδίων του παθογόνου όπως στο *in planta* πείραμα που ακολουθεί. Η τελική συγκέντρωση ήταν ίση με  $5 \cdot 10^4$  κονίδια/ml. Η τεχνητή μόλυνση έγινε με ψεκασμό των κοτυληδόνων.

#### Επώαση και δειγματοληψία

Τα τρυβλία με τις κοτυληδόνες μεταφέρθηκαν σε θάλαμο ανάπτυξης φυτών με φωτοπερίοδο 16 ώρες φωτός και 8 ώρες σκοταδιού και 70% σχετική υγρασία. Η θερμοκρασία ρυθμίστηκε στους 22°C. Καθώς στόχος του πειράματος ήταν να μελετηθεί η ανάπτυξη του μύκητα στις κοτυληδόνες την ίδια χρονική περίοδο για όλα τα δείγματα, οι κοτυληδόνες μεταφέρθηκαν την ίδια στιγμή σε σωλήνες falcon χωρητικότητας 50 ml με διάλυμα 80% αιθανόλης (**Εικόνα 4.5.2-7**). Η δειγματοληψία έγινε 40 ώρες μετά από την τεχνητή μόλυνση.

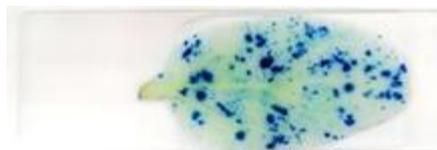


**Εικόνα 4.5.2-7:** Δειγματοληψία 40 ώρες μετά την τεχνητή μόλυνση. Μεταφορά των κοτυληδόνων από τα τρυβλία σε σωλήνες falcon με διάλυμα 80% αιθανόλη.

#### *Μελέτη της ανάπτυξης του μύκητα στις κοτυληδόνες*

Το διάλυμα αιθανόλης, πέρα από την νέκρωση των ζωντανών ιστών, βοήθησε και στην εκχύλιση της χλωροφύλλης από τις κοτυληδόνες στο διάλυμα, με αποτέλεσμα να διευκολύνεται η παρατήρηση των δειγμάτων στο μικροσκόπιο. Για να απομακρυνθεί τελείως η χλωροφύλλη από τα δείγματα, το διάλυμα αιθανόλης με την χλωροφύλλη απορρίφθηκε και αντικαταστάθηκε με νέο διάλυμα αιθανόλης ίδιας συγκέντρωσης. Πριν την μικροσκοπική παρατήρηση της, κάθε κοτυληδόνα ενυδατώθηκε με απεσταγμένο νερό και ύστερα εμβαπτίστηκε στην χρωστική Lactorphenol cotton blue ώστε να γίνει χρώση των υφών του μύκητα. Στη συνέχεια, το δείγμα ξεπλύθηκε σε απεσταγμένο νερό ώστε να απομακρυνθεί η περίσσεια της χρωστικής, μεταφέρθηκε σε αντικειμενοφόρο πλάκα και καλύφτηκε με καλυπτρίδα για να παρατηρηθεί μικροσκοπικά **Εικόνα 4.5.2-8**).

Η αξιολόγηση της ανάπτυξης του μύκητα στις κοτυληδόνες έγινε βάσει της έρευνας των Margaritoroulou et al. (2022). Κατά την μικροσκοπική παρατήρηση, καταμετρήθηκαν σε κάθε δείγμα τα μη βλαστημένα κονίδια, τα κονίδια που είχαν σχηματίσει βλαστικό σωλήνα, καθώς και τα κονίδια που είχαν σχηματίσει από μία έως τρεις πρωτογενείς υφές. Τα κονίδια παρατηρήθηκαν στο οπτικό μικροσκόπιο και η λήψη φωτογραφιών έγινε με τη ψηφιακή κάμερα του μικροσκοπίου.



**Εικόνα 4.5.2-8:** Κοτυληδόνα φυτού αγγουριάς ύστερα από επώαση σε διάλυμα 80% αιθανόλης και χρώση με Lactorphenol cotton blue.

Στόχος του πειράματος ήταν να προσδιοριστεί η δράση του πολύ αποτελεσματικού στελέχους Cal.l.30 και του λιγότερο αποτελεσματικού Cal.r.29, βάσει του θερμοκηπιακού πειράματος, στην ανάπτυξη του μύκητα *in vivo*. Για τον σκοπό αυτό, έγινε μικροσκοπική παρατήρηση κοτυληδόνων οι οποίες εμβαπτίστηκαν στις επεμβάσεις

και ύστερα μολύνθηκαν με τον παθογόνο μύκητα και επώαστηκαν για 40 ώρες σε θάλαμο ανάπτυξης. Σε κάθε κοτυληδόνα έγινε καταγραφή του σταδίου ανάπτυξης για κάθε διακρινόμενο κονίδιο.

**B. Μικροβιακές απομονώσεις στελεχών των γενών *Kushneria*, *Candida* και *Metschnikowia***

Η βιοδοκιμή στα τρυβλία πραγματοποιήθηκε προκειμένου να μελετηθεί και να συγκριθεί η δράση των βακτηριακών στελεχών των γενών *Kushneria*, *Candida* και του ζυμομύκητα *Metschnikowia* ενάντια στον παθογόνο μύκητα *P. xanthii* πάνω σε κοτυληδόνες φυτών αγγουριάς.

Ο πειραματικός σχεδιασμός και διαδικασία που ακολουθήθηκε περιγράφεται εκτενώς στην παραπάνω παράγραφο "Α. Μικροβιακές απομονώσεις στελεχών του γένους *Bacillus*". Στον παρακάτω **Πίνακα 4.5.2- 5** ακολουθεί η λίστα των επεμβάσεων με τους αντίστοιχους κωδικούς της κάθε επέμβασης.

**Πίνακας 4.5.2- 5:** Λίστα των επεμβάσεων και των αντίστοιχων κωδικών που χρησιμοποιήθηκαν για την αξιολόγηση των μικροβιακών απομονώσεων στελεχών των γενών *Kushneria*, *Candida* και *Metschnikowia* ενάντια στο μύκητα *Podospaera xanthii* σε κοτυληδόνες αγγουριού.

Επεμβάσεις	Κωδικοί
Απεσταγμένο και αποστειρωμένο νερό	Μάρτυρας
Αποστειρωμένο θρεπτικό υλικό LB	LB
Καλλιέργεια στελέχους <i>Kushneria</i> 347	247
Καλλιέργεια στελέχους <i>Kushneria</i> 426	426
Καλλιέργεια στελέχους <i>Kushneria</i> 413	413
Καλλιέργεια στελέχους <i>Kushneria</i> 412	412
Καλλιέργεια στελέχους <i>Kushneria</i> 376	376
Καλλιέργεια στελέχους <i>Kushneria</i> 413	413
Καλλιέργεια στελέχους <i>Kushneria</i> 397	397
Καλλιέργεια στελέχους 248	248
Καλλιέργεια στελέχους <i>Candida</i>	4.1.15
Καλλιέργεια στελέχους <i>Metschnikowia</i>	4.1.14

**Ιn vivo βιοδοκιμές σε φυλλικούς δίσκους με μικροβιακές απομονώσεις στο σύστημα αγγούρι - *Podospaera xanthii***

Οι βιοδοκιμές αυτές πραγματοποιήθηκαν προκειμένου να μελετηθεί και να συγκριθεί η δράση των μικροβιακών απομονώσεων στελεχών των γενών *Kushneria* και *Metschnikowia* ενάντια στο μύκητα *Podospaera xanthii*. Ώριμα φύλλα φυτών αγγουριάς χρησιμοποιήθηκαν για την παραγωγή φυλλικών δίσκων διαμέτρου 2cm, οι οποίοι εμβάπτιστηκαν σε αιώρημα κυττάρων του εκάστοτε βιολογικού παράγοντα. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε τοποθέτηση σταγόνας 50μl στο κέντρο του δίσκου που περιείχε αιώρημα κονιδίων του μύκητα σε συγκέντρωση  $10^5 \times \text{ml}^{-1}$ . Επτά μέρες (7) μετά την εφαρμογή του παθογόνου πραγματοποιήθηκε αξιολόγηση της ανάπτυξης της ασθένειας παρατηρώντας την κάλυψη της σταγόνας με καρποφορίες του αναπτυγμένου

μύκητα. Στον παρακάτω **Πίνακα 4.5.2- 5** ακολουθεί η λίστα των επεμβάσεων με τους αντίστοιχους κωδικούς της κάθε επέμβασης.

**Πίνακας 4.5.2- 5:** Λίστα των επεμβάσεων και των αντίστοιχων κωδικών που χρησιμοποιήθηκαν για την αξιολόγηση των μικροβιακών απομονώσεων στελεχών των γενών *Kushneria* και *Metschnikowia* ενάντια στο μύκητα *Podosphaera xanthii* σε φυλλικούς δίσκους αγγουριού.

Επεμβάσεις	Κωδικοί
Απεσταγμένο και αποστειρωμένο νερό	Μάρτυρας
Καλλιέργεια στελέχους <i>Kushneria</i> 427	427
Καλλιέργεια στελέχους <i>Kushneria</i> 426	426
Καλλιέργεια στελέχους <i>Kushneria</i> 412	412
Καλλιέργεια στελέχους <i>Kushneria</i> 347	347
Καλλιέργεια στελέχους 248	248
Καλλιέργεια στελέχους <i>Metschnikowia</i>	4.1.14

### ***In planta* βιοδοκιμές με μικροβιακές απομονώσεις στο σύστημα αγγούρι - *Podosphaera xanthii***

#### **A. Μικροβιακές απομονώσεις στελεχών του γένους *Bacillus***

##### Σχεδιασμός Πειράματος

Το πείραμα πραγματοποιήθηκε σε γυάλινο θερμοκήπιο ελεγχόμενων συνθηκών. Η θερμοκρασία ρυθμίστηκε στους 22°C και η φωτοπερίοδος ρυθμίστηκε στις 16 ώρες φωτός και 8 ώρες σκοταδιού.

Χρησιμοποιήθηκαν σπόροι αγγουριού Proteas (υβρίδια F1 γενιάς με ευαισθησία στο ωίδιο). Για την κάθε επέμβαση πραγματοποιήθηκαν δύο τρόποι εφαρμογής όσον αφορά την προετοιμασία του σπόρου πριν τη σπορά. Ο σπόρος είτε χρησιμοποιήθηκε φυσικά, είτε επικαλύφθηκε με τον προς μελέτη βιολογικό παράγοντα, έχοντας πάντα και τους αντίστοιχους μάρτυρες του πειράματος. Αναλυτικά οι επεμβάσεις που πραγματοποιήθηκαν αναφέρονται στον **Πίνακα 4.5.2- 7**.

**Πίνακας 4.5.2- 7:** Συγκεντρωτικός πίνακας του πειραματικού σχεδιασμού που πραγματοποιήθηκε στο παθοσύστημα αγγούρι - *Podosphaera xanthii*.

Επεμβάσεις	Βιοκάλυψη	Κωδικοί
Νερό	Ναι	H2O+
	Όχι	H2O-
Θρεπτικό υλικό	Ναι	C+
	Όχι	C-
Cal.r.19	Ναι	19+
	Όχι	19-

Cal.r.29	Ναι	29+
	Όχι	29-
Cal.l.30	Ναι	30+
	Όχι	30-

Η επέμβαση «Νερό» (μάρτυρας) αποτελούσε τον μάρτυρα ενώ η επέμβαση «Θρεπτικό υλικό» εντάχτηκε στο πειραματικό σχέδιο για να προσδιοριστεί αν το θρεπτικό υλικό το οποίο χρησιμοποιήθηκε για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών είχε επίδραση στην ασθένεια. Χρησιμοποιήθηκαν 16 φυτά ανά επέμβαση τα οποία διαχωρίστηκαν σε 8 στα οποία έγιναν μόνο ψεκασμοί φυλλώματος και σε 8 στα οποία προηγήθηκε βιοκάλυψη του σπόρου πέρα των ψεκασμών. Το πειραματικό σχέδιο ήταν πλήρως τυχαιοποιημένες ομάδες (Complete Randomized Block design) όπως φαίνεται στην **Εικόνα 4.5.2- 9**.



**Εικόνα 4.5.2-9:** Ενδεικτική φωτογραφία φυτών αγγουριού που χρησιμοποιήθηκαν για στο πείραμα αξιολόγησης των μικροβιακών απομονώσεων του γένους *Bacillus* ενάντια του βιοτροφικού παθογόνου μύκητα *Podosphaera xanthii*.

Η αξιολόγηση της ανάπτυξης των φυτών έγινε κατά τη διάρκεια των δύο πρώτων εβδομάδων από την σπορά τους. Ο πρώτος ψεκασμός φυλλώματος με τις επεμβάσεις έγινε σε φυτά 14 ημερών, στα οποία είχε σχηματισθεί το πρώτο πραγματικό φύλλο. Οι επόμενοι ψεκασμοί ακολούθησαν σε εβδομαδιαία βάση ενώ η τεχνητή μόλυνση με τον μύκητα έγινε μία μέρα μετά τον δεύτερο ψεκασμό. Η πρώτη αξιολόγηση της ασθένειας έγινε 7 μέρες μετά την τεχνητή μόλυνση και οι επόμενες ακολούθησαν ανά διαστήματα τριών ημερών. Συνολικά έγιναν τρεις ψεκασμοί με τις επεμβάσεις και τρεις αξιολογήσεις της ασθένειας.

#### Ψεκασμοί Φυλλώματος

Ο προσδιορισμός των βακτηριακών πληθυσμών στις υγρές καλλιέργειες έγινε με μέτρηση της οπτικής πυκνότητας και καταμέτρηση των μονάδων που σχηματίζουν

αποικίες (colony forming units – CFU).

Για την μέτρηση της οπτικής τους πυκνότητας, οι καλλιέργειες αραιώθηκαν 1:10. Έγιναν δύο επαναλήψεις των μετρήσεων, τα αποτελέσματα των οποίων παρουσιάζονται στον **Πίνακα 4.5.2- 8**.

**Πίνακας 4.5.2- 8:** Τιμές μετρήσεων οπτικής πυκνότητας.

Βακτηριακά στελέχη	OD <sub>600</sub> (1 <sup>η</sup> επανάληψη)	OD <sub>600</sub> (2 <sup>η</sup> επανάληψη)
Cal.r.19	0,680	0,600
Cal.r.29	1,250	1,050
Cal.l.30	0,910	1,060

Η καταμέτρηση των μονάδων που σχηματίζουν αποικίες (colony forming units – CFU) έγινε δύο φορές. Για κάθε στέλεχος μετρήθηκαν οι αποικίες στα τρία τρυβλία της αραιώσης 10<sup>-6</sup>, καθώς οι αποικίες στις αραιώσεις 10<sup>-4</sup> και 10<sup>-5</sup> ήταν υπερβολικά πολλές για να καταμετρηθούν. Οι τιμές κάθε μέτρησης στον **Πίνακα 4.5.2- 9** είναι ο μέσος όρος από τρεις επαναλήψεις (τρία τρυβλία).

**Πίνακας 4.5.2- 9:** Τιμές μετρήσεων οπτικής πυκνότητας.

Βακτηριακά στελέχη	CFU/ml
Cal.r.19	1,0 X10 <sup>9</sup>
Cal.r.29	4.1X10 <sup>9</sup>
Cal.l.30	1,8X10 <sup>9</sup>

Από τις τιμές αυτές προκύπτει ότι οι σε καλλιέργεια δύο ημερών σε φλάσκες με το θρεπτικό υλικό Luria-Bertani, οι πληθυσμοί των βακτηρίων είναι της τάξεως του 10<sup>9</sup> CFU/ml. Δεδομένου ότι οι καλλιέργειες αραιώθηκαν σε τριπλάσιο όγκο για τους ψεκασμούς φυλλώματος, οι επεμβάσεις περιλάμβαναν πληθυσμούς της τάξεως του 10<sup>8</sup> με 10<sup>9</sup> CFU/ml.

Στους ψεκασμούς, για κάθε βακτηριακό στέλεχος, 50 ml της υγρής καλλιέργειας αραιώθηκαν με 100 ml διαλύματος CMC 0,45% και MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 10 mM. Για την επέμβαση του θρεπτικού υλικού, χρησιμοποιήθηκαν 50 ml αποστειρωμένου θρεπτικού LB το οποίο αραιώθηκε με το ίδιο διάλυμα, ενώ οι μάρτυρες ψεκάστηκαν με απεσταγμένο και αποστειρωμένο νερό. Οι επεμβάσεις ψεκάστηκαν με ψεκαστήρα χειρός όπως φαίνεται στην **Εικόνα 4.5.2- 10** έως ότου να επιτευχθεί ικανοποιητική διαβροχή των φύλλων σε σημείο απορροής.



**Εικόνα 4.5.2-10:** Ενδεικτική φωτογραφία του τρόπου εφαρμογής των μικροβιακών απομονώσεων στα φυτά αγγουριού. Κάθε φυτό καλύπτεται περιφερειακά με πλαστικό κάλυμμα ώστε να πραγματοποιηθεί εστιασμένος ψεκασμός στην φυλλική του επιφάνεια.

#### Τεχνητή Μόλυνση

Η τεχνητή μόλυνση με τον μύκητα έγινε μέσω ψεκασμού φυλλώματος με αιώρημα του παθογόνου με τελική συγκέντρωση των κονιδίων στο αιώρημα να είναι ίση με  $10^5$  κονίδια  $\times \text{ml}^{-1}$ . Η υγρασία στο θερμοκήπιο δεν ξεπέρασε το 60% ενώ συχνά έπεφτε έως και 40%.

#### Αξιολόγηση

Η αξιολόγηση της ασθένειας έγινε βάσει του προτύπου του EPPO (EPPO, 1996).

Για κάθε φυτό του πειράματος έγινε καταγραφή του ποσοστού της φυλλικής επιφάνειας που είχε καλυφθεί με τις αποικίες του μύκητα στα τέσσερα πρώτα πραγματικά φύλλα. Η καταγραφή έγινε από το 1<sup>ο</sup> έως το 4<sup>ο</sup> φύλλο για όλα τα φυτά, καθώς κανένα από τα νεότερα φύλλα δεν εμφάνισε συμπτώματα κατά την διεξαγωγή του πειράματος.

Για τον υπολογισμό της έντασης της ασθένειας χρησιμοποιήθηκε ο τύπος:

*Disease Severity Index (DSI)* υπολογίστηκε ως κάτωθι:  $DSI = [\text{Άθροισμα (της συχνότητας εμφάνισης κάθε κλάσης} \times \text{τιμή που παίρνει κάθε κλάση)}] / [(\text{συνολικού αριθμού των φύλλων}) \times (\text{μέγιστη τιμή των κλάσεων})]$ .

Για τον υπολογισμό του εμβαδού κάτω από την καμπύλη εξέλιξης τα ασθένειας (AUDPC) χρησιμοποιήθηκε ο τύπος:

$$AUDPC = \left\{ \sum_{i=1}^{n-1} [(y_i + y_{i+1})/2] * (t_{i+1} - t_i) \right\}$$

Όπου "t" είναι ο χρόνος που πραγματοποιήθηκε η κάθε παρατήρηση, "y" είναι το ποσοστό της προσβεβλημένης φυλλικής επιφάνειας σε κάθε εκτίμηση, και "i" είναι ο αριθμός των εκτιμήσεων. Η πρώτη παρατήρηση θεωρείτε ότι έγινε την μέρα της τεχνητής μόλυνσης, όπου η ένταση της ασθένειας ήταν ίση με 0. Ως Μάρτυρας ορίστηκε η επέμβαση του νερού.

Για την μετατροπή της καμπύλης εξέλιξης της ασθένειας σε γραμμή, έγινε Logit μετατροπή των ποσοστών για κάθε χρονική περίοδο με τον τύπο  $Logit(y) = \ln(1/(1-y))$ . Ύστερα οι τροποποιημένες τιμές εκφράστηκαν ως συνάρτηση του χρόνου.



**Εικόνα 4.5.2- 11:** Φύλλα αγγουριάς με διαφορετικά ποσοστά προσβεβλημένης φυλλικής επιφάνειας από τον μύκητα. (Α) 0%. (Β) 2%. (Γ) 20%. (Δ) 90%. Φωτογραφίες: ΜΦΙ.

#### *B. Μικροβιακές απομονώσεις στελεχών του γένους *Kushneria* και το στέλεχος 248*

Στο πείραμα δοκιμάστηκαν 7 μικροβιακές απομονώσεις και ως Μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν τα φυτά τα οποία ψεκάστηκαν με νερό, το υπόστρωμα LB και τον επιφανειοδραστικό παράγοντα Carboxymethyl Cellulose CMC που χρησιμοποιήθηκε για την καλύτερη κατανομή των βακτηριακών κυττάρων στη φυλλική επιφάνεια. Οι ψεκασμοί πραγματοποιούνταν σε εβδομαδιαία βάση και ξεκίνησαν μία εβδομάδα πριν την τεχνητή μόλυνση με το παθογόνο.

Χρησιμοποιήθηκαν τρία φυτά ανά επέμβαση και οι επεμβάσεις ξεκίνησαν όταν τα φυτά ήταν στο στάδιο κατά το οποίο τα 3 πρώτα φύλλα ήταν πλήρως εκπτυγμένα. Τα φυτά τοποθετήθηκαν σε θάλαμο σε θερμοκήπιο. Το στατιστικό σχέδιο που ακολουθήθηκε ήταν οι 'Πλήρως Τυχαιοποιημένες Ομάδες'.

Η αξιολόγηση της προσβολής από το παθογόνο πραγματοποιούνταν 1 ημέρα πριν από κάθε εφαρμογή των επεμβάσεων. Πραγματοποιήθηκαν 5 εφαρμογές των βιολογικών παραγόντων, με μεσοδιάστημα εφαρμογών τις 7 ημέρες. Για την αποφυγή συμπτωμάτων φυτοτοξικότητας, οι καλλιέργειες των βακτηρίων, μετά από επώαση στους 28°C για 2 ημέρες, αραιώνονταν σε αναλογία 1:10 σε αποστειρωμένο νερό με την συγκέντρωση των βακτηριακών κυττάρων στα τελικά αιωρήματα εφαρμογής στο φύλλωμα, να έχουν συγκέντρωση  $10^6$  βακ. κύτταρα  $\times$  ml<sup>-1</sup>. Αναλυτικά οι επεμβάσεις που πραγματοποιήθηκαν αναφέρονται στον **Πίνακα 4.5.2- 10**.

**Πίνακας 4.5.2- 10:** Λίστα των επεμβάσεων και των αντίστοιχων κωδικών που χρησιμοποιήθηκαν για την αξιολόγηση των μικροβιακών απομονώσεων στελεχών των γενών *Kushneria* και του στελέχους 248 ενάντια στο μύκητα *Podospaera xanthii* σε φυτά αγγουριού.

Επεμβάσεις	Κωδικοί
Απεσταγμένο και αποστειρωμένο νερό	H <sub>2</sub> O
Επιφανειοδραστικός παράγοντας	CMC
Θρεπτικό υλικό	LB
Καλλιέργεια στελέχους <i>Kushneria</i> 376	376
Καλλιέργεια στελέχους <i>Kushneria</i> 412	412
Καλλιέργεια στελέχους <i>Kushneria</i> 347	347
Καλλιέργεια στελέχους <i>Kushneria</i> 388	388
Καλλιέργεια στελέχους <i>Kushneria</i> 425	425
Καλλιέργεια στελέχους <i>Kushneria</i> 426	426
Καλλιέργεια στελέχους 248	248

***In planta* βιοδοκιμές στο παθοσύστημα αγγούρι - *Pseudoperonospora cubensis***

Τα πειράματα που αφορούσαν στο παθοσύστημα αγγούρι - *P. cubensis* πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκηπιακούς θαλάμους με δυνατότητα ρύθμισης θερμοκρασίας, υγρασίας και φωτοπεριόδου. Οι συνθήκες στο θερμοκήπιο ήταν οι ακόλουθες:

- Θερμοκρασία 25°C,
- Σχετική Υγρασία (RH) της πρώτη μέρα 100% (τα φυτά ήταν σκεπασμένα με σακούλες για την εξασφάλιση αυτού του επιπέδου RH, ενώ από την 3ή ημέρα η RH ήταν 90%,
- Φωτοπερίοδος: 12 ώρες φωτισμός/12 σκοτάδι (μόνο την 1η ημέρα μετά την τεχνητή μόλυνση τα φυτά παρέμειναν στο σκοτάδι για 24 ώρες).

Η διαδικασία εφαρμογής των μικροβιακών απομονώσεων και του παθογόνου πραγματοποιήθηκε όπως και στο παθοσύστημα αγγούρι-*P. xanthii*. Οι επεμβάσεις αναφέρονται στον **Πίνακα 4.5.2- 11**.

**Πίνακας 4.5.2- 11:** Λίστα των επεμβάσεων και των αντίστοιχων κωδικών που χρησιμοποιήθηκαν για την αξιολόγηση των μικροβιακών απομονώσεων στελεχών του γένους *Bacillus* ενάντια στον ωομύκητα *Pseudoperonospora cubensis* σε φυτά αγγουριού.

Επεμβάσεις	Κωδικοί
Απεσταγμένο και αποστειρωμένο νερό	H <sub>2</sub> O
Θρεπτικό υλικό	LB
Καλλιέργεια στελέχους <i>Bacillus</i> Cal.r.19	Cal.r.19
Καλλιέργεια στελέχους <i>Bacillus</i> Cal.r.29	Cal.r.29

Καλλιέργεια στελέχους *Bacillus Cal.I.30*

Cal.I.30

### ***In vivo* βιοδοκιμές στο σύστημα αμπέλι - *Plasmopara viticola***

Επειδή το υπό μελέτη παθογόνο, ο φυτοπαθογόνος ωμούκητας *Plasmopara viticola*, αίτιο της ασθένειας “περονόσπορος της αμπέλου” είναι υποχρεωτικό παράσιτο κρίθηκε απαραίτητη η διατήρηση του μικρού αμπελώνα σε υπαίθριο χώρο στις εγκαταστάσεις του Μπενακείου Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου (ΜΦΙ) για λήψη φυτικού υλικού δηλ. φύλλων για τις ανάγκες του έργου και ειδικότερα για τη διενέργεια των *in vivo* βιοδοκιμών.

Ως πολλαπλασιαστικό υλικό χρησιμοποιήθηκαν πιστοποιημένα έρριζα μοσχεύματα των διαφόρων ποικιλιών εμβολιασμένα σε υποκείμενο R110.

Για τη μελέτη της δράσης βιολογικών παραγόντων ενάντια στον περονόσπορο διενεργήθηκαν βιοδοκιμές σε φυλλικούς δίσκους κάτω από ελεγχόμενες συνθήκες.

Ειδικότερα,

- Πλήρως εκπτυγμένα φύλλα - θέσεις φύλλων: 3 έως 5 από την κορυφή των βλαστών- από την ποικιλία Αϊδάνι τοποθετήθηκαν σε σακούλες και μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο.
- Φυλλικοί δίσκοι διαμέτρου 2 cm λήφθηκαν με τη βοήθεια φελλοτρυπητή (cork borer) από τα συλλεχθέντα φύλλα και τοποθετήθηκαν σε τριβλία Petri διαμέτρου 9 cm (4 φυλλικοί δίσκοι/τριβλίο) με την πάνω επιφάνειά τους σε επαφή με υγρά φύλλα διηθητικού χαρτιού εμποτισμένου με αποστειρωμένο απεσταγμένο νερό. Χρησιμοποιήθηκαν 3 τριβλία ως επαναλήψεις.
- Το μόλυσμα (σποριάγγεια) προήλθε από φυσικά μολυσμένα φύλλα αμπέλου που προέρχονταν από αμπελώνα στην περιοχή της Βέροιας, τα οποία δεν είχαν δεχθεί επεμβάσεις με φυτοπροστατευτικά προϊόντα.
- Η μόλυνση των δίσκων πραγματοποιήθηκε με τοποθέτηση μιας σταγόνας (25 μl) αιωρήματος σποριαγγείων του ωμούκητα συγκέντρωσης  $2 \times 10^4$  σποριάγγεια  $\text{ml}^{-1}$  ανάμεσα στα νεύρα. Στους φυλλικούς δίσκους-μάρτυρες τοποθετήθηκε μια σταγόνα αποστειρωμένου νερού.
- Τα τριβλία με τους φυλλικούς δίσκους τοποθετήθηκαν σε θάλαμο ανάπτυξης φυτών και επωάστηκαν σε θερμοκρασία 21°C και σχετική υγρασία 80%, αρχικά στο σκοτάδι για 16 h και στη συνέχεια σε φωτοπερίοδο 16 h για όλη τη διάρκεια των βιοδοκιμών.

Η εφαρμογή των μικροβιακών απομονώσεων πραγματοποιήθηκε με εμφύσηση των φυλλικών δίσκων σε αιώρημα βακτηριακών κυττάρων ή σπορίων του εκάστοτε βιολογικού παράγοντα. Στη συνέχεια πραγματοποιούνταν τεχνητές μολύνσεις με την παραπάνω διαδικασία. Εξι μέρες (6) μετά την εφαρμογή του παθογόνου πραγματοποιούνταν αξιολόγηση της προσβολής με βάση την κλίμακα και τους κωδικούς αξιολόγησης που έχουν χρησιμοποιηθεί και σε προηγούμενα πειράματα. Κάθε επέμβαση είχε τρεις επαναλήψεις και κάθε επανάληψη αποτελούνταν από 6 δίσκους φύλλων/ποικιλία.

Μετά το πέρας της αξιολόγησης υπολογίστηκε ο δείκτης DSI\* (Disease Severity Index) όπως προαναφέρεται.

\* Disease Severity Index (DSI) υπολογίστηκε ως κάτωθι:  $DSI = \frac{[\text{Άθροισμα (της συχνότητας εμφάνισης κάθε κλάσης} \times \text{τιμή που παίρνει κάθε κλάση)]}{[(\text{συνολικού αριθμού των δίσκων}) \times (\text{μέγιστη τιμή των κλάσεων})]}$ .

A. *In vivo* βιοδοκιμές στελεχών του γένους *Kushneria* sp

Για κάθε επανάληψη χρησιμοποιήθηκαν 8-12 δίσκοι μοιρασμένοι σε 2 ή 3 τρυβλία, των 4 δίσκων το καθένα. Οι επεμβάσεις αναφέρονται στον **Πίνακα 4.5.2- 12**. Το πείραμα επαναλήφθηκε μία φορά.

**Πίνακας 4.5.2- 12:** Λίστα των επεμβάσεων και των αντίστοιχων κωδικών που χρησιμοποιήθηκαν για την αξιολόγηση των μικροβιακών απομονώσεων στελεχών του γένους *Kushneria* ενάντια στον ωμούκητα *Plasmopara viticola* σε φύλλα αμπέλου

Επεμβάσεις	Κωδικοί
Απεσταγμένο και αποστειρωμένο νερό	H <sub>2</sub> O
Θρεπτικό υλικό Nutrient Broth	NB
Καλλιέργεια στελέχους <i>Kushneria</i> 423	423
Καλλιέργεια στελέχους <i>Kushneria</i> 402	402
Καλλιέργεια στελέχους <i>Kushneria</i> 411	411
Καλλιέργεια στελέχους <i>Kushneria</i> 376	376

B. *In vivo* βιοδοκιμές στελεχών των γενών *Bacillus*, *Candida* και *Metschnikowia*

Ακολουθώντας την προαναφερθείσα διαδικασία ακολούθησε πειραματισμός, ο οποίος επαναλήφθηκε μία φορά, ώστε να δοκιμαστεί η αποτελεσματικότητα στελεχών των γενών *Bacillus*, *Candida* και *Metschnikowia*. Οι επεμβάσεις αναφέρονται στον **Πίνακα 4.5.2- 1**.

**Πίνακας 4.5.2- 2:** Λίστα των επεμβάσεων και των αντίστοιχων κωδικών που χρησιμοποιήθηκαν για την αξιολόγηση των μικροβιακών απομονώσεων στελεχών των γενών *Bacillus*, *Candida* και *Metschnikowia* ενάντια στον ωμούκητα *Plasmopara viticola* σε φύλλα αμπέλου.

Επεμβάσεις	Κωδικοί
Απεσταγμένο και αποστειρωμένο νερό	H <sub>2</sub> O
Θρεπτικό υλικό Nutrient Broth	NB
Καλλιέργεια στελέχους <i>Candida</i> 4.1.15	4.1.15
Καλλιέργεια στελέχους <i>Candida</i> 5.1.2	5.1.2
Καλλιέργεια στελέχους <i>Metschnikowia</i> 4.1.14	4.1.14
Καλλιέργεια στελέχους <i>Bacillus</i> Cal.r.19	Cal.r.19
Καλλιέργεια στελέχους <i>Bacillus</i> Cal.l.30	Cal.l.30
Καλλιέργεια στελέχους <i>Bacillus</i> Cal.r.29	Cal.r.29

## ***In planta* πειράματα στο παθοσύστημα τομάτα - *Phytophthora nicotianae***

### *Σχεδιασμός πειραμάτων*

Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε γυάλινο θερμοκήπιο ελεγχόμενων συνθηκών (μέση ημερήσια θερμοκρασία 22,5°C, ελάχιστο 19 °, μέγιστο 26°C, ημερήσια σχετική υγρασία χώρου 63%, ελάχιστο 45% και μέγιστο 81%, 14 ώρες φως/10 ώρες σκοτάδι). Προκειμένου να επιλεγούν τα βέλτιστα φυτά για τις πειραματικές δοκιμές, πραγματοποιήθηκε αξιολόγηση έτοιμων ανεπτυγμένων φυταρίων τομάτας (από εξωτερικό Φυτώριο) και φυταρίων που προέκυψαν από σπορά εντός του θερμοκηπίου του ΜΦΙ. Διαπιστώθηκε ότι η βέλτιστη επιλογή ήταν η σπορά να πραγματοποιείται εντός του ΜΦΙ λόγω ελέγχου της ανάπτυξης των φυτών και ελέγχου παρουσίας εχθρών και ασθενειών.

Στο πλαίσιο του Προγράμματος αρχικά πραγματοποιήθηκαν τέσσερα (4) πειράματα. Στο τμήμα που ακολουθεί παρουσιάζονται τα Υλικά και Μέθοδοι για τα πειράματα αυτά.

Το πειραματικό σχέδιο που ακολουθήθηκε σε όλα τα πειράματα ήταν οι 'Πλήρως Τυχαιοποιημένες Ομάδες'.



**Εικόνα 4.5.2- 12:** Αντιπροσωπευτική φωτογραφία φυτών στο στάδιο της τεχνητής μόλυνσης στο θερμοκήπιο

### *Εφαρμογή μικροβιακών απομονώσεων*

Πριν από κάθε εφαρμογή πραγματοποιούνταν μέτρηση συγκέντρωσης των κυττάρων των βακτηριακών στελεχών, με την μέθοδο διαδοχικών αραιώσεων σε στερεά θρεπτικά μέσα (LB και NA), με 2 επαναλήψεις ανά βιολογικό παράγοντα και 4 διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις με αποστειρωμένο δις απιονισμένο νερό. Επίσης, για το προσδιορισμό της συγκέντρωσης των ζυμομυκήτων πραγματοποιήθηκε μέτρηση οπτικής πυκνότητας (OD600). Οι μετρήσεις των στελεχών του γένους *Kushneria* έδειξαν ότι τα στελέχη βακτηρίων είχαν μέση συγκέντρωση της τάξης  $10^7$  κύτταρα  $\times$   $ml^{-1}$  ανά εφαρμογή. Οι υπόλοιποι μικροβιακοί παράγοντες παρουσίασαν οπτική πυκνότητα  $OD_{600}=0.8$ , που αντιστοιχεί σε  $10^7$  κύτταρα  $\times$   $ml^{-1}$ .

Η εφαρμογή των βιολογικών παραγόντων πραγματοποιήθηκε με ριζοπότισμα 10mL

αιώρηματος κυττάρων. Για το κάθε βακτηριακό στέλεχος και για κάθε στέλεχος ζυμομύκητα, παρασκευάστηκε διάλυμα αιωρήματος με αποστειρωμένο δις απιονισμένο νερό, σε αναλογία 1:10 και σε πυκνότητα κυττάρων  $10^6 \times \text{ml}^{-1}$ . Στους αρνητικούς μάρτυρες πραγματοποιήθηκε ριζοπότισμα με αποστειρωμένο δις απιονισμένο νερό. Επίσης πραγματοποιήθηκε και ριζοπότισμα μόνο με το θρεπτικό μέσο στην ίδια αναλογία όπως και στους βιολογικούς παράγοντες για να αξιολογηθεί η επίδρασή του στον ωομύκητα. Τέλος, πραγματοποιήθηκαν και εφαρμογές μόνο με τον εκάστοτε βιολογικό παράγοντα (χωρίς τεχνητή μόλυνση), ώστε να αξιολογηθεί η πιθανή ευεργετική επίδρασή τους στη φυσιολογία των φυτών ή πιθανές φυτοτοξικές επιδράσεις.

#### Τεχνητή μόλυνση

Για τις τεχνητές μολύνσεις ακολουθήθηκε η μέθοδος παρασκευής μολύσματος του ΕΡΡΟ: ΕΡΡΟ Standards, Diagnostic protocols for regulated pests, Appendix 4. Techniques for producing sporangia, © 2004 ΟΕΡΡ/ΕΡΡΟ, Bulletin ΟΕΡΡ/ΕΡΡΟ Bulletin 34, 155 –157.

Το ριζοπότισμα πραγματοποιήθηκε με αιώρημα ζωοσπορίων (**Πίνακας 4.5.2- 3**).

**Πίνακας 4.5.2- 14:** Ποσότητα αιωρήματος που εφαρμόστηκε ανά φυτό και συγκέντρωση αιωρήματος (ζωοσπόρια/ml)

Πείραμα	Ποσότητα αιωρήματος mL/φυτό	Συγκέντρωση αιωρήματος ζωοσπόρια/mL
1	6	$1 \cdot 10^4$
2	5	$3 \cdot 10^5$
3	5	$5 \cdot 10^5$
4	5	$5 \cdot 10^5$

**Πίνακας 4.5.2- 4:** Συνολικός πίνακας των επεμβάσεων που πραγματοποιήθηκαν σε κάθε μεμονωμένο πείραμα θερμοκηπίου στο παθοσύστημα τομάτα – *P. nicotianae*. Οι επεμβάσεις ήταν H<sub>2</sub>O: απεσταγμένο αποστειρωμένο νερό- αρνητικός μάρτυρας ; LB: θρεπτικό μέσο LB; Pn: *P. nicotianae*; 412, 413, 226, 227: βακτηριακά στέλεχη γένους *Kushneria* (Σαρρής, ΙΤΕ); Cal.r.29. Cal.l.30: βακτηριακά στελέχη γένους *Bacillus* (Βενιεράκη, ΓΠΑ); 4.1.14, 4.1.15: ζυμομύκητες (ΜΦΙ); 347, 248: ζυμομύκητες (Σαρρής, ΙΤΕ).

Α/α πειραμάτων	1 <sup>ο</sup> πείραμα	2 <sup>ο</sup> πείραμα	3 <sup>ο</sup> πείραμα	4 <sup>ο</sup> πείραμα
Αρ. επεμβάσεων	14	6	6	6
Αρ. βιολογικών παραγόντων	5	2	2	1
Επεμβάσεις	1. H <sub>2</sub> O 2. LB 3. PnΔ3586/7 4. 412 5. Cal.r.29 (Βενιεράκη, ΓΠΑ) 6. Cal.l.30 (Βενιεράκη, ΓΠΑ) 7. 4.1.14 (ΜΦΙ) 8. 4.1.15 (ΜΦΙ) 9. K412 + Pn 10. Cal.r.29 + Pn 11. Cal.l.30 + Pn	1. H <sub>2</sub> O 2. PnΔ3586/7 3. 413 4. 347 5. 413 + Pn 6. 347 + Pn	1. H <sub>2</sub> O 2. PnΔ3586/7 3. 426 4. 427 5. 426 + Pn 6. 427 + Pn	1. H <sub>2</sub> O 2. LB 3. PnΔ3586/7 4. 248 (Σαρρής, ΙΤΕ) 5. 248 + Pn 6. LB + Pn

	12. 4.1.14 + Pn 13. 4.1.15 + Pn 14. LB + Pn			
Επαναλήψεις	3 φυτά/ επέμβαση	3 φυτά/ επέμβαση	3 φυτά/ επέμβαση	8 φυτά/ επέμβαση
Στάδιο ανάπτυξης φυτών κατά την εφαρμογή ΒΠ	Φυτά 20d, 3 πρώτα πραγματικά φύλλα	Φυτά 20d, 3 πρώτα πραγματικά φύλλα	Φυτά 14d, 2 πρώτα πραγματικά φύλλα	Φυτά 14d, 2 πρώτα πραγματικά φύλλα
Μεσοδιάστημα εφαρμογής ΒΠ και εφαρμογής μολύσματος	4d	2d	2d	5d

### Αξιολόγηση της ασθένειας

Σε όλα τα πειράματα, για τον υπολογισμό της έντασης της ασθένειας χρησιμοποιήθηκε η κλίμακα των Meyer and Hausbeck (2012) όπου: 1 = υγιές φυτό, 2 = μάρανση κατώτερων φύλλων με υδαρή ιστό στο λαιμό του φυτού, 3 = μάρανση όλων των φύλλων με υδαρή ιστό και στένωση του λαιμού, 4 = μάρανση όλων των φύλλων με σήψη ιστού και νέκρωση λαιμού και εμφανής σποροποίηση του παθογόνου στο κατώτερο τμήμα του βλαστού και στον λαιμό, και 5 = νέκρωση φυτού.

Ο δείκτης Disease Severity Index (DSI) υπολογίστηκε ως κάτωθι:  $DSI = \frac{[\text{Άθροισμα (της συχνότητας εμφάνισης κάθε κλάσης} \times \text{τιμή που παίρνει κάθε κλάση)]}{[(\text{συνολικού αριθμού των φυτών}) \times (\text{μέγιστη τιμή των κλάσεων})]}$ .

### Συγκεντρωτικό πείραμα στελεχών των γενών *Kushneria*, *Bacillus*, *Candida*, *Metschnikowia*, του στελέχους 248 και του σκευάσματος Vitacracin

Στο πείραμα που περιγράφεται παρακάτω, ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία όπως και στα προηγούμενα πειράματα σχετικά με τη σπορά των φυτών, την εφαρμογή των μικροβιακών απομονώσεων και την εφαρμογή του παθογόνου. Όμως, λόγω της απουσίας συμπτωμάτων στο υπέργειο τμήμα των φυτών μετά την μόλυνση με ριζοπότισμα αιωρήματος ζωοσπορίων του ωομύκητα, έγινε επανάληψη της μόλυνσης με τη μέθοδο τοποθέτησης μυκηλιακών δίσκων στο λαιμό των φυτών.

Σπορόφυτα ύψους περίπου 30 cm μολύνθηκαν στο στέλεχος με τον ωομύκητα *Phytophthora nicotianae*. Ο εμβολιασμός έγινε στο σημείο του λαιμού των φυτών, με μια ελαφριά τομή στην επιφάνεια του βλαστού χρησιμοποιώντας αποστειρωμένο νυστέρι και μεταφορά τμήματος μυκηλίου (μυκηλιακός δίσκος 6mm) στην τομή (**Εικόνα 4.5.2- 13Α & Β**). Η περιοχή της μόλυνσης καλύφθηκε με parafilm (**Εικόνα 4.5.2- 13Γ**), προκειμένου να διατηρηθεί το μολύσμα στη θέση του και να εξασφαλιστεί η απαραίτητη υγρασία για τη μόλυνση. Στα φυτά-μάρτυρες έγινε η ίδια τομή, χωρίς τοποθέτηση μολύσματος, και εφαρμόστηκε κάλυψη με parafilm ώστε να διατηρηθούν οι ίδιες συνθήκες.



**Εικόνα 4.5.2- 13:** Τεχνητή μόλυνση στο στέλεχος του φυτού με τη μέθοδο grafting  
Α) πραγματοποίηση τομής στην εφυμενίδα με αποστειρωμένο νυστέρι Β) τοποθέτηση μυκηλιακού δίσκου διαμέτρου 6mm στην τομή Γ) τοποθέτηση parafilm στο σημείο του εμβολιασμού.

**Πίνακας 4.5.2- 5:** Συγκεντρωτικός πίνακας των επεμβάσεων που εφαρμόστηκαν σε φυτά τομάτας στα οποία πραγματοποιήθηκε ριζοπότισμα με αιώρημα ζωοσπορίων του ωομύκητα *Phytophthora nicotianae* (Pn) και στη συνέχεια τοποθετήθηκε μυκηλιακός δίσκος στο λαιμό των φυτών.

ΕΠΕΜΒΑΣΕΙΣ
Control (H <sub>2</sub> O)
<i>P. nicotianae</i>
Cal.r.29
Cal.l.30
4.1.14
4.1.15
376
248
P.n. + Cal.r.29
P.n. + Cal.l.30
P.n. + 4.1.14
P.n. + 4.1.15
P.n. + 376
P.n. + 248
P.n. + Vitacracin

**Απομονώσεις για τον έλεγχο πιθανής κίνησης των στελεχών των βιολογικών παραγόντων από τη ρίζα προς το υπέργειο μέρος των φυτών**

Κατά τη διάρκεια και μετά το πέρας των πειραμάτων, πραγματοποιήθηκαν απομονώσεις από φυτικούς ιστούς σε θρεπτικά μέσα, για τον έλεγχο παρουσίας των μικροβιακών απομονώσεων και του παθογόνου ωομύκητα στα διάφορα τμήματα των φυτών,

ειδικότερα για τα στελέχη μικροοργανισμών τα οποία ήταν ενδοφυτικά σε ιθαγενή είδη φυτών της Κρήτης. Ακολουθήθηκε το παρακάτω πρωτόκολλο απομονώσεων σε LB και PARB:

- Απολύμανση ιστών: με 70% EtOH και 10% διάλυμα χλωρίνης .
- Απομόνωση από φύλλα, στελέχη και ρίζες σε LB
- Απομόνωση από ιστό λαιμού φυτών σε PARB (αφορά μόνο *Phytophthora*)

#### Μέθοδος παγίδευσης (Baiting method)

Επιπλέον, επιβεβαιώθηκε η ανάπτυξη του ωμοκύκητα στο υπόστρωμα ανάπτυξης των φυτών που πραγματοποιήθηκε το ριζοπότισμα με δείγματα που πάρθηκαν από τη ριζόσφαιρα των φυτών όλων των πειραμάτων με τη μέθοδο παγίδευσης και με μικροσκοπική παρατήρηση. Η μέθοδος περιγράφεται στο άρθρο των Brasier et al., (2010) και ως μέσο παγίδευσης χρησιμοποιήθηκαν καρποί αχλαδιού.

### ***In planta* πειράματα στο παθοσύστημα πιπεριά - *P. capsici***

Για το παθοσύστημα πιπεριά-*P. capsici* αρχικά πραγματοποιήθηκαν δύο προκαταρκτικά πειράματα: ένα παθογένειας (1) και ένα πείραμα αποτελεσματικότητας (2) του ζυμοκύκητα 248 ενάντια του παθογόνου, ο οποίος αποδείχτηκε ότι ήταν αποτελεσματικός στα πειράματα της τομάτας.

#### *Σχεδιασμός πειραμάτων*

Για τα πειράματα ακολουθήθηκε ο ίδιος πειραματικός σχεδιασμός με το παθοσύστημα τομάτα-*P. nicotianae*.

#### *Εφαρμογή βιολογικού παράγοντα και τεχνητές μολύνσεις*

Ομοίως, η παρασκευή και εφαρμογή του βιολογικού παράγοντα και του μολύσματος πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τα πρωτόκολλα του παθοσυστήματος τομάτα-*P. nicotianae*.

Το ριζοπότισμα πραγματοποιήθηκε με αιώρημα ζωοσπορίων (**Πίνακας 4.5.2- 6**).

**Πίνακας 4.5.2-17:** Ποσότητα αιωρήματος που εφαρμόστηκε ανά φυτό και συγκέντρωση αιωρήματος (ζωοσπόρια/mL)

Πείραμα	Ποσότητα αιωρήματος mL/φυτό	Συγκέντρωση αιωρήματος ζωοσπόρια/mL
1	5	$1 \cdot 10^6$
2	5	$1 \cdot 10^5$

**Πίνακας 4.5.2-18:** Συγκεντρωτικός πίνακας του πειραματικού σχεδιασμού των δύο πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν στο παθοσύστημα πιπεριά- *P. capsici*.

Α/α πειραμάτων	1 <sup>ο</sup> Πείραμα	2 <sup>ο</sup> Πείραμα
Αρ. επεμβάσεων	2	2
Αρ. βιολογικών παραγόντων	-	1

Επεμβάσεις	1. H <sub>2</sub> O 2. H <sub>2</sub> O + <i>P. capsici</i> (ΜΦΙ) (Pc5)	1. H <sub>2</sub> O + <i>P. capsici</i> (ΜΦΙ) 2. 248 (Σαρρής, ΙΤΕ) + <i>P. capsici</i> (Pc5)
Επαναλήψεις	12 φυτά/επέμβαση	4 φυτά/επέμβαση
Στάδιο ανάπτυξης φυτών κατά την εφαρμογή ΒΠ	-	20d, 3 πρώτα πραγματικά φύλλα
Μεσοδιάστημα εφαρμογής ΒΠ και εφαρμογής μολύσματος	-	2d
Εφαρμογή μολύσματος- Στάδιο ανάπτυξης φυτών	14d, 2 πρώτα πραγματικά φύλλα	-

### ***In planta* πειράματα στο παθοσύστημα τομάτα - *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis lycopersici***

#### *Πειραματικός σχεδιασμός*

Η αξιολόγηση των 19 ΠΒΕ έναντι του μύκητα *FORL* πραγματοποιήθηκε δύο φορές, σε δύο ανεξάρτητες χρονικά *in planta* δοκιμές. Εξαιρέθηκαν οι ΠΒΕ 377, 380, 383, 385 και 388, καθώς δεν παρουσίασαν καμία επίδραση στην εξέλιξη της ασθένειας. Σε κάθε βιοδοκιμή συμπεριλήφθηκαν οι ακόλουθες επεμβάσεις/πειραματικές ομάδες:

1. Αρνητικός μάρτυρας (mock): πέντε (5) φυτά τομάτας, τα οποία ριζοποτίστηκαν με αποστειρωμένο νερό.
2. Θετικός μάρτυρας (*FORL*): δέκα (10) φυτά τομάτας, τα οποία ριζοποτίστηκαν με αιώρημα κονιδίων του μύκητα.
3. Μάρτυρας ΠΒΕ: πέντε (5) φυτά στα οποία εφαρμόστηκε αποκλειστικά ο εκάστοτε ΠΒΕ.
4. Επέμβαση ΠΒΕ + *FORL*: για κάθε ΠΒΕ, δέκα (10) φυτά ριζοποτίστηκαν αρχικά με εναιώρημα του ΠΒΕ και στη συνέχεια μολύνθηκαν με το αιώρημα του μύκητα.

#### *Βιολογικό υλικό - Προετοιμασία και Εφαρμογή των ΠΒΕ - Μόλυνση με το παθογόνο.*

Σπόροι τομάτας ποικιλίας ACE απολυμάνθηκαν επιφανειακά με διάλυμα υποχλωριώδους νατρίου 1,0% για 1–2 λεπτά, ξεπλύθηκαν με αποστειρωμένο απεσταγμένο νερό και φυτεύτηκαν σε εδαφικό υπόστρωμα (POTGRONT P). Τα σπορόφυτα, στο στάδιο των κοτυληδόνων, μεταφυτεύθηκαν σε πλαστικά γλαστράκια διαμέτρου 9 εκ. και αναπύχθηκαν σε θερμοκήπιο υπό ελεγχόμενες συνθήκες (25 °C ± 2 °C, φωτοπερίοδος 18/6 h).

Οι ΠΒΕ και ο μύκητας διατηρούνταν σε διάλυμα γλυκερόλης 25% v/v στους –80 °C. Για την ενεργοποίηση των ΠΒΕ πριν από τη χρήση στις βιοδοκιμές, τρυβλία Petri που περιείχαν στερεό θρεπτικό υλικό Nutrient Agar (NA) εμπλουτισμένο με 3% NaCl (w/v) εμβολιάζονταν με τους ΠΒΕ (μέθοδος streak plate) και επώζονταν 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 ΠΒΕ και επώζονταν υπό ανάδευση στους 27 °C για 24–48 ώρες. Στη συνέχεια, υγρές καλλιέργειες παρασκευάζονταν με εμβολιασμό κωνικών φιαλών που περιείχαν NB με 3% NaCl (w/v) με τις προκαλλιέργειες και επώαση υπό ανάδευση στους 27 °C για 48 ώρες. Ακολούθως, τα

βακτηριακά κύτταρα συλλέγονταν με φυγοκέντρηση, επαναιωρούνταν σε αποστειρωμένο νερό και η τελική συγκέντρωση ρυθμιζονταν σε  $1 \times 10^8$  cfu/ml με χρήση φασματοφωτόμετρου ( $OD_{600}=0.9$ ) και σύγκριση με κατάλληλη καμπύλη αναφοράς.

Η εφαρμογή των ΠΒΕ στα φυτά τομάτας πραγματοποιήθηκε με ριζοπότισμα, χορηγώντας 20 ml βακτηριακού εναιωρήματος ( $1 \times 10^8$  cfu/ml) ανά φυτό, 15 ημέρες μετά τη μεταφύτευση, στο στάδιο των 2–3 πραγματικών φύλλων.

Ο μύκητας *FORL*, πριν από τη χρήση του στα πειράματα, μεταφέρθηκε υπό ασηπτικές συνθήκες σε τρυβλία με Potato Dextrose Agar (PDA) και επώαστηκε στους 27°C για 7 ημέρες. Για την παρασκευή του μολύσματος, κωνικές φιάλες που περιείχαν υγρό θρεπτικό υλικό SSN εμβολιάστηκαν με τεμάχια (agar plugs) από τις παραπάνω αποικίες ( $0,5 \times 0,5$  cm) και επώαστηκαν στους 27°C και 120 rpm για 3 ημέρες. Οι προκύπτουσες υγρές καλλιέργειες διηθήθηκαν μέσω αποστειρωμένης γάζας για την απομάκρυνση μυκηλιακών θραυσμάτων και το διήθημα φυγοκεντρήθηκε για 10 min στους 8.000 g. Το ίζημα επαναιωρήθηκε σε αποστειρωμένο απεσταγμένο νερό και η συγκέντρωση των κονιδίων προσδιορίστηκε με αιμοκυτταρόμετρο και ρυθμίστηκε στα  $10^6$  κονίδια/ml.

Η μόλυνση με τον *FORL* πραγματοποιήθηκε τρεις ημέρες μετά την εφαρμογή των ΠΒΕ, με ριζοπότισμα 20 ml κονιδιακού εναιωρήματος ανά φυτό. Τα φυτά παρακολουθούνταν δύο φορές την εβδομάδα για διάστημα 30 ημερών μετά τη μόλυνση, και καταγράφηκαν μακροσκοπικά συμπτώματα, όπως μεταχρωματισμός ή σήψη στη βάση του στελέχους, καθώς και χλώρωση, μάρανση ή/και ξήρανση των φύλλων.

Στο τέλος του πειράματος καταγράφηκαν το χλωρό βάρος του υπέργειου μέρους και του ριζικού συστήματος κάθε φυτού, καθώς και τυχόν εξωτερικός και εσωτερικός μεταχρωματισμός της βάσης του στελέχους σε επιμήκη τομή. Από το ένα τμήμα της τομής πραγματοποιήθηκε απομόνωση του ΠΒΕ σε NA (με 3% NaCl (w/v) και προσθήκη cycloheximide (0.01%), ενώ ο μύκητας απομονώθηκε σε υλικό PDA με προσθήκη αντιβιοτικών. Το δεύτερο τμήμα της βάσης του στελέχους καταψύχθηκε άμεσα σε υγρό άζωτο και αποθηκεύτηκε στους  $-80^\circ\text{C}$  για μελλοντικό πειραματισμό.

## 2.2 Αποτελέσματα

### 2.2.1 Αποτελέσματα *in vivo* - *in planta* βιοδοκιμών ενδοφυτικών μικροβιακών απομονώσεων ενάντια σε βακτήρια (Εργ. κ. Γκούμα)

#### A. Ανταγωνιστικά βακτήρια έναντι του *Clavibacter michiganensis*

Τα πρώτα συμπτώματα μόλυνσης των φυτών από τα το φυτοπαθογόνο *C. michiganensis* παρουσιάστηκε την 15<sup>η</sup> ημέρα μετά τη μόλυνση (dpi). Τα πρώτα συμπτώματα της μάρανσης εμφανίστηκαν σε φυτά της μεταχείρισης με το ανταγωνιστικό βακτήρι SRL768. Την 18<sup>η</sup> dpi, εκδηλώθηκαν νέα συμπτώματα σε φυτά με το SRL768 καθώς και στην μεταχείριση με GL2. Την 20<sup>η</sup> dpi καταγραφής, παρατηρήθηκαν συμπτώματα μάρανσης σε φυτά, σχεδόν σε όλες τις μεταχειρίσεις με εξαίρεση την GL32. Ο θετικός μάρτυρας, ο GL2 και ο SRL768, είχαν έναν σημαντικό

αριθμό μολυσμένων φυτών, σε αντιδιαστολή με τους GL4, GL5, GL40, SRL769, SRL1302, όπου μόλις είχαν αρχίσει να εμφανίζονται φύλλα με το σύμπτωμα της μάρανσης. Την 22<sup>η</sup> dpi η εκδήλωση συμπτωμάτων προχώρησε σε νέα φυτά ή εξελίχθηκε στα είδη μολυσμένα. Πιο συγκεκριμένα υψηλό δείκτη ασθένειας είχαν ο θετικός μάρτυρας, ο GL2 και ο SRL768, αρκετά παρόμοια δράση είχαν ο GL4, SRL769 και ο SRL1302. Αξιοσημείωτη ανασταλτική δράση, είχε η μεταχείριση με τον GL32, όπου ο δείκτης ασθένειας ήταν σε μηδενικά επίπεδα. Την 25<sup>η</sup> dpi η εκδήλωση της προσβολής προχώρησε στις μεταχειρίσεις είτε στο ίδιο το φυτό είτε με εμφάνιση σε νέα φυτά, επίσης υπήρξε η πρώτη καταγραφή συμπτώματος σε φυτό με τον GL32. Την 29<sup>η</sup> dpi καταγράφηκε μια θεαματική εξαπλώση της ασθένειας σε όλες τις μεταχειρίσεις. Αξίζει να σημειωθεί στην τελευταία καταγραφή πως στις μεταχειρίσεις με τους GL2, GL4, GL5, GL32 και GL40, μπορεί να υπήρχε μεγάλο ποσοστό μολυσμένων φυτών όπως σε όλες τις υπόλοιπες, αλλά περιοριζόνταν σε λίγα φύλλα στο φυτό, σε αντιδιαστολή με τους SRL768 και SRL1302 (**Εικόνα 4.5.2-14**), όπου υπήρξαν φυτά με ολοκληρωτική καχεξία και κατάρρευση. Τα αποτελέσματα των δύο πειραμάτων συνοψίζονται στις **εικόνες 4.5.2-15 έως 4.5.2-17**.

Σε όλες τις περιπτώσεις μελετήθηκε η ένταση και η εμφάνιση της ασθένειας με βάση τους παρακάτω τύπους:

**Δείκτης έντασης ασθένειας (D.S) = A.M.Φ / A.Σ.Φ x 100%**

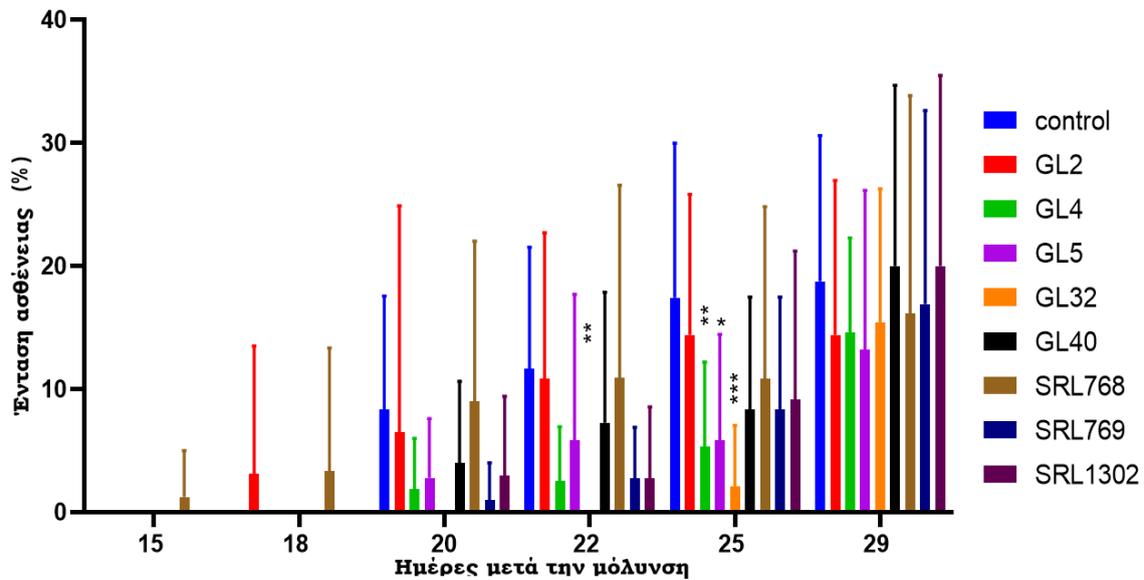
A.M.Φ: Αριθμός μολυσμένων φύλλων, A.Σ.Φ: Αριθμός συνολικών φύλλων.

Ο τύπος αυτός χρησιμοποιήθηκε ανά φυτό και ημέρα καταγραφής, όπου έπειτα υπολογίζονταν ο μέσος όρος (Christakis et al., 2021).

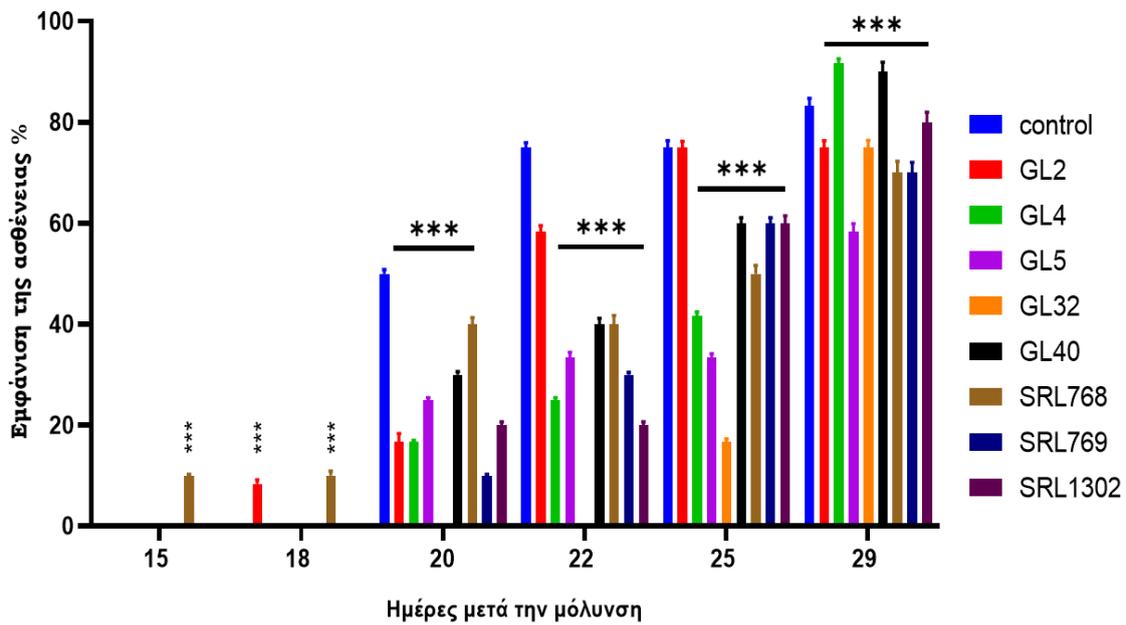
**Δείκτης εμφάνισης της ασθένειας: (D.I.) = A.M.Φ. x 100%**



Εικόνα 4.5.2-14. Εξέλιξη συμπτωμάτων του *Clavibacter michiganensis* στο φυτό 1 στην μεταχείριση με τον SRL1302, την 22<sup>η</sup> dpi, την 25<sup>η</sup> dpi και την τελευταία ημέρα καταγραφής 29<sup>η</sup> dpi.

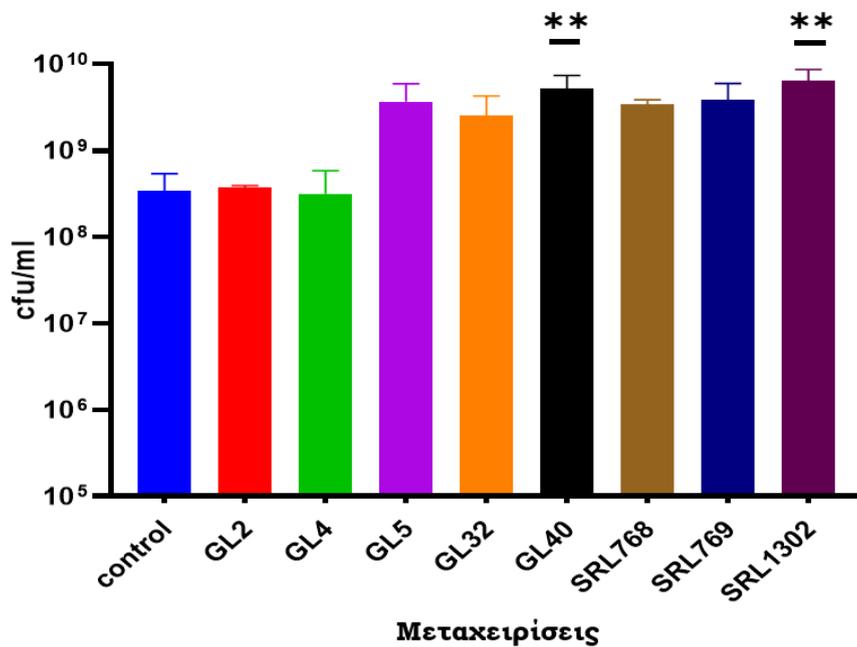


Εικόνα 4.5.2-15. Διάγραμμα που παρουσιάζει τον δείκτη έντασης της ασθένειας από τη μόλυνση με το φυτοπαθογόνο *C. michiganensis* ανά μεταχείριση και ημέρα καταγραφής. Τα φυτά με το στέλεχος GL32 παρουσίασαν μέχρι και την 22η ημέρα από την μόλυνση (dpi) τα καλύτερα αποτελέσματα. (\*\*P < 0.05).



Εικόνα 4.5.2-16. Διάγραμμα που παρουσιάζει τον δείκτη εμφάνισης της ασθένειας από τη μόλυνση με το φυτοπαθογόνο *C. michiganensis* ανά μεταχείριση και ημέρα καταγραφής σε ποσοστιαία ανάλυση (\*\*P < 0.05).

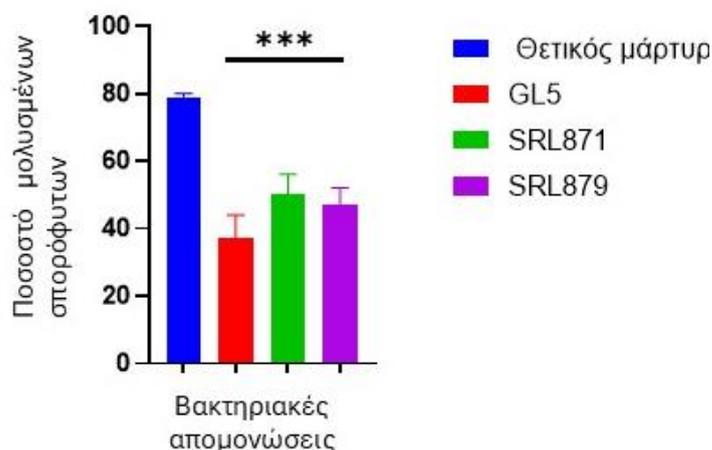
0.005).



**Εικόνα 4.5.2-17.** Διάγραμμα που παρουσιάζει το φορτίο στο φυτοπαθογόνο βακτήριο Cm ανά μεταχείριση. (\*\*P < 0.05).

## B. Ανταγωνιστικά βακτήρια έναντι του *Acidovorax citrulli*

Από τα *in vitro* πειράματα στα οποία δοκιμάστηκαν 74 βακτηριακές απομονώσεις έναντι του *Acidovorax citrulli*, τρεις (GL5, SRL871 και SRL879) παρουσίασαν τα καλύτερα αποτελέσματα έναντι του φυτοπαθογόνου. Τα ανταγωνιστικά αυτά βακτήρια χρησιμοποιήθηκαν στα *in planta* πειράματα. Από τα πειράματα αυτά διαπιστώθηκε ότι και οι τρεις απομονώσεις μείωσαν την συμπτωματολογία της ασθένειας στα σπορόφυτα καρπουζιάς. Πιο συγκεκριμένα, οι μεταχειρίσεις με το GL5 παρουσίασαν τα καλύτερα αποτελέσματα σε σχέση με τον μάρτυρα και ακολούθησε η SRL871 και η SRL879. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι η μεταχείριση με το GL5 οδήγησε σε καθυστέρηση στη βλάστηση των σπόρων (**Εικόνα 4.5.2-18**).



**Εικόνα 4.5.2-18.** Διάγραμμα που παρουσιάζει το ποσοστό μολυσμένων σποροφύτων καρπουζιάς από το φυτοπαθογόνο βακτήριο *A. citrulli* ανά μεταχείριση. Η βακτηριακή απομόνωση GL5 έδωσε τα καλύτερα

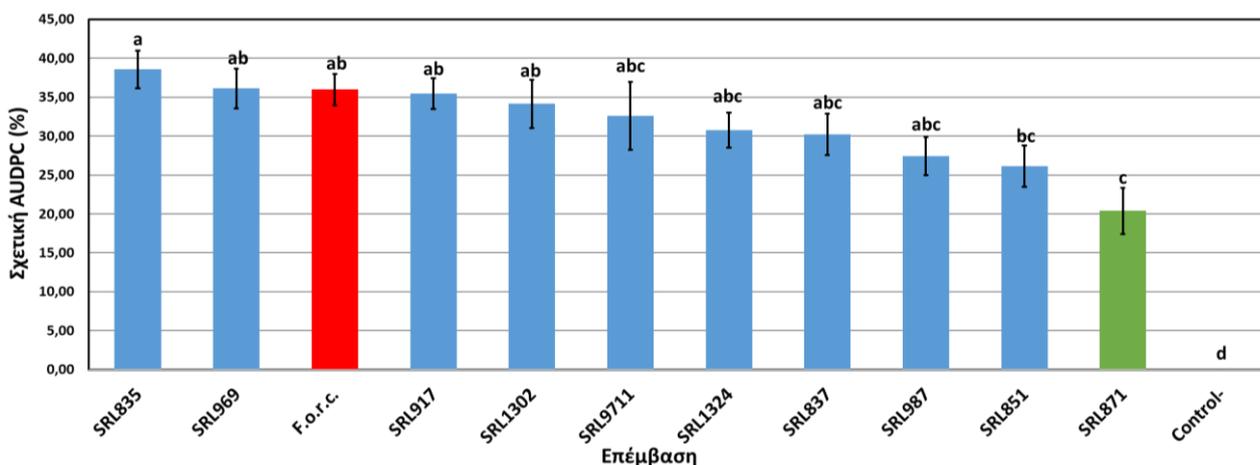
αποτελέσματα. (\*\*P< 0.001).

## 2.2.2 Βιοδοκιμές στα παθοσυστήματα Αγγουριά-*Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-cucumerinum*, Μελιτζάνα-*Verticillium dahliae*, Τομάτα-*Verticillium dahliae* και Τομάτα-*Botrytis cinerea*

### Παθοσύστημα 1) Αγγουριά-*Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-cucumerinum* (απομόνωση AFu68A)

Από τα επιλεγμένα 10 βακτηριακά στελέχη που αξιολογήθηκαν (SRL835, SRL837, SRL851, SRL871, SRL917, SRL969, SRL971, SRL987, SRL1302 και SRL1324), διαπιστώθηκε πως 1 στέλεχος μείωσε στατιστικά σημαντικά τα συμπτώματα της ασθένειας της σήψης των ριζών και του στελέχους της αγγουριάς που προκαλείται από τον μύκητα *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-cucumerinum* (**Εικόνα 4.5.2-20**). Όπως απεικονίζεται στην **εικόνα 4.5.2-19**, το βακτηριακό στέλεχος με κωδικό SRL871 επέφερε στατιστικά χαμηλότερη τιμή Σχετικής AUDPC (%) (20,39%) σε σύγκριση με τον θετικό μάρτυρα (35,92%). Επίσης, το ίδιο βακτηριακό στέλεχος (SRL871) ήταν το μόνο που μείωσε στατιστικά σημαντικά την Τελική Ένταση της Ασθένειας (%) (2,21%) σε σχέση με τον θετικό μάρτυρα (3,69%) και τη Σοβαρότητα της Ασθένειας % (60,00%) σε σύγκριση με το μάρτυρα (100,00%). Ομοίως, το εν λόγω στέλεχος μείωσε στατιστικά σημαντικά τη Θνησιμότητα (%) (20,00%) ενώ ο θετικός μάρτυρας έφτασε το 80,00%. Τέλος, 2 βακτηριακά στελέχη (SRL851 και SRL871) επέδειξαν μειωμένη συχνότητα επαναπομόνωσης σε σύγκριση με τον θετικό μάρτυρα (**Πίνακας 4.5.2-19**) (**Εικόνα 4.5.2-21**).

Αναφορικά με τις παραμέτρους φυτικής ανάπτυξης, 1 βακτηριακό στέλεχος με κωδικό SRL871 επέφερε στατιστικά σημαντική αύξηση στο νωπό βάρος των φυτών σε σχέση με το θετικό μάρτυρα ενώ δεν διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στις υπόλοιπες παραμέτρους φυτικής ανάπτυξης (**Πίνακας 4.5.2-20**).



**Εικόνα 4.5.2-19.** Σχετική AUDPC (%) στα φυτά αγγουριάς των επεμβάσεων του αρνητικού (Control-) και του θετικού μάρτυρα (F.o.r.c.) καθώς και των επεμβάσεων με τα 10 υπό αξιολόγηση βακτηριακά στελέχη. Οι πράσινες μπάρες αντιπροσωπεύουν τις επεμβάσεις που επέδειξαν στατιστικές διαφορές σε σύγκριση με

τον θετικό μάρτυρα (κόκκινη μπάρα) σύμφωνα με την στατιστική δοκιμασία του *Tukey*.



**Εικόνα 4.5.2-20.** Συμπτώματα της σήψης ριζών και στελέχους σε φυτά αγγουριάς των επεμβάσεων Control-, F.o.r.c., F.o.r.c.+SRL871, F.o.r.c.+SRL835, F.o.r.c.+SRL817 και F.o.r.c.+SRL969 στις 26 ημέρες από την μόλυνση. Σε πράσινο πλαίσιο απεικονίζονται οι επεμβάσεις που επέφεραν σημαντικές στατιστικές διαφορές σε σύγκριση με το θετικό μάρτυρα (κόκκινο πλαίσιο).

**Πίνακας 4.5.2-19.** Μέσες τιμές και τυπικά σφάλματα ( $\pm$ ) των μετρήσεων των παραμέτρων της ασθένειας της σήψης ριζών και του στελέχους σε φυτά αγγουριάς.

Τύπος βιοδοκιμών	Επέμβαση	Παράμετροι ασθένειας				
		Τελική ένταση της ασθένειας (%)	Σχετική AUPDC (%)	Σοβαρότητα της ασθένειας (%)	Θνησιμότητα (%)	Συχνότητα επαναπομόνωσης (0-1)
	Control	0.00±0.00 c	0.00±0.00 a	0.00±0.00 b	0.00±0.00 c	0.00±0.00 d
	Forc	3.69±0.14 a	35.92±2.00 ab	100.00±0.0 a	80.00±6.09 a	0.98±0.02 a
	Forc+ SRL835	3.84±0.16 a	38.55±2.39 a	93.33±4.97 ab	93.33±4.97 a	0.98±0.03 a
	Forc+ SRL837	3.66±0.17 a	30.21±2.66 abc	93.33±4.97 ab	66.67±11.11 ab	1.00±0.00 a
	Forc+ SRL851	3.22±0.25 a	26.10±2.65 bc	86.67±6.09 ab	46.67±9.94 abc	0.81±0.10 b
<i>In planta</i>	Forc+ SRL871	2.21±0.35 b	20.39±2.97 c	60.00±12.17 b	20.00±9.94 bc	0.60±0.09 c
	Forc+ SRL917	3.72±0.11 a	35.46±1.95 ab	100.00±0.00 a	66.67±13.61 ab	1.00±0.00 a
	Forc+ SRL969	3.91±0.05 a	36.12±2.56 ab	100.00±0.00 a	86.67±6.09 a	0.85±0.08 ab
	Forc+ SRL971	3.28±0.25 a	32.62±4.35 abc	93.33±4.97 ab	53.33±6.09 abc	0.89±0.06 ab
	Forc+ SRL987	3.03±0.25 ab	27.42±2.46 abc	93.33±4.97 ab	40.00±9.30 abc	0.89±0.06 ab
	Forc+ SRL1302	3.41±0.24 a	34.13±3.12 ab	86.67±6.09 ab	66.67±7.86 ab	1.00±0.00 a
	Forc+ SRL1324	3.53±0.19 a	30.74±2.26 abc	93.33±4.97 ab	60.00±14.49 ab	1.00±0.00 a

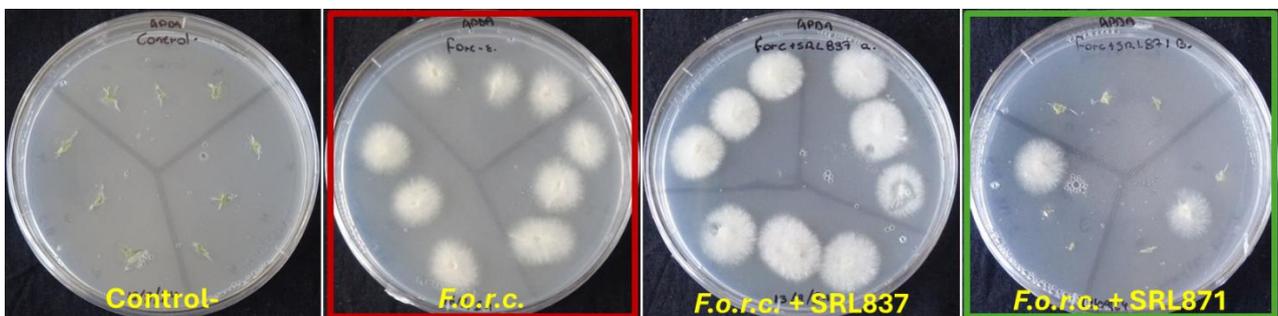
\*Στον παραπάνω πίνακα απεικονίζονται οι τιμές της Τελικής Έντασης των συμπτωμάτων της Ασθένειας (Τ.Ε.Α.), της Σχετικής AUDPC (Σχ. AUDPC), της Σοβαρότητας της ασθένειας, της Θνησιμότητας και της Συχνότητας Επαναπομόνωσης (Σ.Ε.). Εντός των στηλών, οι τιμές οι οποίες ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σύμφωνα με τη δοκιμασία *Tukey HSD* με  $P \leq 0.05$ . Κάθε τιμή αντιπροσωπεύει το μέσο όρο 16 φυτών.

**Πίνακας 4.5.2-20.** Μέσες τιμές και τυπικά σφάλματα ( $\pm$ ) των μετρήσεων των παραμέτρων της φυτικής

ανάπτυξης σε φυτά αγγουριάς.

Τύπος βιοδοκιμών	Επέμβαση	Φυτικοί παράμετροι		
		Αριθμός συνολικών φύλλων	Ύψος φυτών (cm)	Νωπό βάρος φυτών (g)
<i>In planta</i>	Control	5.88±0.20 a	12.52±0.64 a	12.17±0.66 a
	For c	4.25±0.17 b	6.63±0.25 bc	3.64±0.50 cd
	For c+ SRL835	3.81±0.19 b	6.11±0.26 c	2.30±0.32 d
	For c+ SRL837	4.06±0.21 b	6.91±0.24 bc	3.91±0.71 cd
	For c+ SRL851	3.88±0.18 b	6.75±0.28 bc	5.34±0.83 bc
	For c+ SRL871	4.31±0.15 b	7.50±0.29 c	7.07±0.70 b
	For c+ SRL917	3.63±0.13 b	6.64±0.20 bc	3.41±0.39 cd
	For c+ SRL969	3.63±0.13 b	6.50±0.17 bc	3.36±0.44 cd
	For c+ SRL971	4.06±0.17 b	6.90±0.31 bc	5.07±0.71 bcd
	For c+ SRL987	4.19±0.14 b	7.13±0.21 bc	5.73±0.68 bc
	For c+ SRL1302	3.94±0.17 b	6.93±0.27 bc	4.43±0.70 bcd
	For c+ SRL1324	4.25±0.17 b	7.41±0.14 bc	4.12±0.47 cd

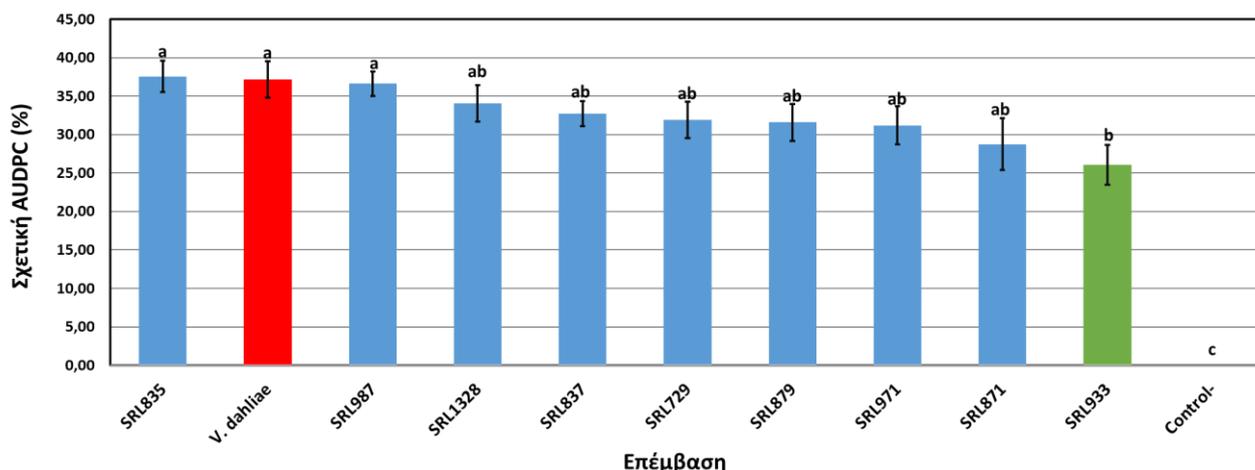
\*Εντός των στηλών, οι τιμές οι οποίες ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σύμφωνα με τη δοκιμασία Tukey HSD με  $P \leq 0.05$ .



**Εικόνα 4.5.2-** Επαναπομονώσεις του μύκητα *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicum-cucumerinum* των επεμβάσεων Control-, F.o.r.c., F.o.r.c.+SRL837 και F.o.r.c.+SRL871. Σε πράσινο πλαίσιο απεικονίζονται οι επεμβάσεις που επέφεραν σημαντικές στατιστικές διαφορές σε σύγκριση με το θετικό μάρτυρα (κόκκινο πλαίσιο).

## Παθοσύστημα 2) Μελιτζάνα-*Verticillium dahliae* (απομόνωση 999-1)

Από τα 9 βακτηριακά στελέχη που αξιολογήθηκαν (SRL835, SRL987, SRL1328, SRL837, SRL729, SRL879, SRL971, SRL871 και SRL933), ένα στέλεχος (SRL933) μείωσε σημαντικά τα συμπτώματα της ασθένειας της βερτισιλλίωσης σε φυτά μελιτζάνας (**Εικόνα 4.5.2-23**). Βάσει των αποτελεσμάτων που απεικονίζονται την **Εικόνα 4.5.2-22**, το βακτηριακό στέλεχος με κωδικό SRL933 εμφάνισε στατιστικά χαμηλότερες τιμές της Σχετικής AUDPC (%) (26,09%) σε σύγκριση με τον θετικό μάρτυρα (37,19%). Στατιστικά σημαντικές διαφορές δεν παρατηρήθηκαν για καμία άλλη παράμετρο ασθένειας για το εν λόγω παθοσύστημα σε σύγκριση με τον θετικό μάρτυρα (**Πίνακας 4.5.2-21**). Ομοίως, για τις παραμέτρους φυτικής ανάπτυξης δεν παρατηρήθηκε κάποια σημαντική διαφορά σχετικά με τον αριθμό συνολικών φύλλων, το ύψος των φυτών και το νωπό τους βάρος (**Πίνακας 4.5.2-22**).



**Εικόνα 4.5.2-22.** Σχετική AUDPC (%) στα φυτά μελιτζάνας των επεμβάσεων του αρνητικού (Control-) και του θετικού μάρτυρα (V.d.) καθώς και των επεμβάσεων με τα 9 υπό αξιολόγηση βακτηριακά στελέχη. Η πράσινη μπάρα αντιπροσωπεύει την επέμβαση που επέδειξε στατιστικές διαφορές σε σύγκριση με το θετικό μάρτυρα (κόκκινη μπάρα) σύμφωνα με τη στατιστική δοκιμασία του Tukey.



**Εικόνα 4.5.2-23.** Συμπτώματα της βερτισιλλίωσης σε φυτά μελιτζάνας των επεμβάσεων Control-, V.d., V.d.+SRL835 V.d.+SRL933 στις 22 ημέρες από την μόλυνση. Σε πράσινο πλαίσιο απεικονίζονται οι επεμβάσεις που επέφεραν σημαντικές στατιστικές διαφορές σε σύγκριση με το θετικό μάρτυρα (κόκκινο πλαίσιο).

**Πίνακας 4.5.2-21.** Μέσες τιμές και τυπικά σφάλματα ( $\pm$ ) των μετρήσεων των παραμέτρων της ασθένειας της βερτισιλλίωσης σε φυτά μελιτζάνας.

Τύπος βιοδοκιμών	Επέμβαση	Παράμετροι ασθένειας				
		Τελική ένταση της ασθένειας (%)	Σχετική AUDPC (%)	Σοβαρότητα της ασθένειας (%)	Θνησιμότητα (%)	Συχνότητα επαναπομόνωσης (0-1)
<i>In planta</i>	Control	0.00 $\pm$ 0.0 b	0.00 $\pm$ 0.0 c	0.00 $\pm$ 0.0 b	0.00 $\pm$ 0.0 c	0.00 $\pm$ 0.0 b
	V.d.	79.51 $\pm$ 1.7 a	37.19 $\pm$ 2.3 a	100.00 $\pm$ 0.0 a	80.00 $\pm$ 13.3 ab	1.00 $\pm$ 0.0 a
	V.d.+ SRL729	77.75 $\pm$ 1.3 a	31.91 $\pm$ 2.4 ab	100.00 $\pm$ 0.0 a	80.00 $\pm$ 13.3 ab	1.00 $\pm$ 0.0 a
	V.d.+ SRL835	76.37 $\pm$ 1.6 a	37.57 $\pm$ 2.0 a	100.00 $\pm$ 0.0 a	73.33 $\pm$ 13.3 ab	1.00 $\pm$ 0.0 a
	V.d.+ SRL837	75.07 $\pm$ 1.6 a	32.71 $\pm$ 1.6 ab	100.00 $\pm$ 0.0 a	46.66 $\pm$ 13.3 bc	0.80 $\pm$ 0.1 a
	V.d.+ SRL871	70.39 $\pm$ 5.8 a	28.73 $\pm$ 3.4 ab	93.33 $\pm$ 6.6 a	80.00 $\pm$ 13.3 ab	1.00 $\pm$ 0.0 a
	V.d.+ SRL879	76.11 $\pm$ 1.5 a	31.58 $\pm$ 2.4 ab	100.00 $\pm$ 0.0 a	66.67 $\pm$ 10.54 ab	0.87 $\pm$ 0.1 a
	V.d.+ SRL933	75.89 $\pm$ 2.3 a	26.09 $\pm$ 2.6 b	100.00 $\pm$ 0.0 a	60.00 $\pm$ 12.4 ab	0.87 $\pm$ 0.1 a
	V.d.+ SRL971	77.35 $\pm$ 1.2 a	31.19 $\pm$ 2.5 ab	100.00 $\pm$ 0.0 a	73.34 $\pm$ 6.6 ab	0.87 $\pm$ 0.1 a
	V.d.+ SRL987	76.86 $\pm$ 1.7 a	36.62 $\pm$ 1.6 a	100.00 $\pm$ 0.0 a	73.33 $\pm$ 12.4 ab	1.00 $\pm$ 0.0 a
	V.d.+ SRL1328	80.20 $\pm$ 0.2 a	34.04 $\pm$ 2.4 ab	100.00 $\pm$ 0.0 a	100.00 $\pm$ 0.0 a	1.00 $\pm$ 0.0 a

\*Στον παραπάνω πίνακα απεικονίζονται οι τιμές της Τελικής Έντασης των συμπτωμάτων της Ασθένειας (Τ.Ε.Α.), της Σχετικής AUDPC (Σχ. AUDPC), της Σοβαρότητας της ασθένειας, της Θνησιμότητας και της Συχνότητας Επαναπομόνωσης (Σ.Ε.). Εντός των στηλών, οι τιμές οι οποίες ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σύμφωνα με τη δοκιμασία *Tukey HSD* με  $P \leq 0.05$ . Κάθε τιμή αντιπροσωπεύει το μέσο όρο 17 φυτών.

**Πίνακας 4.5.2-22.** Μέσες τιμές και τυπικά σφάλματα ( $\pm$ ) των μετρήσεων των παραμέτρων της φυτικής ανάπτυξης σε φυτά μελιτζάνας.

Τύπος βιοδοκιμών	Επέμβαση	Φυτικοί παράμετροι		
		Αριθμός συνολικών φύλλων	Ύψος φυτών (cm)	Νοπό βάρος φυτών (g)
<i>In planta</i>	Control	6.35 $\pm$ 0.23 a	6.55 $\pm$ 0.21 a	5.72 $\pm$ 0.16 a
	V.d.	5.51 $\pm$ 0.13 b	6.39 $\pm$ 0.13 ab	1.72 $\pm$ 0.10 bc
	V.d.+ SRL729	5.24 $\pm$ 0.14 b	6.21 $\pm$ 0.13 abc	1.95 $\pm$ 0.12 bc
	V.d.+ SRL835	5.18 $\pm$ 0.13 b	6.06 $\pm$ 0.13 abc	1.55 $\pm$ 0.07 bc
	V.d.+ SRL837	5.29 $\pm$ 0.26 ab	6.09 $\pm$ 0.13 abc	1.69 $\pm$ 0.15 bc
	V.d.+ SRL871	5.35 $\pm$ 0.12 b	5.85 $\pm$ 0.13 bc	1.80 $\pm$ 0.19 bc
	V.d.+ SRL879	5.47 $\pm$ 0.21 b	5.84 $\pm$ 0.10 bc	1.84 $\pm$ 0.12 bc
	V.d.+ SRL933	5.71 $\pm$ 0.25 ab	5.62 $\pm$ 0.10 c	2.20 $\pm$ 0.18 b
	V.d.+ SRL971	5.12 $\pm$ 0.12 b	6.09 $\pm$ 0.12 abc	1.95 $\pm$ 0.18 bc
	V.d.+ SRL987	5.29 $\pm$ 0.11 b	6.03 $\pm$ 0.13 abc	1.52 $\pm$ 0.08 c
	V.d.+ SRL1328	5.06 $\pm$ 0.06 b	6.10 $\pm$ 0.13 abc	1.85 $\pm$ 0.13 bc

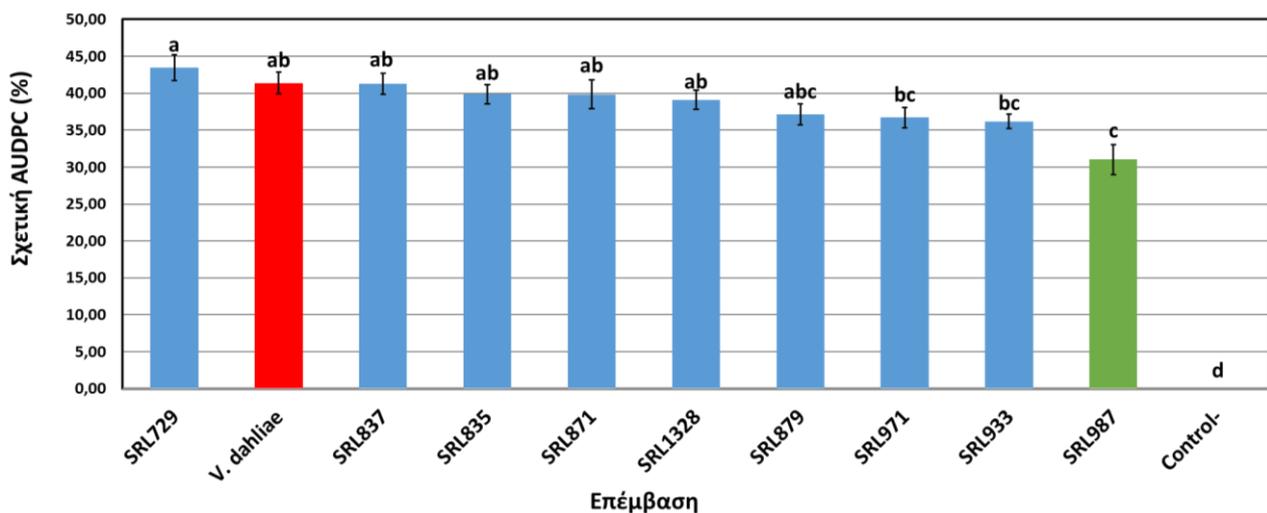
\*Εντός των στηλών, οι τιμές οι οποίες ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σύμφωνα με τη δοκιμασία *Tukey HSD* με  $P \leq 0.05$ .

### Παθοσύστημα 3) Τομάτα-*Verticillium dahliae* (απομόνωση 999-1)

Από τα 9 βακτηριακά στελέχη που αξιολογήθηκαν (SRL729, SRL835, SRL837, SRL871, SRL879, SRL933, SRL971, SRL987 και SRL1328), ένα στέλεχος (SRL987) μείωσε

σημαντικά τα συμπτώματα της ασθένειας της βερτισιλλίωσης σε φυτά τομάτας (**Εικόνα 4.5.2-25**). Βάσει των αποτελεσμάτων που απεικονίζονται την **Εικόνα 4.5.2-24**, το βακτηριακό στέλεχος με κωδικό SRL933 εμφάνισε στατιστικά χαμηλότερες τιμές της Σχετικής AUDPC (%) (31,03%) σε σύγκριση με τον θετικό μάρτυρα (41,39%). Επίσης, αναφορικά με την Τελική Ένταση της Ασθένειας (%), δύο βακτηριακά στελέχη με κωδικούς SRL879 (48,33%) και SRL987 (46,43%) επέφεραν στατιστικά σημαντική μείωση σε σύγκριση με τον θετικό μάρτυρα (55.91%). Σχετικά με τη συχνότητα επαναπομόνωσης, δεν παρατηρήθηκε κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά (**Πίνακας 4.5.2-23**).

Αναφορικά με τις παραμέτρους φυτικής ανάπτυξης, δύο βακτηριακά στελέχη με κωδικούς SRL933 (8,25) και SRL1328 (8,19) επέφεραν στατιστικά σημαντική αύξηση στον αριθμό των συνολικών φύλλων των φυτών σε σχέση με το θετικό μάρτυρα (7,31) ενώ δεν διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στις υπόλοιπες παραμέτρους φυτικής ανάπτυξης (**Πίνακας 4.5.2-24**).



**Εικόνα 4.5.2-24.** Σχετική AUDPC (%) στα φυτά τομάτας των επεμβάσεων του αρνητικού (Control-) και του θετικού μάρτυρα (V.d.) καθώς και των επεμβάσεων με τα 9 υπό αξιολόγηση βακτηριακά στελέχη. Η πράσινη μπάρα αντιπροσωπεύει την επέμβαση που επέδειξε στατιστικές διαφορές σε σύγκριση με το θετικό μάρτυρα (κόκκινη μπάρα) σύμφωνα με τη στατιστική δοκιμασία του Tukey.



**Εικόνα 4.5.2-25.** Συμπτώματα της βερτισιλλίωσης σε φυτά μελιτζάνας των επεμβάσεων Control-, V.d., V.d.+SRL729 V.d.+SRL987 στις 27 ημέρες από την μόλυνση. Σε πράσινο πλαίσιο απεικονίζονται οι επεμβάσεις που επέφεραν σημαντικές στατιστικές διαφορές σε σύγκριση με το θετικό μάρτυρα (κόκκινο πλαίσιο).

**Πίνακας 4.5.2-23.** Μέσες τιμές και τυπικά σφάλματα ( $\pm$ ) των μετρήσεων των παραμέτρων της ασθένειας της βερτισιλλίωσης σε φυτά τομάτας.

Τύπος βιοδοκιμών	Επέμβαση	Πάραμετροι ασθένειας		
		Τελική ένταση ασθένειας (%)	Σχετική AUDPC (%)	Συχνότητα επαναπομόνωσης (0-1)
<i>In planta</i>	Control	0.00 $\pm$ 0.0 d	0.00 $\pm$ 0.0 a	0.00 $\pm$ 0.0 a
	V.d.	55.91 $\pm$ 1.31 a	41.39 $\pm$ 1.46 ab	0.67 $\pm$ 0.0 a
	V.d.+SRL729	52.90 $\pm$ 1.14 ab	43.48 $\pm$ 1.76 a	0.67 $\pm$ 0.0 a
	V.d.+SRL835	54.30 $\pm$ 1.26 ab	39.86 $\pm$ 1.28 ab	0.71 $\pm$ 0.4 a
	V.d.+SRL837	50.19 $\pm$ 1.25 abc	41.26 $\pm$ 1.43 ab	0.67 $\pm$ 0.0 a
	V.d.+SRL871	55.16 $\pm$ 1.64 a	39.85 $\pm$ 1.98 ab	0.70 $\pm$ 0.4 a
	V.d.+SRL879	48.33 $\pm$ 1.37 bc	37.14 $\pm$ 1.39 abc	0.67 $\pm$ 0.0 a
	V.d.+SRL933	51.38 $\pm$ 1.59 abc	36.20 $\pm$ 0.95 bc	0.67 $\pm$ 0.0 a
	V.d.+SRL971	52.12 $\pm$ 1.08 abc	36.17 $\pm$ 1.36 bc	0.70 $\pm$ 0.0 a
	V.d.+SRL987	46.43 $\pm$ 2.05 c	31.03 $\pm$ 2.04 c	0.67 $\pm$ 0.0 a
	V.d.+SRL1328	50.45 $\pm$ 0.96 abc	39.09 $\pm$ 1.29 ab	0.70 $\pm$ 0.0 a

\*Στον παραπάνω πίνακα απεικονίζονται οι τιμές της Τελικής Έντασης των συμπτωμάτων της Ασθένειας (Τ.Ε.Α.), της Σχετικής AUDPC (Σχ. AUDPC) και της Συχνότητας Επαναπομόνωσης (Σ.Ε.). Εντός των στηλών, οι τιμές οι οποίες ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σύμφωνα με τη δοκιμασία Tukey HSD με  $P \leq 0.05$ . Κάθε τιμή αντιπροσωπεύει το μέσο όρο 16 φυτών.

**Πίνακας 4.5.2-24.** Μέσες τιμές και τυπικά σφάλματα ( $\pm$ ) των μετρήσεων των παραμέτρων της φυτικής ανάπτυξης σε φυτά τομάτας.

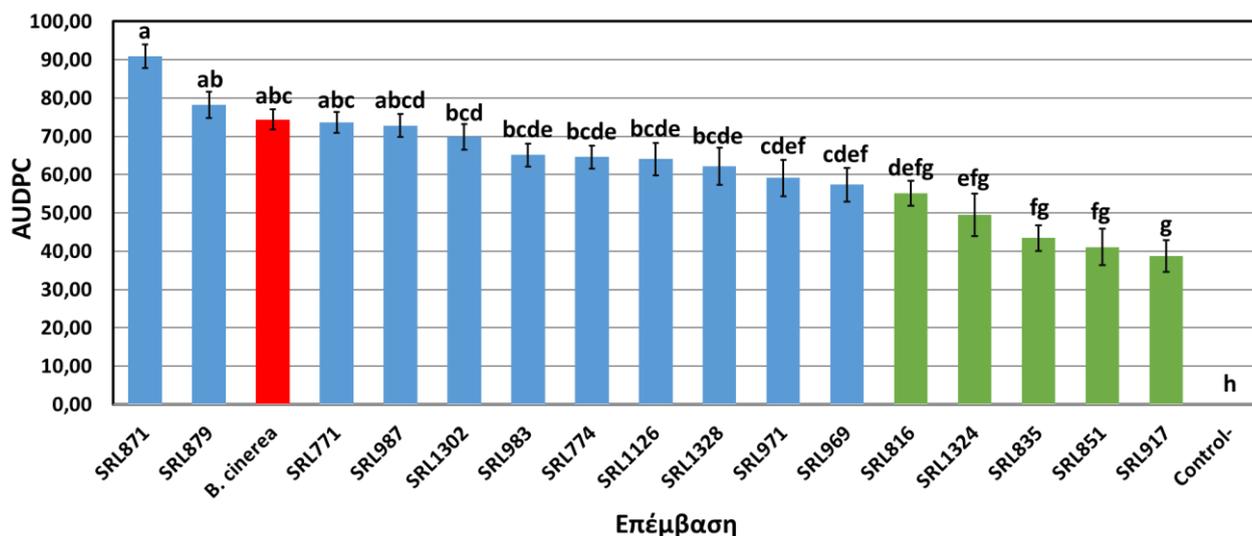
Τύπος βιοδοκιμών	Επέμβαση	Φυτικοί παράμετροι		
		Αριθμός συνολικών φύλλων	Ύψος φυτών (cm)	Νωπό βάρος φυτών (g)
<i>In planta</i>	Control	8.06 $\pm$ 0.06 ab	43.09 $\pm$ 0.97 c	17.41 $\pm$ 0.50 a
	V.d.	7.31 $\pm$ 0.21 b	27.63 $\pm$ 1.11 bc	10.25 $\pm$ 0.62 b
	V.d.+SRL729	7.89 $\pm$ 0.10 ab	27.22 $\pm$ 0.97 bc	9.68 $\pm$ 0.54 b
	V.d.+SRL835	7.87 $\pm$ 0.13 ab	28.10 $\pm$ 0.75 bc	10.16 $\pm$ 0.47 b
	V.d.+SRL837	8.00 $\pm$ 0.15 ab	28.41 $\pm$ 1.38 b	10.91 $\pm$ 0.78 b
	V.d.+SRL871	7.69 $\pm$ 0.26 ab	23.66 $\pm$ 1.20 c	8.90 $\pm$ 0.97 b
	V.d.+SRL879	7.75 $\pm$ 0.17 ab	24.00 $\pm$ 0.93 bc	9.29 $\pm$ 0.85 b
	V.d.+SRL933	8.25 $\pm$ 0.14 a	27.19 $\pm$ 0.67 bc	12.25 $\pm$ 0.38 b
	V.d.+SRL971	7.81 $\pm$ 0.18 ab	26.38 $\pm$ 1.04 bc	9.97 $\pm$ 0.77 b
	V.d.+SRL987	8.06 $\pm$ 0.23 ab	24.69 $\pm$ 0.85 bc	10.72 $\pm$ 1.03 b
	V.d.+SRL1328	8.19 $\pm$ 0.20 a	25.49 $\pm$ 0.76 bc	10.49 $\pm$ 0.56 b

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

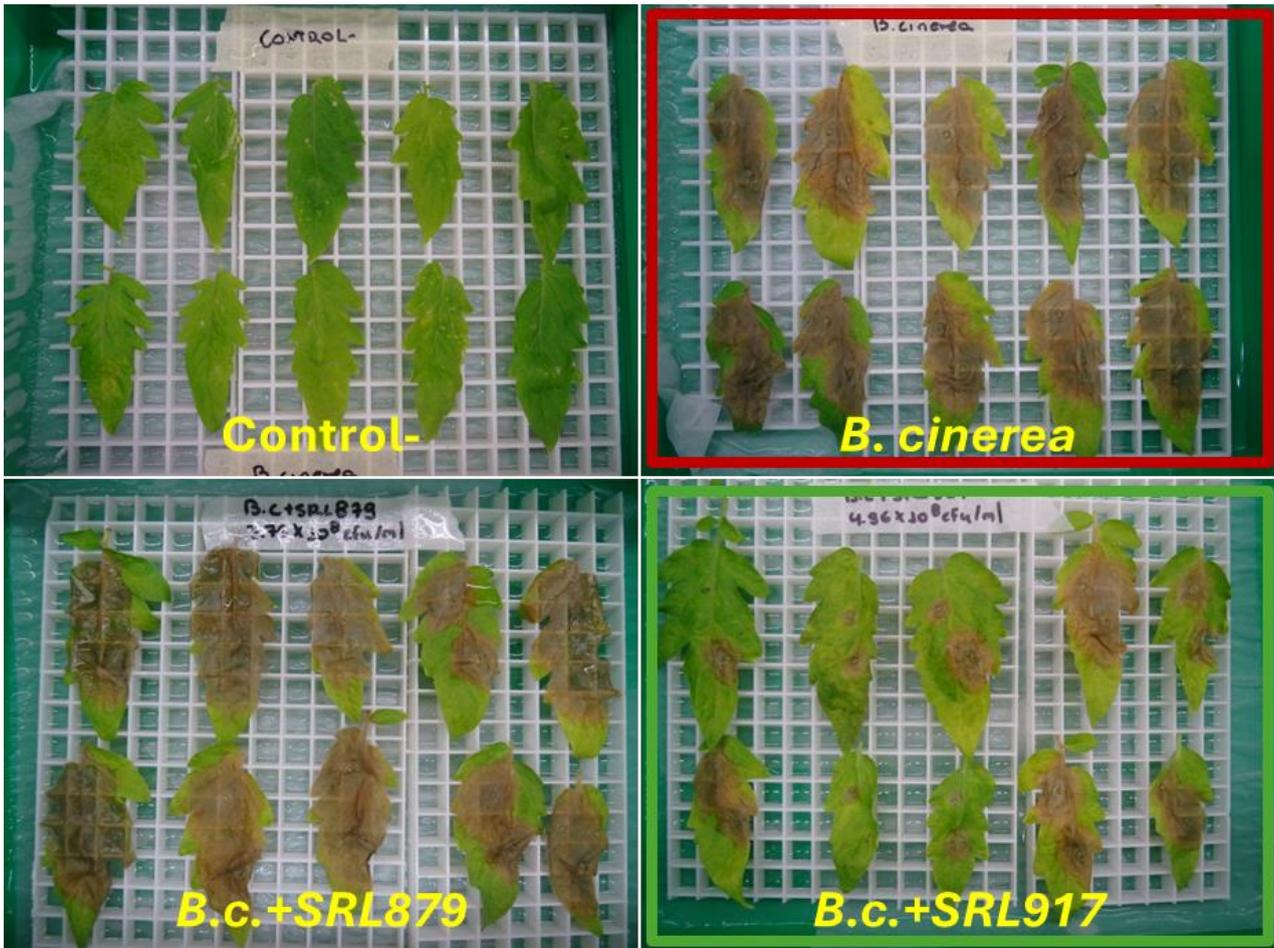
#### Παθοσύστημα 4) Τομάτα-*Botrytis cinerea* (απομόνωση B.14.9)

Από τα 16 (SRL871, SRL879, SRL771, SRL987, SRL1302, SRL983, SRL774, SRL1126, SRL1328, SRL971, SRL969, SRL816, SRL1324, SRL835, SRL851 και SRL917) βακτηριακά στελέχη που αξιολογήθηκαν, διαπιστώνεται ότι 5 βακτηριακά στελέχη (SRL917, SRL851, SRL835, SRL1324 και SRL816) μείωσαν στατιστικά σημαντικά την τιμή της AUDPC (38.71, 41.13, 43.49, 49.46 και 55.15, αντίστοιχα) σε σχέση με τον

θετικό μάρτυρα (74.38) (**Εικόνα 4.5.2-26**). Επιπροσθέτως, 4 από τα 5 προαναφερόμενα στελέχη (SRL835, SRL851, SRL917 και SRL1324) μείωσαν στατιστικά σημαντικά και τη διάμετρο της κηλίδας σε mm (21.48, 19.0, 19.23 και 21.78, αντίστοιχα) σε σχέση με τον θετικό μάρτυρα (29,30 mm) που προήλθε από τη μόλυνση με το μύκητα *Botrytis cinerea* (Πίνακας 25).



**Εικόνα 4.5.2-26.** AUDPC στα φυλλάρια τομάτας των επεμβάσεων του αρνητικού (Control-) και του θετικού μάρτυρα (V.d.) καθώς και των επεμβάσεων με τα 16 υπό αξιολόγηση βακτηριακά στελέχη. Η πράσινη μπάρα αντιπροσωπεύει την επέμβαση που επέδειξε στατιστικές διαφορές σε σύγκριση με το θετικό μάρτυρα (κόκκινη μπάρα) σύμφωνα με τη στατιστική δοκιμασία του *Tukey*.



**Εικόνα 4.5.2-27.** Συμπτώματα της της ασθένειας του βοτρυτή σε αποκομμένα φυλλάρια τομάτας των επεμβάσεων Control-, B.c., B.c.+SRL789 και B.c.+SRL917 στις 6 ημέρες από την μόλυνση. Σε πράσινο πλαίσιο απεικονίζονται οι επεμβάσεις που επέφεραν σημαντικές στατιστικές διαφορές σε σύγκριση με το θετικό μάρτυρα (κόκκινο πλαίσιο).

**Πίνακας 4.5.2-4.** Μέσες τιμές και τυπικά σφάλματα ( $\pm$ ) των μετρήσεων των παραμέτρων της ασθένειας

του βοτρυτή σε φυλλάρια τομάτας.

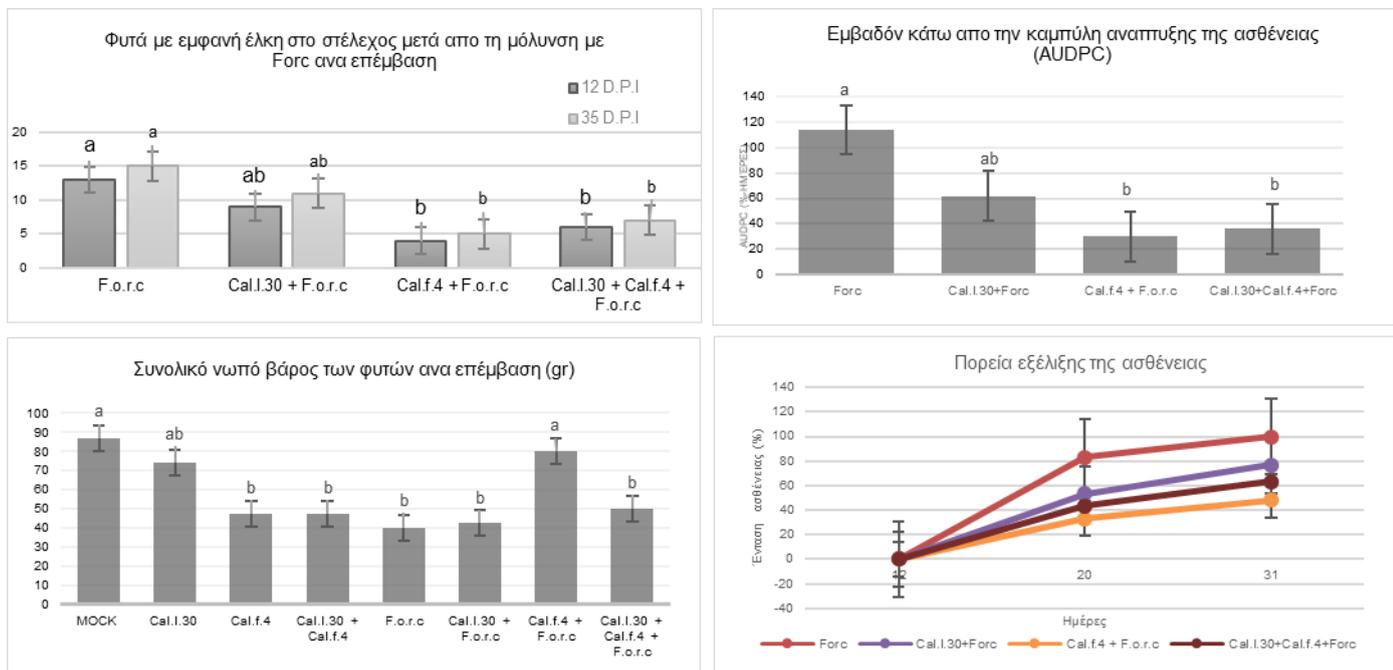
Τύπος βιοδοκιμών	Επέμβαση	Παράμετροι ασθένειας	
		Διάμετρος κηλίδας (mm)	AUDPC
<i>In planta</i>	Control	0.00±0.00 g	0.00±0.00 h
	B.c.	29.30±0.79 abc	74.38±2.62 abc
	B.c.+SRL771	30.15±0.94 abc	73.68±2.69 abc
	B.c.+SRL774	28.45±0.91 abc	64.60±2.95 bcde
	B.c.+SRL816	24.90±1.35 cdef	55.15±3.23 defg
	B.c.+SRL835	21.48±1.63 def	43.49±3.34 fg
	B.c.+SRL851	19.00±2.08 f	41.13±4.70 fg
	B.c.+SRL871	35.03±0.78 a	90.91±3.08 a
	B.c.+SRL879	33.48±1.08 ab	78.21±3.37 ab
	B.c.+SRL917	19.23±1.97 ef	38.71±4.10 g
	B.c.+SRL969	25.20±1.46 cdef	57.40±4.43 cdef
	B.c.+SRL971	23.95±1.25 cdef	59.13±4.81 cdef
	B.c.+SRL983	27.20±0.28 bcd	65.15±3.02 bcde
	B.c.+SRL987	27.15±0.68 bcd	72.78±3.01 abcd
	B.c.+SRL1126	26.13±1.67 cd	64.06±4.26 bcde
	B.c.+SRL1302	27.65±1.13 bcd	69.90±3.37 bcd
	B.c.+SRL1324	21.78±2.10 def	49.46±5.52 efg
B.c.+SRL1328	25.80±1.53 cde	62.18±4.81 bcde	

### 2.2.3 *In vivo-in planta* δοκιμές σε φυτά αγγουριάς και μελιτζάνας μετά από μόλυνση με Forc και Vd

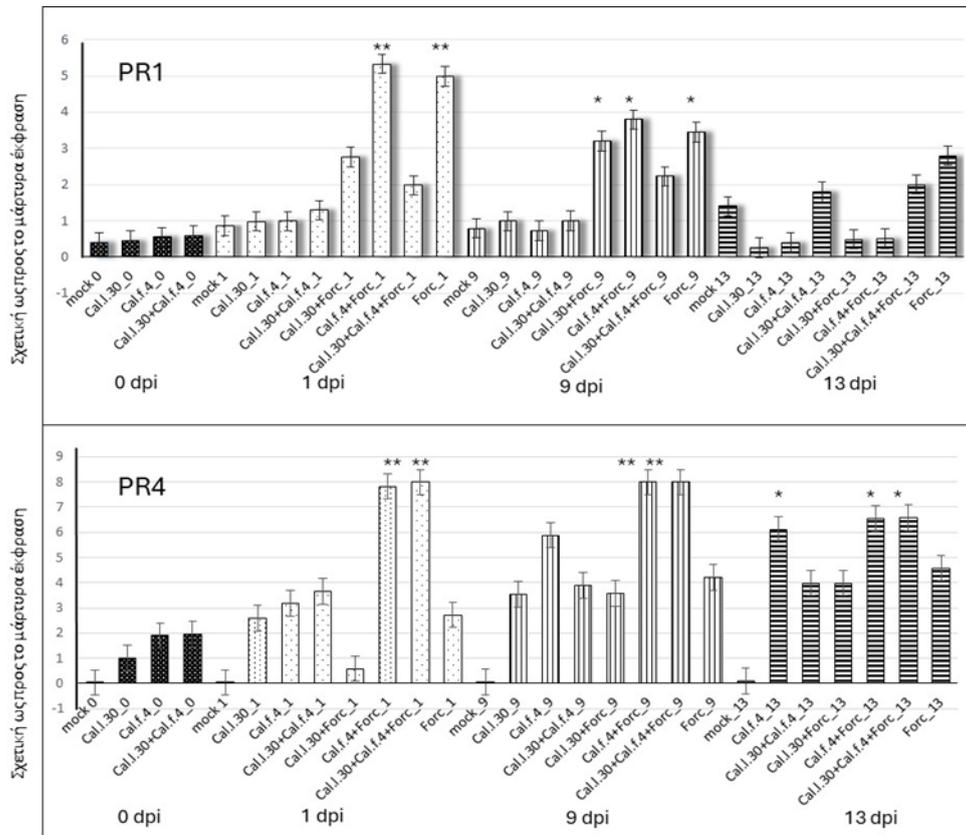
Τα αποτελέσματα των *in vitro* δοκιμών αποτέλεσαν τη βάση για την επιλογή στελεχών που αξιολογήθηκαν στη συνέχεια σε *in vivo/in planta* πειράματα θερμοκηπίου. Στα πειράματα της αγγουριάς, η εφαρμογή των επικρατέστερων στελεχών *B. halotolerans* Cal.l.30 και Cal.f.4, καθώς και του μίγματός τους, αποδείχθηκε εξαιρετικά αποτελεσματική στην αντιμετώπιση της σήψης ριζών και στελέχους που προκαλεί ο Forc. Οι μετρήσεις φυτοπαθολογικών παραμέτρων έδειξαν σημαντική μείωση της έντασης της ασθένειας, ενώ τα φυτά που είχαν δεχθεί εφαρμογή των ενδοφυτικών βακτηρίων παρουσίασαν βελτιωμένη ανάπτυξη, μεγαλύτερο νωπό βάρος υπέργειου τμήματος και υψηλότερη παραγωγή καρπών σε σχέση με τα μολυσμένα αλλά μη προστατευμένα φυτά. Σημαντική ήταν επίσης η διαφοροποίηση μεταξύ ποικιλιών, με τη SB2 να παρουσιάζει μεγαλύτερη ανθεκτικότητα στο Forc, γεγονός που καταδεικνύει την αλληλεπίδραση μικροβιακών παραγόντων και γενετικού υποβάθρου του φυτού.

Οι μετρήσεις του ριζικού συστήματος αποκάλυψαν ότι το μίγμα Cal.l.30+Cal.f.4 επηρέασε σημαντικά τη μορφολογία της ρίζας στα μολυσμένα φυτά, με μείωση του μήκους σε σχέση με τις υπόλοιπες επεμβάσεις. Παρά το φαινομενικά αρνητικό αυτό αποτέλεσμα, το συνολικό βάρος του ριζικού συστήματος και η ζωηρότητα του φυτού

υποδηλώνουν πιθανή ανακατανομή πόρων του φυτού προς αμυντικούς μηχανισμούς ή προς αύξηση της υπέργεια βιομάζας, φαινόμενο που έχει παρατηρηθεί σε φυτά όπου ενεργοποιείται επαγόμενη άμυνα των φυτών (ISR). Πράγματι, τα αποτελέσματα της RT-qPCR ενισχύουν το παραπάνω συμπέρασμα: η έκφραση των γονιδίων PR1 και PR4, που αποτελούν κεντρικούς δείκτες ενεργοποίησης των μονοπατιών άμυνας SA, JA και ET, παρουσίασε αύξηση στα μολυσμένα φυτά, αλλά ακόμη μεγαλύτερη αύξηση στα φυτά όπου εφαρμόστηκαν βιολογικοί παράγοντες, είτε μεμονωμένα είτε σε μίγμα. Η διπλή ενεργοποίηση (μύκητας + βιολογικός παράγοντας) φαίνεται να οδηγεί σε ενισχυμένη απόκριση, γεγονός που εξηγεί τη μειωμένη εκδήλωση συμπτωμάτων.

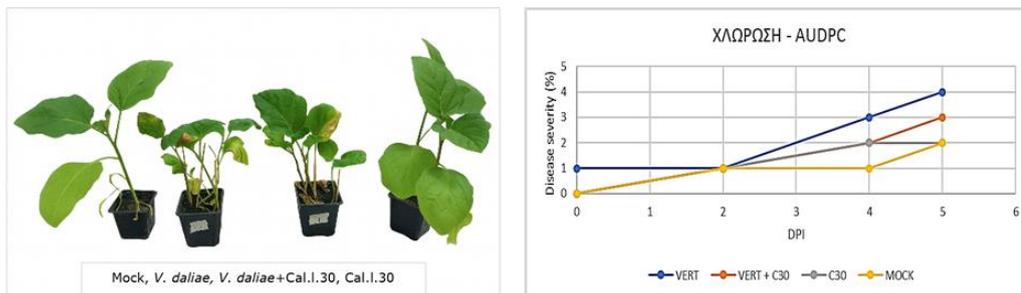


**Εικόνα 4.5.2-28.** Γραφήματα που παρουσιάζουν τη γενική κατάσταση των φυτών που εμφάνισαν το κύριο σύμπτωμα της σήψης ριζών και στελέχους μετά τη μόλυνση με το μύκητα Forc (λευκή εξάνθιση και μονόπλευρα έλκη στο στέλεχος κυρίως γύρω από το λαιμό), το νωπό βάρος των φυτών στο τέλος του πειράματος, το εμβαδόν κάτω από την εξέλιξη της ασθένειας (AUDPC) και την πορεία εξέλιξης της ασθένειας.

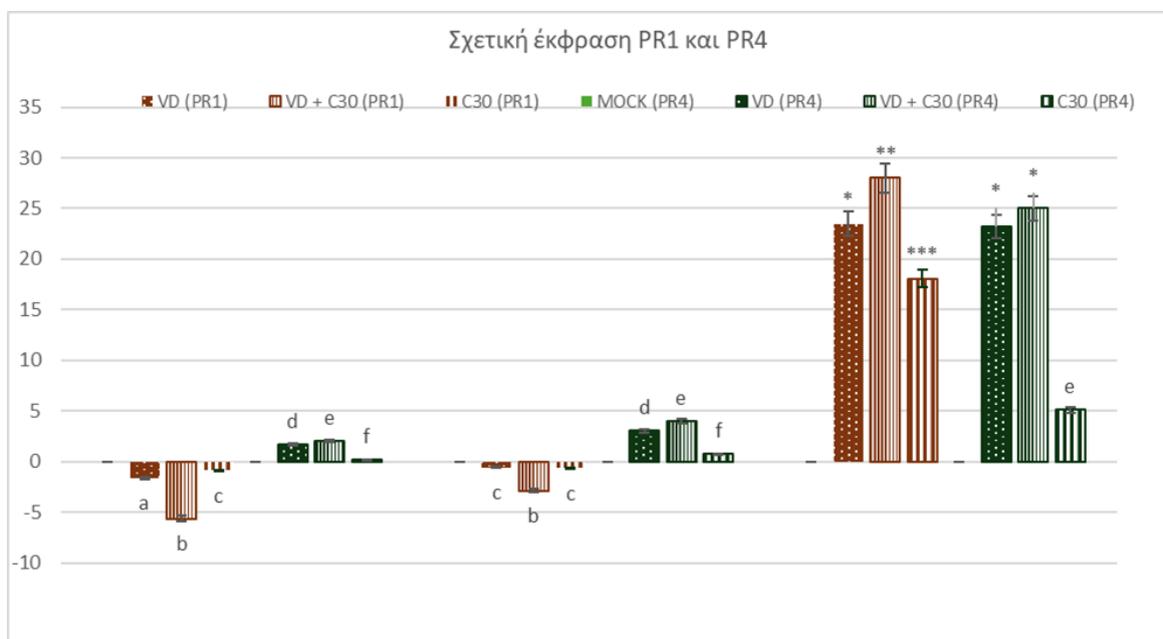


**Εικόνα 4.5.2-29.** Σχετική έκφραση των γονιδίων PR1 και PR4 στα φυτά αγγουριάς (ποικιλία SS1) μολυσμένα με το μύκητα *Forc* και από επέμβαση με τον βιολογικό παράγοντα *B. halotolerans* Cal.l.30 και μίγμα Cal.l.30+Cal.f.4 στα χρονικά διαστήματα 0 dpi, 1 dpi, 9 dpi, 13 dpi (dpi: μέρες μετά τη μόλυνση με τον φυτοπαθογόνο μύκητα *Forc*). Τα φυτά που έχουν μολυνθεί με *Forc* σε σύγκριση με τα μη μολυσμένα φυτά (φυτά Mock και φυτά μόνο με εμβολιασμό με ωφέλιμο βακτήριο) παρουσίασαν αυξημένα επίπεδα έκφρασης PR1. Το γεγονός αυτό διατηρείται έντονα μέχρι την 9η ημέρα μετά τη μόλυνση και φαίνεται να μειώνεται ελάχιστα, ενδεχομένως λόγω της πίεσης του μολύσματος του παθογόνου (αποικισμός και ανάπτυξη παθογόνου μέσα στο φυτό). Όταν εφαρμόστηκε το μείγμα των δύο βακτηριακών στελεχών (Cal.l.30+Cal.f.4) στα φυτά που είχαν μολυνθεί με το παθογόνο *Forc* η έκφραση του PR1 είναι υψηλή, αν και λιγότερο από το επίπεδο των μολυσμένων φυτών που δέχτηκαν επέμβαση μόνο με το Cal.l.30 και Cal.f.4, το οποίο, όμως, διατηρείται σταθερό μέχρι και τη 13η ημέρα. Σε ό,τι αφορά την έκφραση του PR4 παρατηρούμε ιδιαίτερα υψηλά επίπεδα έκφρασης στα υγιή δείγματα που είχαν υποστεί εμβολιασμό με το Cal.l.30 και με το μίγμα των δύο βακτηριακών στελεχών (Cal.l.30+Cal.f.4), όπως επίσης και στα φυτά μολυσμένα με *Forc* και με επέμβαση Cal.l.30 και με το μίγμα των δύο βακτηριακών στελεχών (Cal.l.30+Cal.f.4).

Στην περίπτωση της μελιτζάνας, η εφαρμογή του *B. halotolerans* Cal.l.30 απέναντι στο *V. dahliae* οδήγησε σε μείωση της εξεταζόμενης ασθένειας κατά περίπου 50%, ενώ η τεχνική seed biopriming συνέβαλε σημαντικά στην αρχική ευρωστία των φυτών πριν τη μόλυνση, προάγοντας ταχύτερη ανάπτυξη και πιθανώς ισχυρότερη αρχική ανοσολογική προετοιμασία του φυτού. Τα αποτελέσματα της γονιδιακής έκφρασης ενισχύουν ότι ο μικροβιακός παράγοντας συμβάλλει στην ενεργοποίηση των αμυντικών μηχανισμών πριν και μετά τη μόλυνση, καθώς η αυξημένη έκφραση των PR1 και PR4 στην 5η ημέρα ήταν χαρακτηριστική στα φυτά που είχαν δεχθεί εφαρμογή του Cal.l.30. Είναι χαρακτηριστικό ότι στη μελιτζάνα, όπου το *V. dahliae* προκαλεί συστηματική μάρανση, η υπερέκφραση των PR γονιδίων εμφανίζεται πολύ εντονότερη στα μολυσμένα φυτά, γεγονός συμβατό με την ενεργοποίηση SAR και ISR.



**Εικόνα 4.5.2-20.** Συμπτώματα της βερτισιλίωσης της μελιτζάνας στις 3 επεμβάσεις (μάρτυρας mock, *V. dahliae*, *V. dahliae*+Cal.I.30, Cal.I.30) και το εμβαδόν κάτω από την εξέλιξη της ασθένειας (AUDPC) βάσει των συμπτωμάτων της χλώρωσης-μάρανσης των φύλλων της μελιτζάνας ανά επέμβαση.



**Εικόνα 4.5.2-31.** Σχετική έκφραση των γονιδίων PR1 και PR4 στα φυτά μελιτζάνας μετά από επέμβαση με τον βιολογικό παράγοντα *B. halotolerans* Cal.I.30 στα χρονικά διαστήματα 0 dpi, 1 dpi, 5 dpi (dpi: μέρες μετά τη μόλυνση με *V. dahliae*). Η έκφραση των γονιδίων PR1 και PR4, την 5<sup>η</sup> ημέρα μετά την μόλυνση των φυτών με *V. dahliae*, είναι αυξημένη συγκριτικά με τις μέρες 0 και 1, αλλά στα φυτά στα οποία έχει εφαρμοστεί ο βιολογικός παράγοντας *B. halotolerans* Cal.I.30 καταγράφηκε επιπλέον σχετική αύξηση της έκφρασης (καστανός χρωματισμός στηλών: έκφραση PR1, πράσινος χρωματισμός στηλών: έκφραση PR4).

Συνολικά, τα αποτελέσματα καταδεικνύουν ότι τα ενδοφυτικά *Bacillus* λειτουργούν με συνδυαστικούς μηχανισμούς:

1. Άμεση παρεμπόδιση παθογόνων μέσω παραγωγής αντιβιοτικών μεταβολιτών.
2. Ανταγωνισμός για χώρο και θρεπτικά μέσω ταχείας αποικιοποίησης της ριζόσφαιρας.
3. Επαγόμενη άμυνα των φυτών (ISR) που αποτυπώνεται στην αυξημένη έκφραση PR1 και PR4.
4. Βελτίωση ανάπτυξης φυτών, ιδιαίτερα όταν το στέλεχος ή ο συνδυασμός στελεχών υποστηρίζει την ανάπτυξη της ρίζας και τη συνολική ζωηρότητα.

Η έρευνα επιβεβαιώνει ότι το στέλεχος *B. halotolerans* Cal.f.4 και το μίγμα Cal.I.30+Cal.f.4 αποτελούν ιδιαίτερα υποσχόμενα leads για περαιτέρω ανάπτυξη βιολογικών σκευασμάτων, καθώς παρουσιάζουν υψηλή αποτελεσματικότητα έναντι

εδαφογενών παθογόνων και σταθερή απόδοση σε πειραματικές συνθήκες. Παράλληλα, τα αποτελέσματα ενθαρρύνουν την επέκταση των δοκιμών και σε άλλα παθογόνα, όπως ήδη πραγματοποιείται σε συνεργασία με άλλους φορείς για ωίδια, ωμούκητες και νηματώδεις, δημιουργώντας ένα ευρύτερο πλέγμα χρήσεων των μικροβιακών αυτών απομονώσεων.

Συμπερασματικά, η παρούσα έρευνα καταδεικνύει ότι οι επιλεγμένες ενδοφυτικές απομονώσεις *Bacillus* μπορούν να αποτελέσουν θεμέλιο για την ανάπτυξη καινοτόμων, φιλικών προς το περιβάλλον λύσεων φυτοπροστασίας, υποστηρίζοντας τη μετάβαση σε βιώσιμα συστήματα καλλιέργειας και μειώνοντας την εξάρτηση από χημικά φυτοπροστατευτικά.

### **Ιn vivo βιοδοκιμές σε κοτυληδόνες με μικροβιακές απομονώσεις στο παθοσύστημα αγγούρι - *Podospahera xanthii***

#### **A. Μικροβιακές απομονώσεις στελεχών του γένους *Bacillus***

Για κάθε επέμβαση, χρησιμοποιήθηκαν 3 κοτυληδόνες (3 δείγματα) και σε κάθε δείγμα υπολογίστηκε το ποσοστό βλάστησης των κονιδίων ανά στάδιο ανάπτυξης. Έπειτα, για κάθε επέμβαση υπολογίστηκαν ο μέσος όρος και η τυπική απόκλιση των ποσοστών από τα τρία δείγματα. Στον **Πίνακα 4.5.2- 7** παρουσιάζονται τα ποσοστά βλαστικότητας και της μείωσης της βλαστικότητας συγκριτικά με το νερό, καθώς και ο αριθμός των κονιδίων που καταγράφηκαν, ανά επέμβαση.

**Πίνακας 4.5.2- 8:** Ποσοστά βλάστησης (μέσοι όροι) και μείωσης της βλάστησης κονιδίων του μύκητα *P. xanthii* σε κοτυλιδόνες αγγουριού στις οποίες εφαρμόστηκαν διαφορετικές επεμβάσεις με βιολογικούς παράγοντες. Τα γράμματα δίπλα από τις τιμές δείχνουν τις στατιστικά σημαντικές διαφορές της Ανάλυσης Διασποράς (βάσει της κριτηρίου Tukey σε επίπεδο σημαντικότητας  $p < 0,05$ ). Στην τελευταία στήλη παρουσιάζεται ο συνολικός αριθμός κονιδίων που μετρήθηκαν σε κάθε επέμβαση.

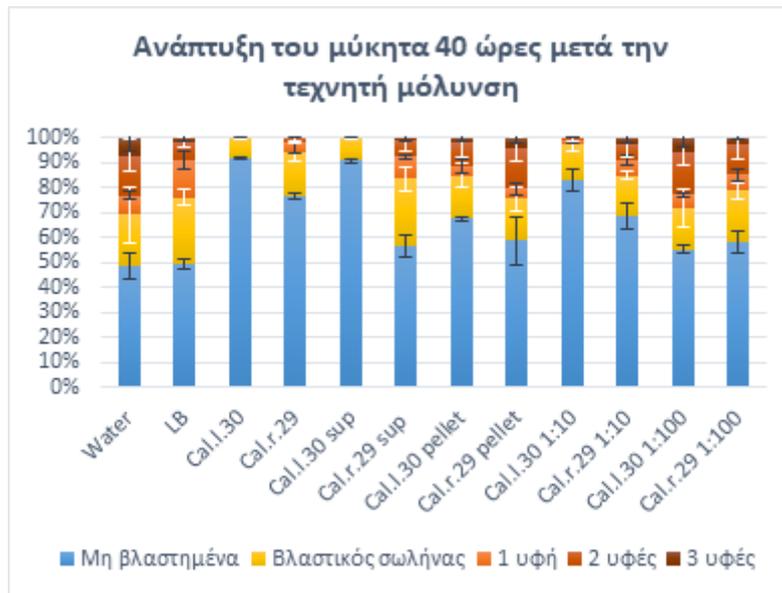
Επεμβάσεις	Βλαστικότητα (%)	Μείωση βλαστικότητας (%)	n
Νερό	51,1 a	-	321
LB	50,3 a	1,54	368
Cal.l.30	8,2 e	83,98	341
Cal.r.29	23,3 cd	54,38	298
Cal.l.30 sup	9,2 e	82,05	338
Cal.r.29 sup	43,1 ab	15,54	281
Cal.l.30 pellet	32,3 bc	36,73	288
Cal.r.29 pellet	40,5 ab	20,69	323
Cal.l.30 1:10	17,2 de	66,31	389
Cal.r.29 1:10	31,6 bc	38,17	318
Cal.l.30 1:100	44,8 a	12,22	309
Cal.r.29 1:100	41,4 ab	18,87	362

Στον **Πίνακα 4.5.2- 27** παρατηρούμε ότι τα ποσοστά βλαστικότητας των κονιδίων είναι παρόμοια για το νερό και το θρεπτικό μέσο LB και τα μέγιστα μεταξύ των υπολοίπων επεμβάσεων. Η καλλιέργεια του βακτηριακού στελέχους Cal.l.30 οδήγησε σε 84% περίπου μείωση στην βλαστικότητα ενώ το στέλεχος Cal.r.29 μόλις σε 54%. Το υπερκείμενο της καλλιέργειας του Cal.l.30 εμφάνισε παρόμοια αποτελεσματικότητα με την καλλιέργεια, ενώ τα βακτηριακά κύτταρα εμφάνισαν 36% μείωση της βλαστικότητας. Συγκριτικά, το υπερκείμενο της καλλιέργειας του Cal.r.29 ήταν λιγότερο αποτελεσματικό στην μείωση της βλαστικότητας (16%) σε σχέση με την καλλιέργεια του στελέχους, ενώ τα βακτηριακά κύτταρα παρεμπόδισαν την βλαστικότητα κατά 21%, συγκριτικά με το νερό. Στην **Εικόνα 4.5.2- 32**, παρατηρούμε ότι η βλαστικότητα του μύκητα αυξάνεται όσο μεγαλώνει ο βαθμός αραιώσης. Μάλιστα, ενώ στις δύο πρώτες συγκεντρώσεις οι καλλιέργεια του Cal.l.30 εμφανίζει μειωμένη βλαστικότητα συγκριτικά με το Cal.r.29, στην αραιώση 1:100 δε παρατηρούμε αυτό το φαινόμενο.

Ωστόσο, μονάχα η βλαστικότητα του μύκητα στις κοτυληδόνες δεν αρκεί για τον προσδιορισμό της συνολικής ανάπτυξης του μύκητα ανά επέμβαση. Στον πίνακα και το γράφημα που ακολουθούν παρουσιάζονται οι μέσοι όροι και οι τυπικές αποκλίσεις των ποσοστών των διαφορετικών αναπτυξιακών σταδίων του μύκητα ανά επέμβαση.

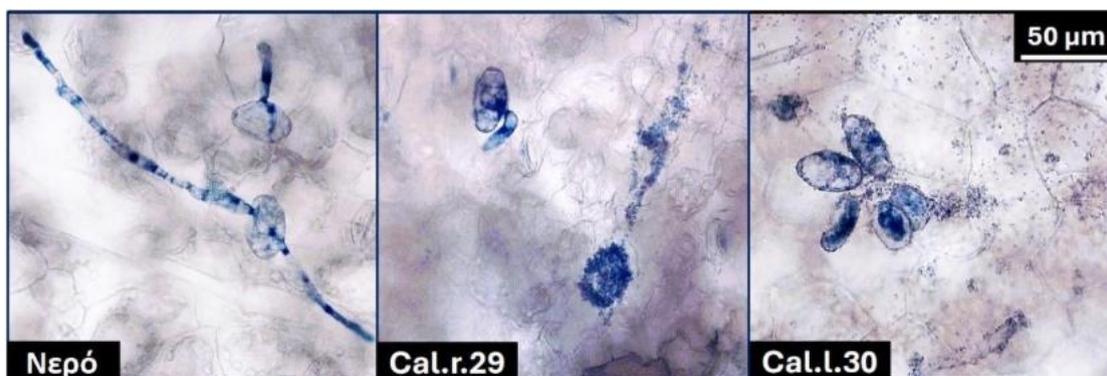
**Πίνακας 4.5.2- 9:** Τα ποσοστά των διαφορετικών αναπτυξιακών σταδίων του μύκητα *P. xanthii* ανά επέμβαση. Υπολογίστηκαν οι μέσοι όροι και οι τυπικές αποκλίσεις από 3 δείγματα ανά επέμβαση. Στην τελευταία στήλη παρουσιάζεται ο αριθμός των κονιδίων (n) που καταγράφηκαν ανά επέμβαση.

Επεμβάσεις	Μέσος όρος ± Τυπική απόκλιση (%)					n
	Μη βλαστημένα	Βλαστικός σωλήνας	1 υφή	2 υφές	3 υφές	
Νερό	48,9 ± 5,3	20,2 ± 11,5	7,8 ± 1,4	16,0 ± 6,7	7,1 ± 5,3	321
LB	49,7 ± 1,9	26,3 ± 3,1	14,9 ± 3,5	7,4 ± 1,9	1,7 ± 1,7	368
Cal.l.30	91,8 ± 0,8	8,2 ± 0,8	0	0	0	341
Cal.r.29	76,7 ± 1,5	17,8 ± 4,1	3,4 ± 4,0	2,1 ± 2,1	0	298
Cal.l.30 sup	90,8 ± 0,8	9,2 ± 0,8	0	0	0	338
Cal.r.29 sup	56,9 ± 4,4	26,8 ± 4,7	8,6 ± 1,1	6,7 ± 4,4	1,0 ± 1,7	281
Cal.l.30 pellet	67,7 ± 0,9	17,1 ± 4,9	3,8 ± 2,6	9,3 ± 5,6	2,1 ± 1,0	288
Cal.r.29 pellet	59,5 ± 9,4	17,0 ± 4,6	4,0 ± 2,7	16,2 ± 5,0	4,6 ± 2,0	323
Cal.l.30 1:10	82,8 ± 4,3	14,7 ± 3,0	1,5 ± 1,3	1,0 ± 1,0	0	389
Cal.r.29 1:10	68,4 ± 5,2	16,4 ± 1,7	6,0 ± 1,8	6,9 ± 5,5	2,2 ± 2,5	318
Cal.l.30 1:100	55,2 ± 1,6	16,4 ± 7,6	5,6 ± 0,8	17,4 ± 5,5	5,4 ± 4,0	309
Cal.r.29 1:100	58,6 ± 4,4	20,1 ± 3,5	6,4 ± 2,2	12,1 ± 5,7	2,9 ± 1,0	362



**Γράφημα 4.5.2- 1:** Σχηματική απεικόνιση των δεδομένων αναπτυξιακών σταδίων του μύκητα *P. xanthii* σε κοτυλιδονες αγγουριού που δέχτηκαν επεμβάσεις με βιολογικούς παράγοντες (από Πίνακας 4.5.2- 10).

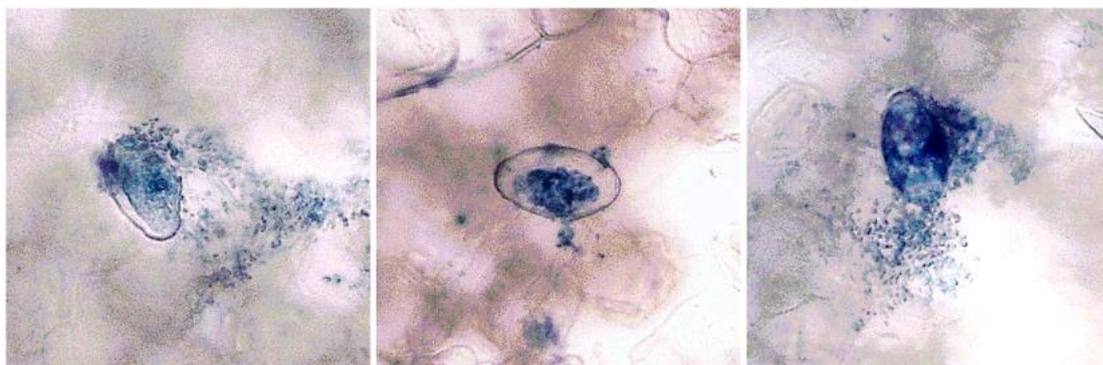
Από τα δεδομένα του πίνακα παρατηρούμε ότι τόσο στην καλλιέργεια του στελέχους Cal.l.30 όσο και στο υπερκείμενο της καλλιέργειας δεν καταγράφηκε κανένα κονίδιο που να έχει αναπτύξει μία, δύο ή τρεις υφές στις κοτυληδόνες που αυτές οι επεμβάσεις εφαρμόστηκαν. Στις συγκεκριμένες επεμβάσεις ο μύκητας έφτασε έως το στάδιο σχηματισμού του βλαστικού σωλήνα. Στην αραιώση 1:10 της καλλιέργειας, καταγράφηκε ένα πολύ μικρό ποσοστό (<5%) κονιδίων με μία και δύο υφές, ενώ στην αραιώση 1:100 της καλλιέργειας καθώς και στο αιώρημα βακτηριακών κυττάρων το ποσοστό αυτό αυξήθηκε σημαντικά. Συγκριτικά, στην καλλιέργεια του Cal.r.29 παρατηρήθηκε ένα μικρό ποσοστό κονιδίων με υφές το οποίο αυξήθηκε σε όλες τις υπόλοιπες επεμβάσεις με το συγκεκριμένο στέλεχος. Τα μεγαλύτερα ποσοστά κονιδίων με υφές σημειώθηκαν στις επεμβάσεις του νερού, του θρεπτικού υλικού καθώς και στις αραιώσεις 1:100 των καλλιεργειών και στα βακτηριακά κύτταρα του Cal.r.29.



**Εικόνα 4.5.2- 32:** Φωτογραφίες από το οπτικό μικροσκόπιο με κονίδια του παθογόνου *P. xanthii*, 40 ώρες μετά τη μόλυνση που δέχτηκαν επεμβάσεις με τα στελέχη Cal.r.29

και Cal.I.30, σε κοτυληδόνες αγγουριού.

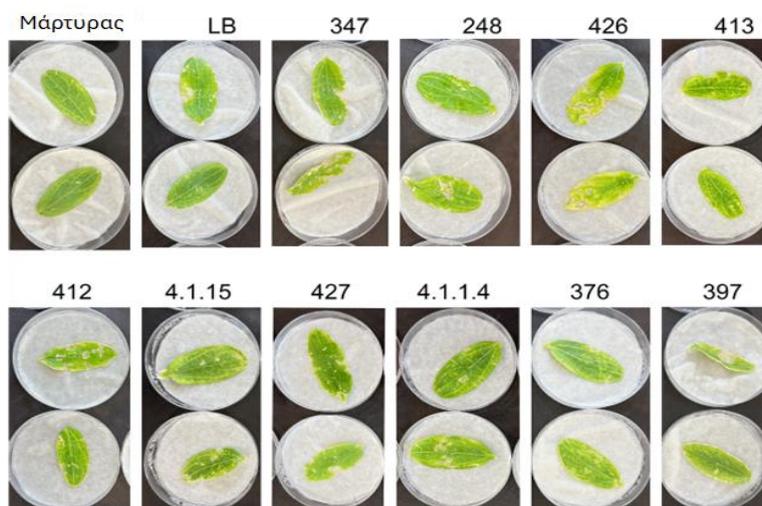
Κατά την καταγραφή των αναπτυξιακών σταδίων των κονιδίων του μύκητα, παρατηρήθηκαν κονίδια με εμφανή συμπτώματα αλλοίωσης της φυσιολογικής τους μορφολογίας όπως ρήξη του κυτταρικού τοιχώματος του μύκητα και διαρροή του κυτταροπλάσματος. Τα συμπτώματα αυτά παρατηρήθηκαν κυρίως στις επεμβάσεις της καλλιέργειας του Cal.I.30, της αραιωμένης κατά 10 φορές καλλιέργειας Cal.I.30 και του υπερκείμενου της καλλιέργειας, και λιγότερο στις επεμβάσεις της καλλιέργειας του Cal.r.29 και της αραιωμένης κατά 10 φορές καλλιέργειας του στελέχους.



**Εικόνα 4.5.2- 33:** Επίδραση των μεταβολιτών που παράγονται από τα στελέχη βακίλλων στην μορφολογία των κονιδίων του μύκητα *P. xanthii*.

*B. Μικροβιακές απομονώσεις στελεχών των γενών Kushneria, Candida και Metschnikowia*

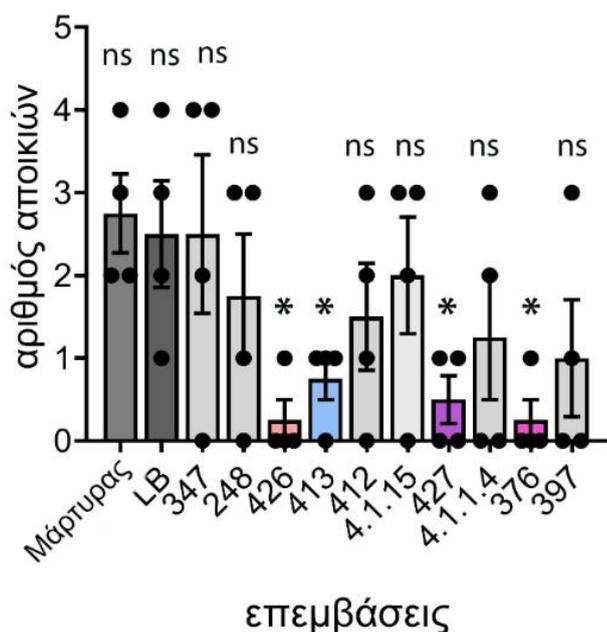
Στην βιοδοκιμή αυτή παρατηρήθηκε φυτοτοξικότητα όπως φαίνεται στην **Εικόνα 4.5.2- 34** που ακολουθεί που πιθανολογείται ότι οφείλεται στον μέσο ανάπτυξης των βακτηρίων ή το στάδιο ανάπτυξης και την ευαισθησία των κοτυληδόνων.



**Εικόνα 4.5.2-34:** Ενδεικτικές φωτογραφίες της *in vivo* βιοδοκιμής μικροβιακών απομονώσεων στελεχών των γενών *Kushneria*, *Candida* και *Metschnikowia* σε

κοτυληδόνες αγγουριού ενάντια στο μύκητα *P. xanthii*.

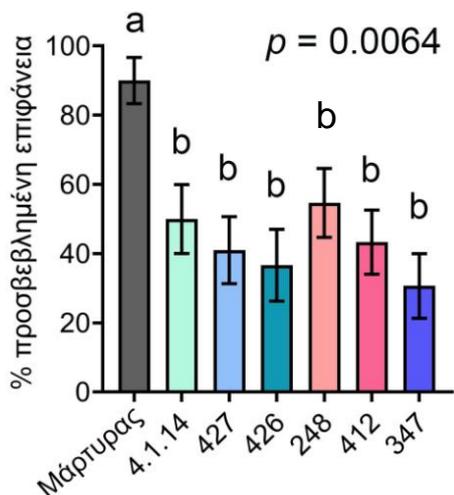
Παρόλη την φυτοτοξικότητα που παρατηρήθηκε πραγματοποιήθηκε αξιολόγηση του επιπέδου προσβολής των κοτυληδόνων, αποτελέσματα τα οποία θα πρέπει να θεωρηθούν αυστηρά και μόνο ως προκαταρκτικά. Όπως φαίνεται στο **Γράφημα 4.5.2-2**, τα στελέχη 426, 413, 427 και 376 του γένους *Kushneria* μείωσαν την ανάπτυξη του παθογόνου στους ιστούς.



**Γράφημα 4.5.2- 2:** Αριθμός εμφανών κηλίδων (σποοκίων) με καρποφορίες του μύκητα *Podosphaera xanthii* σε κοτυληδόνες αγγουριάς. Ο αστερίσκος δηλώνει στατιστικά σημαντική διαφορά ( $p < 0.05$ ) (ns: non-significant)

**Ιη νίνο βιοδοκιμές σε φυλλικούς δίσκους με μικροβιακές απομονώσεις στο παθοσύστημα αγγούρι - *Podosphaera xanthii***

Τα αποτελέσματα του πειράματος παρουσιάζονται στο **Γράφημα 4.5.2- 3**. Όπως φαίνεται όλες οι μικροβιακές απομονώσεις του γένους *Kushneria* και του γένους *Metschnikowia* που δοκιμάστηκαν διέφεραν στατιστικά σημαντικά ως προς το μάρτυρα όσον αφορά στο επίπεδο προσβολής δίσκων από το παθογόνο ενώ δεν διέφεραν σημαντικά μεταξύ τους.



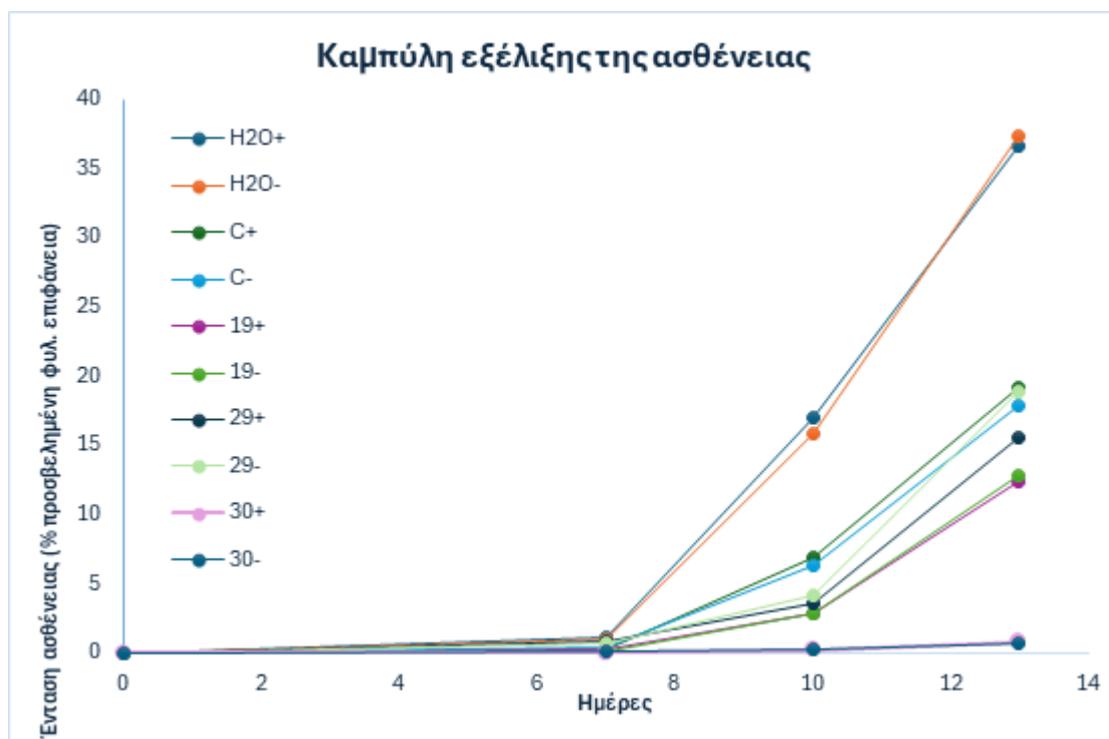
**Γράφημα 4.5.2- 3:** Ποσοστό επιφάνειας φυλλικού δίσκου με ορατά συμπτώματα ωιδίου και καρποφορίες του μύκητα *Podosphaera xanthii*

Όπως φαίνεται στο **Γράφημα 4.5.2- 3**, στελέχη τα οποία από το προηγούμενο πείραμα έδειξαν ενθαρρυντικά αποτελέσματα, όπως τα 426 και 427 μείωσαν την προσβολή από το μύκητα στους δίσκους κατά μ.ο. 58% και το στέλεχος 347 κατά 67%.

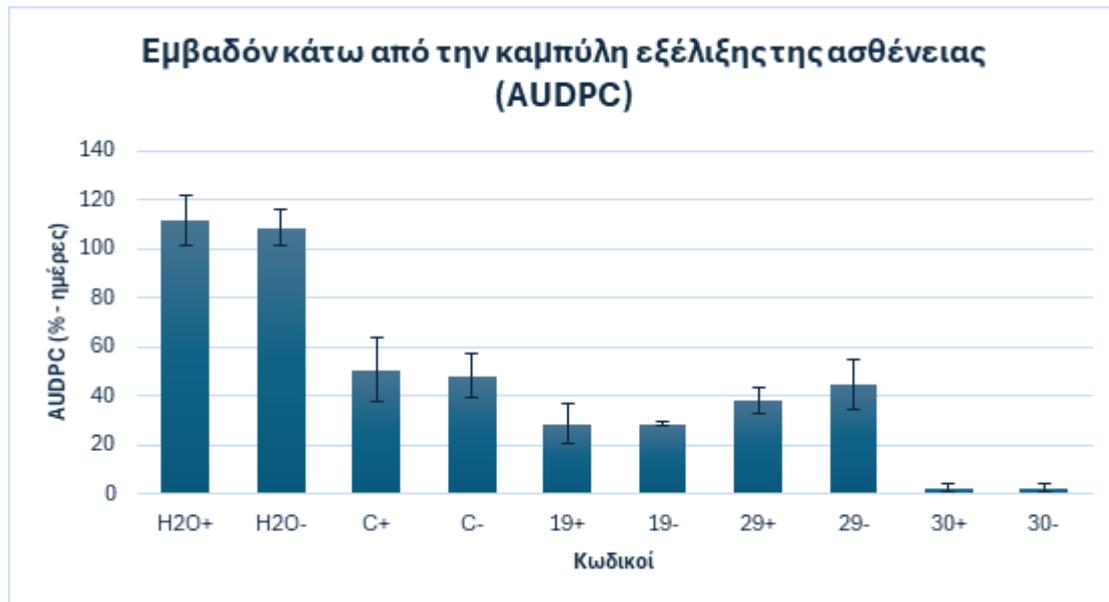
### ***In planta* πειράματα με μικροβιακές απομονώσεις στο παθοσύστημα αγγούρι - *Podosphaera xanthii***

#### ***A. Μικροβιακές απομονώσεις στελεχών του γένους *Bacillus****

Στα γραφήματα που ακολουθούν, απεικονίζονται η πορεία εξέλιξης του ωιδίου των κολοκυνθοειδών (**Γράφημα 4.5.2- 4**) καθώς και το εμβαδόν κάτω από την καμπύλη εξέλιξης της ασθένειας για κάθε επέμβαση (**Γράφημα 4.5.2- 5**).



**Γράφημα 4.5.2- 4:** Καμπύλες ανάπτυξης του ωιδίου στα φύλλα φυτών αγγουριού που δέχτηκαν επεμβάσεις με τα στελέχη *Bacillus Cal.r.19*, *Cal.r.29* *Cal.l.30* (μέσοι όροι % προσβεβλημένης φυλλικής επιφάνειας).



**Γράφημα 4.5.2- 5:** Εμβαδά κάτω από την καμπύλη εξέλιξης του ωϊδίου (% days) μεμονωμένων επεμβάσεων με τα στελέχη *Bacillus Cal.r.19*, *Cal.r.29* *Cal.l.30* (μέσοι όροι και τυπικές αποκλίσεις)

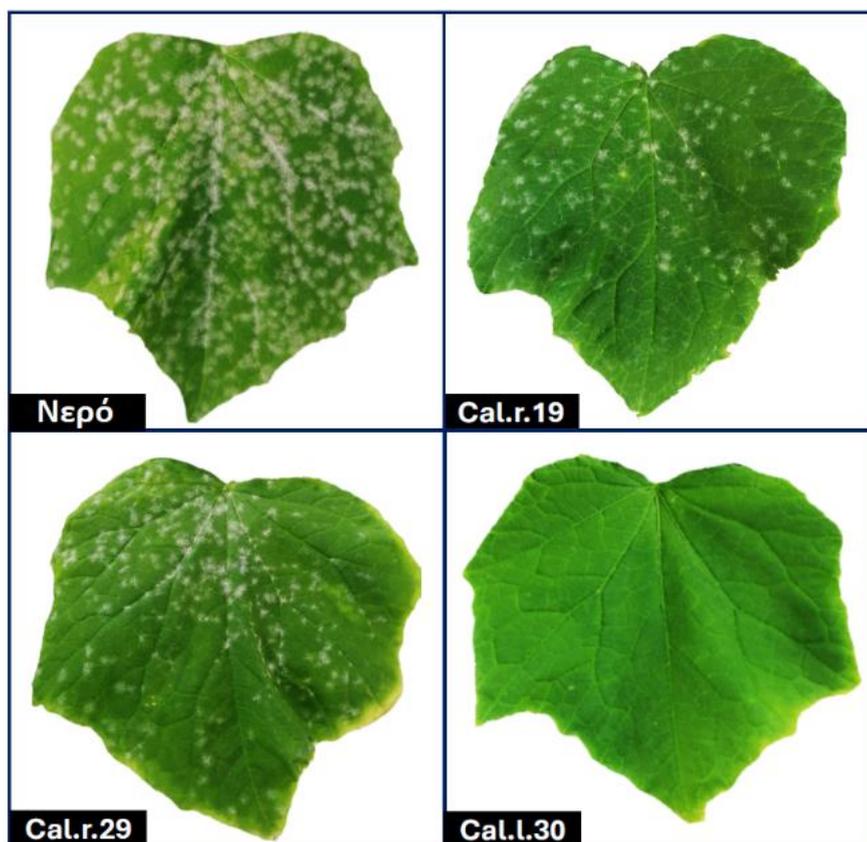
Τα αποτελέσματα που πάρθηκαν από αυτό το πείραμα, έδειξαν ότι το ποσοστό της έντασης της ασθένειας των φυτών εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την επέμβαση η οποία εφαρμόστηκε μέσω ψεκασμών φυλλώματος. Πιο συγκεκριμένα, τα φυτά τα οποία ψεκάστηκαν με νερό (μάρτυρες) εμφάνισαν το μεγαλύτερο ποσοστό προσβολής από το παθογόνο. Ακολούθως, τα φυτά στα οποία έγιναν επεμβάσεις με το βακτηριακό στέλεχος *Cal.r.29* εμφάνισαν μικρότερο ποσοστό προσβολής από τους μάρτυρες αλλά παρόμοιο με τα φυτά που ψεκάστηκαν με το θρεπτικό μέσο για την καλλιέργεια των βακτηρίων (LB). Η προσβολή στα φυτά που δέχτηκαν επεμβάσεις με τον παράγοντα *Cal.r.19* ήταν μερικώς χαμηλότερη. Από όλες τις επεμβάσεις, ξεχωρίζει η μικροβιακή απομόνωση του στελέχους *Bacillus Cal.l.30*, το οποίο στα φυτά που εφαρμόστηκε είχε ως αποτέλεσμα την εμφάνιση χαμηλού αριθμού κηλίδων και συμπτωμάτων προσβολής από τον μύκητα σε όλες τις αξιολογήσεις. Συγκριτικά με τα φυτά που δέχτηκαν ψεκασμούς φυλλώματος με νερό, τα φυτά στα οποία εφαρμόστηκε το στέλεχος *Cal.l.30* παρουσίασαν συνολικά 98% χαμηλότερη ένταση προσβολής, ενώ σε σχέση με τα φυτά που ψεκάστηκαν με το θρεπτικό υλικό παρουσίασαν 95% μείωση.

Κάνοντας την παραδοχή ότι ο ρυθμός αύξησης της ασθένειας είναι σταθερός, μπορούμε βάσει των εξισώσεων ευθείας να υπολογίσουμε τον αναμενόμενο απαιτούμενο χρόνο ώστε τα φυτά κάθε επέμβασης να φτάσουν ένταση ασθένειας ίση με 50% φυλλικής επιφανείας (**Πίνακας 4.5.2- 11**).

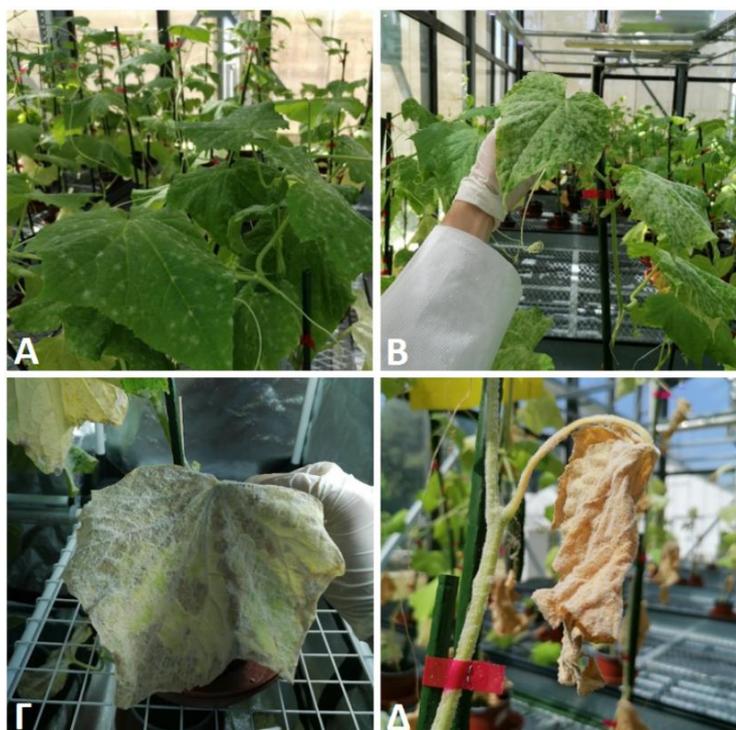
**Πίνακας 4.5.2-28:** Απαιτούμενος χρόνος ώστε να επιτευχθεί προσβολή της φυλλικής επιφάνειας από το μύκητα *P. xanthii* ίση με 50% επί του συνόλου, στα φυτά των επεμβάσεων στελέχη βακίλλων, βάσει γραμμικών μοντέλων εξέλιξης της ασθένειας στις διαφορετικές επεμβάσεις

Επεμβάσεις	Χρόνος για DS = 50%
Νερό	13,5 ημέρες
LB	14,5 ημέρες
Cal.r.19	15,5 ημέρες
Cal.r.29	16 ημέρες
Cal.l.30	25 ημέρες

Παρατηρούμε ότι με βάση το γραμμικό μοντέλο το ωίδιο θα καθυστερήσει περίπου 12 μέρες στα φυτά που ψεκάστηκαν με το Cal.l.30, μέχρις ότου η ένταση της να φτάσει τιμή ίση με 50%, σε σχέση με τα φυτά που ψεκάστηκαν με νερό.



**Εικόνα 4.5.2- 35:** Συμπτώματα ωιδίου σε φύλλα που έχουν δεχτεί διαφορετικές επεμβάσεις με στελέχη βακίλλων, 13 ημέρες μετά από την τεχνητή μόλυνση με το παθογόνο.



**Εικόνα 4.5.2- 36:** Συμπτώματα ωίδιου σε φυτά αγγουριάς. (Α,Β) Κηλίδες και καρποφορίες του μύκητα *P. xanthii* επάνω στις φυλλικές επιφάνειες. (Γ,Δ) Χλώρωση και νέκρωση του φυτικού ιστού σε προχωρημένη προσβολή από τον μύκητα.

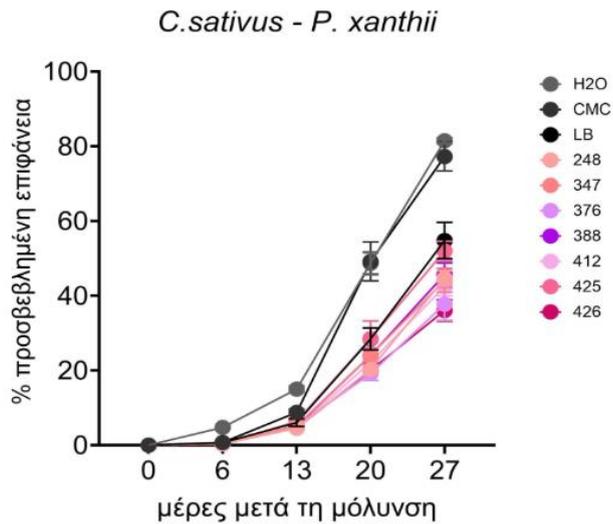
*B. Μικροβιακές απομονώσεις στελεχών του γένους *Kushneria* και το στέλεχος 248*

Στα γραφήματα που ακολουθούν, απεικονίζονται η πορεία εξέλιξης του ωιδίου στο φύλλωμα (% προσβεβλημένη φυλλική επιφάνεια) καθώς και το εμβαδόν κάτω από την καμπύλη εξέλιξης της ασθένειας για κάθε επέμβαση, το οποίο υπολογίστηκε όπως αναφέρεται σε προηγούμενες παραγράφους.

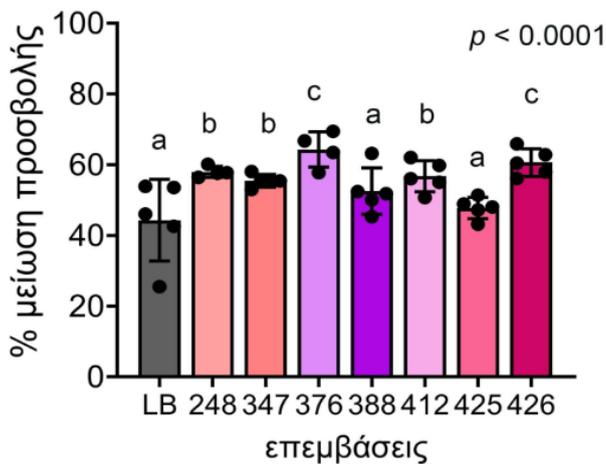
Όπως φαίνεται στις Εικόνες 18 και 19 και, όλα τα στελέχη μείωσαν την προσβολή στατιστικά σημαντικά σε σχέση με το μάρτυρες με νερό και με CMS, αντίστοιχα.

Εν αντιθέσει, το LB παρεμπόδισε στατιστικά σημαντικά την ανάπτυξη του μύκητα στα φύλλα αλλά η αποτελεσματικότητά του ήταν στατιστικά σημαντικά χαμηλότερη αυτής των περισσότερων από τα δοκιμασθέντα στελέχη (**Γραφήματα 4.5.2- 6, -7, -8**).

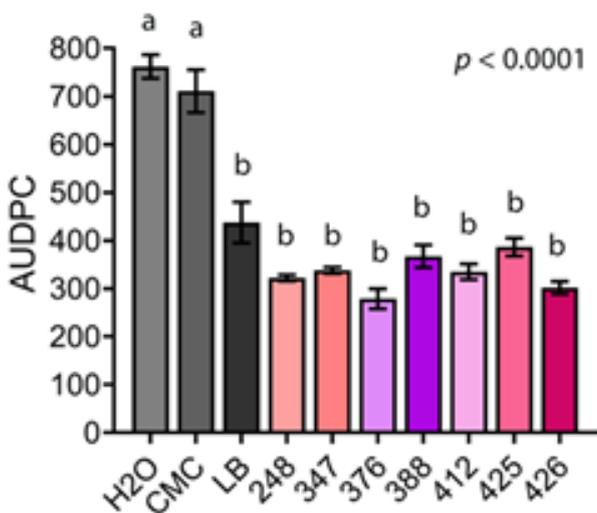
Τα στελέχη 376 και 426 ήταν τα περισσότερο αποτελεσματικά αφού παρεμπόδισαν την προσβολή κατά περίπου 64% σε σχέση με το υλικό LB (στο οποίο δεν είχαν καλλιεργηθεί βακτήρια) του οποίου το ποσοστό ήταν 44%. Βέβαια σε αυτό το σημείο θα πρέπει να αναφερθεί ότι το υλικό LB μετά την καλλιέργεια των βακτηρίων δεν έχει την αρχική του σύσταση άρα η δράση του στο παθογόνο δεν είναι γνωστή.



**Γράφημα 4.5.2- 6:** Ένταση ωιδίου (% επιφάνεια φύλλου με ορατά συμπτώματα προσβολής) σε φύλλα αγγουριάς (παθ. αίτιο *Podosphara xanthii*)



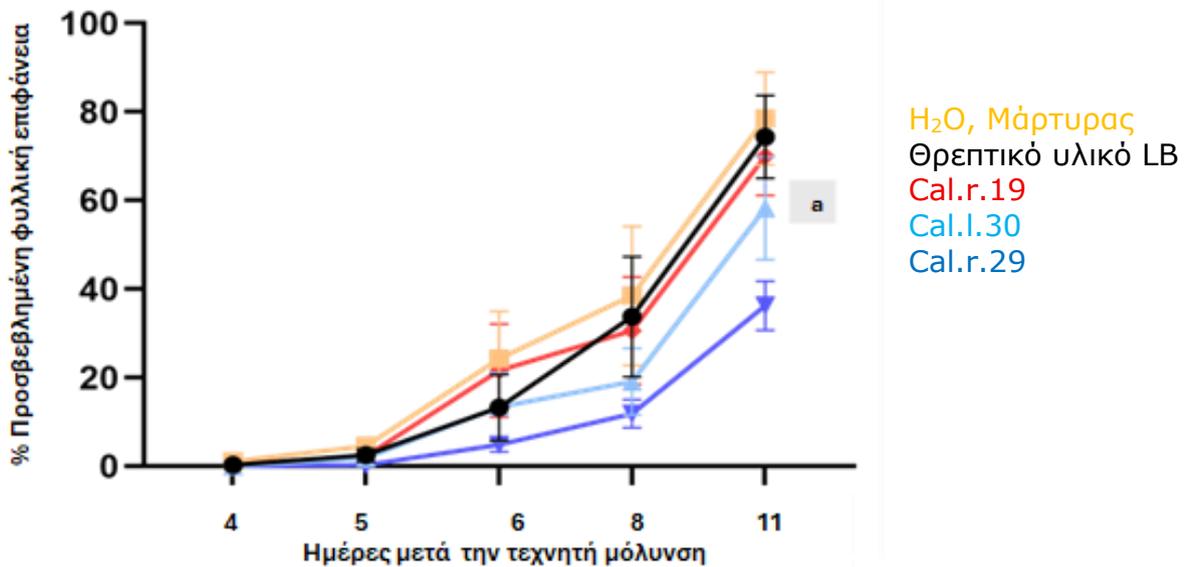
**Γράφημα 4.5.2- 7:** Ποσοστό μείωσης της έντασης προσβολής από το παθογόνο *P. xanthii* μετά από πέντε (5) εφαρμογές με στελέχη βακτηρίων του γένους *Kushneria*. Τα διαφορετικά γράμματα δηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των επεμβάσεων ( $p < 0.0001$ )



**Γράφημα 4.5.2- 8 :** Εμβαδά κάτω από την καμπύλη εξέλιξης του ωιδίου (% - days) των επεμβάσεων με στελέχη βακτηρίων του γένους *Kushneria* (μέσοι όροι και τυπικές αποκλίσεις). Τα διαφορετικά γράμματα δηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των επεμβάσεων ( $p < 0.0001$ )

### ***In planta* πειράματα στο παθοσύστημα αγγούρι - *Pseudoperonospora cubensis***

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο **Γράφημα 4.5.2- 9** και την **Εικόνα 4.5.2- 37**. Το στελέχος Cal.r.29 έδειξε αποτελεσματικότητα 40% κατά του περονόσπορου της αγγουριάς, 11 ημέρες μετά την μόλυνση. Το επίπεδο αποτελεσματικότητας των στελεχών εξαρτάται από τις συνθήκες ανάπτυξης των φυτών, καθώς θεωρείται ότι η υψηλή σχετική υγρασία του χώρου επηρεάζει τον πληθυσμό των βακτηριακών συνθηκών πάνω στις επιφάνειες των φύλλων (λόγω έκλυσης). Το πείραμα αυτό επαναλήφθηκε χωρίς να αυξάνεται η αποτελεσματικότητα των εν λόγω στελεχών.



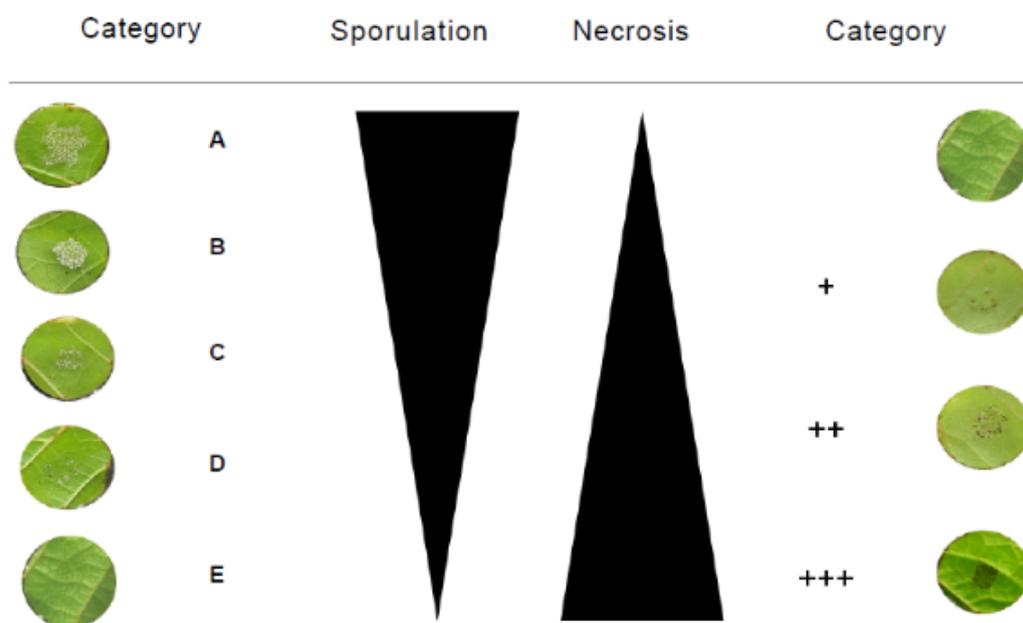
**Γράφημα 4.5.2- 9:** Ένταση περονόσπορου (% επιφάνεια φύλλου με ορατά συμπτώματα από την ασθένεια) σε φύλλα αγγουριάς (παθ. αίτιο *Pseudoperonospora cubensis*)



**Εικόνα 4.5.2- 38** Αριστερά: Φύλλο φυτού αγγουριάς μετά την προσβολή από το παθογόνο στο μάρτυρα με εφαρμογή νερό, Δεξιά: Φύλλο φυτού αγγουριάς μετά την προσβολή από το παθογόνο με εφαρμογή της μικροβιακής απομόνωσης του στελέχους *Bacillus* Cal.r.29

### ***In vivo* βιοδοκιμές στο παθοσύστημα αμπέλι - *Plasmopara viticola***

Η αξιολόγηση της προσβολής ξεκίνησε 5 ημέρες μετά την τεχνητή μόλυνση και διήρκεσε έως την 8 ημέρα, μειώνοντας τον κίνδυνο ανεπιθύμητων δευτερευουσών μολύνσεων από άλλους μικροοργανισμούς. Η μέθοδος αξιολόγησης βασίστηκε στο διαχωρισμό της αξιολόγησης της παραγωγής ζωοσποριαγγειοφόρων και ζωοσποριάγγειων και της νέκρωσης με τη χρήση διαφορετικών συμβόλων (**Εικόνα 4.5.2-39**). Για την αξιολόγηση του επιπέδου νέκρωσης, χρησιμοποιήθηκε ο ακόλουθος κωδικός συμβόλων: (+++) έντονη, (++) μέτρια, (+) ασθενής και ( ) απουσία ( ) (**Εικόνα 4.5.2- 39**).



**Εικόνα 4.5.2- 1:** Απεικόνιση του τρόπου αξιολόγησης και χαρακτηρισμού σύμφωνα με την ένταση της παραγωγής σποριαγγείων του ωομύκητα *P. viticola* και της νέκρωσης

στις κηλίδες εφαρμογής του αιωρήματος

**Πίνακας 4.5.2- 28:** Παθογόνο: *Plasmopara viticola*, Ποικιλία Αμπέλου: Αϊδάνι, 0.1% CMC χρησιμοποιήθηκε για την μόλυνση για όλες τις επεμβάσεις με τις μικροβιακές απομονώσεις. Χρόνος καλλιέργειας μικροβιακών απομονώσεων: 20 ώρες.

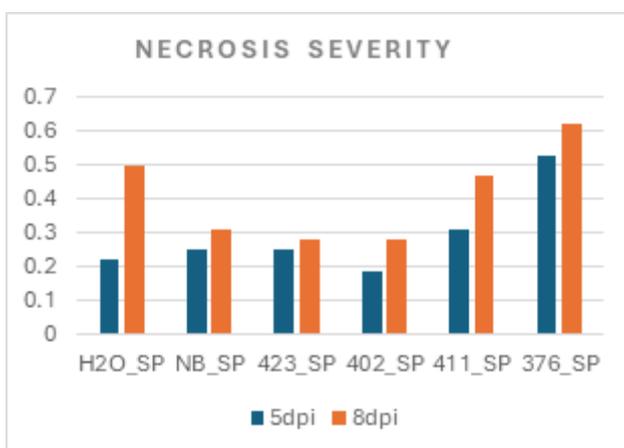
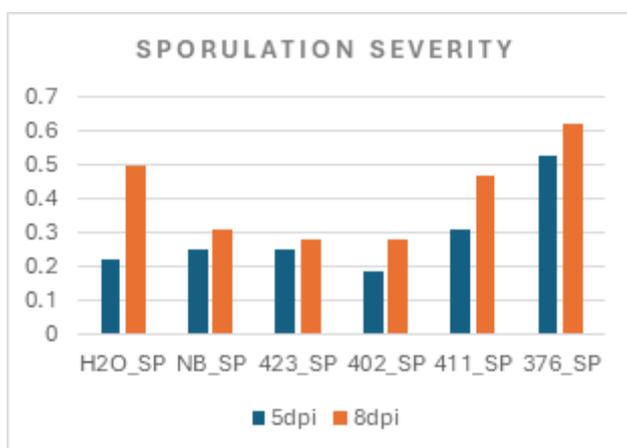
Οι εκάστοτε δοκιμαζόμενοι βιολογικοί παράγοντες ψεκάζονταν με το υγρό υπόστρωμα καλλιέργειας τους πριν την τεχνητή μόλυνση με το παθογόνο, και οι δίσκοι αφήνονταν να στεγνώσουν πάνω σε διηθητικά χαρτιά για τουλάχιστον 1 ώρα. Μετά την τοποθέτησή τους στα τρυβλία πραγματοποιούνταν η μόλυνση με το αιώρημα ζωοσποριαγγείων. Για λόγους ανάλυσης των αποτελεσμάτων οι αρχικές καταγραφές όπως προαναφέρονται κωδικοποιήθηκαν σε κλίμακα που περιγράφεται στον παραπάνω πίνακα.

A. *In vivo* βιοδοκιμές στελεχών του γένους *Kushneria* sp

Σε αυτή τη βιοδοκιμή με μικροβιακές απομονώσεις του γένους *Kushneria*, ο κάθε

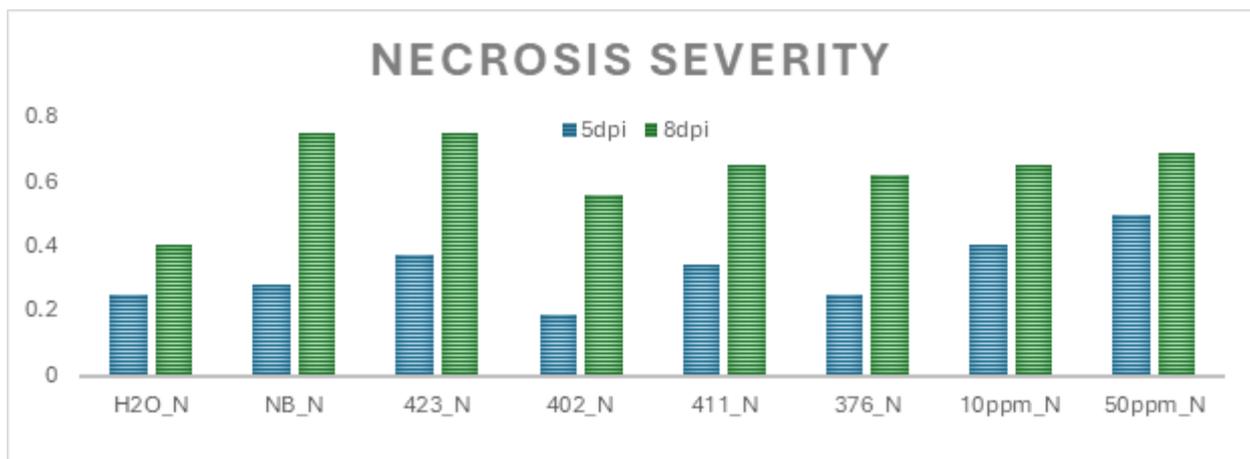
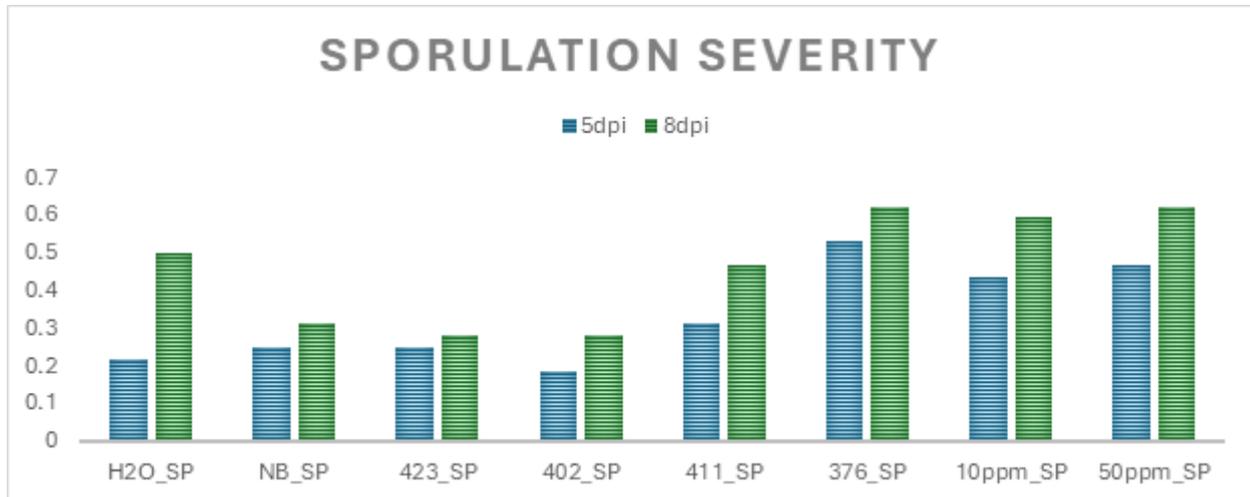
	Κωδικός	Περιγραφή	
Νέκρωση (N)	0	Έλλειψη νεκρωτικής αντίδρασης	
	+	1	Μεμονωμένες νεκρωτικές κηλίδες διαχωρισμένες μεταξύ τους
	++	2	Οριοθετημένη νεκρωτική περιοχή, εν μέρει καλύπτωντας το σημείο προσβολής
	+++	3	Οριοθετημένη νεκρωτική περιοχή, καλύπτοντας πλήρως το σημείο προσβολής
Σποριδιάγγεια-σποριααγγειοφόροι (SP)	E	0	Μη εμφανή σποριδιάγγεια και σποριοαγγειοφόροι
	D	1	Μεμονωμένοι σποριοαγγειοφόροι
	C	2	Διάσπαρτοι σποριοαγγειοφόροι
	B	3	Έντονη παραγωγή σποριοαγγειοφόρων / σποριαγγείων, περιορισμένη στο σημείο της τεχνητής μόλυνσης
	A	4	Έντονη παραγωγή σποριοαγγειοφόρων / σποριαγγείων, μη περιορισμένη στο σημείο της τεχνητής μόλυνσης

φυλλικός δίσκος θεωρείται μία βιολογική επανάληψη. Πραγματοποιήθηκαν δύο πειράματα όπου ελέγχθηκαν ενδεικτικές μικροβιακές απομονώσεις του γένους *Kushneria*. Επίσης, στο δεύτερο πείραμα που πραγματοποιήθηκε συμπεριλήφθηκε και πειραματισμός με νανοσωματίδια χιτοζάνης με συζευγμένο χαλκό (δείγματα 10ppm και 50ppm) για να πραγματοποιηθεί σύγκριση των διαφορετικών επεμβάσεων. Στα **Γραφήματα 4.5.2- 10** και **4.5.2- 11** φαίνεται ότι τα δοκιμασθέντα στελέχη 423, 402, 411 και 376 δεν εμφάνισαν ανταγωνιστική δράση ενάντια στον παθογόνο ωμούκητα *Plasmopara viticola*.



**Γράφημα 4.5.2- 10:** Μέση τιμή παραγωγής σποριαγγείων όπως αυτή εκτιμήθηκε με την χρήση κλίμακας 0-4 (με 0=μη παραγωγή και 4=Έντονη παραγωγή σποριααγγειοφόρων/σποριαγγείων, μη περιορισμένη στο σημείο της τεχνητής μόλυνσης) από τον ωμούκητα *P. viticola* μετά από την εφαρμογή διαφορετικών βακτηριακών στελεχών του γένους *Kushneria* και το επίπεδο νεκρώσεων που αυτός

προκάλεσε σε δίσκους φύλλων αμπέλου που δέχτηκαν επεμβάσεις 5 και 8 ημέρες μετά την τεχνητή μόλυνση (5 και 8dpi, αντίστοιχα). Η νέκρωση αξιολογήθηκε με κλίμακα 0-3 με το 3 να δηλώνει την ύπαρξη οριοθετημένης νεκρωτική περιοχής, καλύπτοντας πλήρως το σημείο προσβολής.

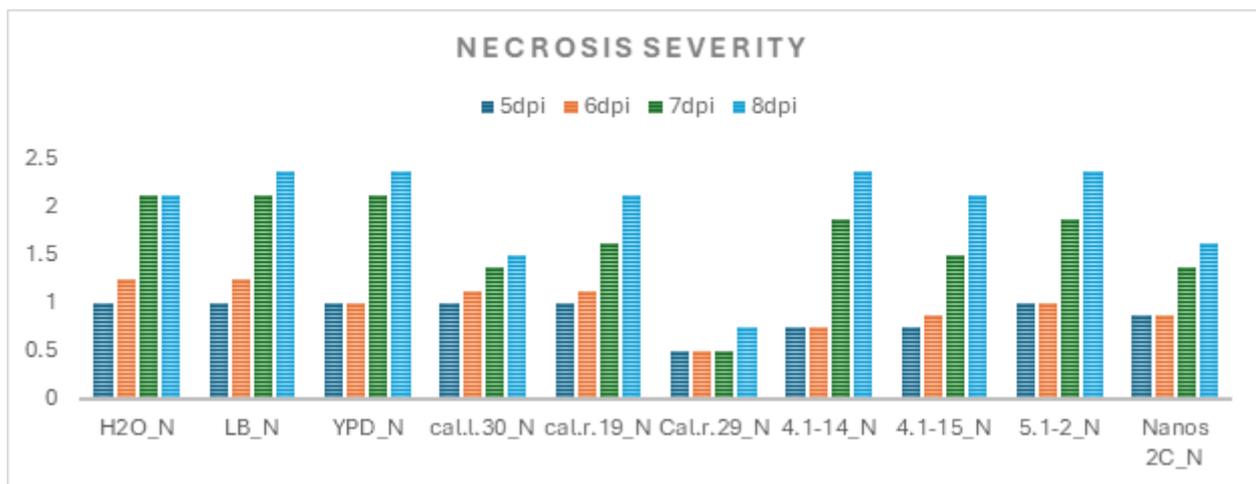
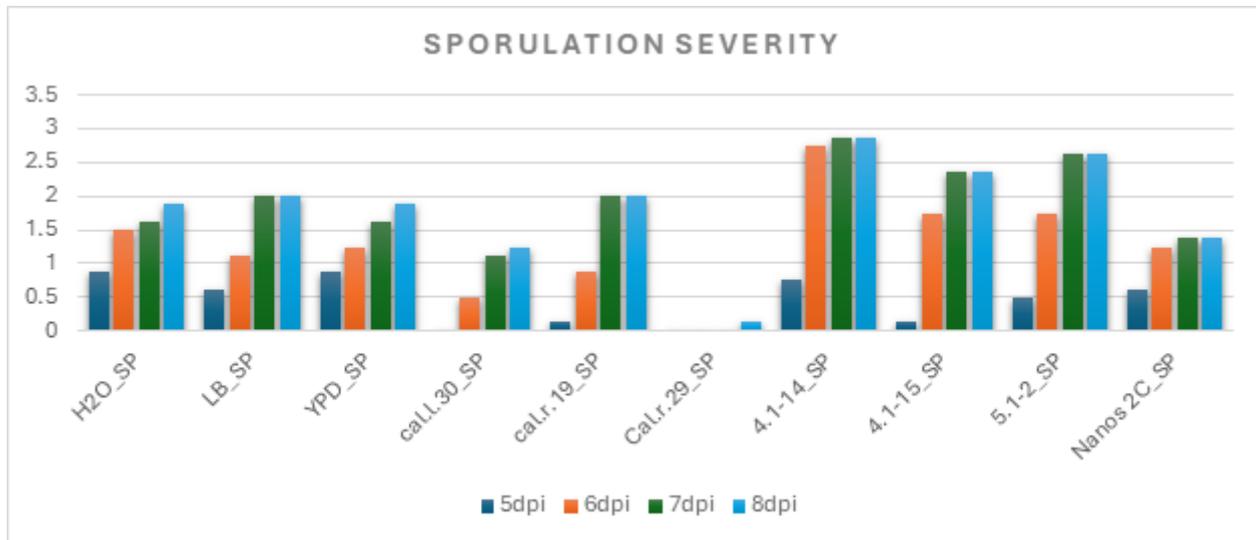


**Γράφημα 4.5.2- 11:** Μέση τιμή παραγωγής σποριαγγείων όπως αυτή εκτιμήθηκε με την χρήση κλίμακας 0-4 (με 0=μη παραγωγή και 4=Έντονη παραγωγή σποριαγγειοφόρων/σποριαγγείων, μη περιορισμένη στο σημείο της τεχνητής μόλυνσης) από τον ωομύκητα *P. viticola* μετά από την εφαρμ ρμογή διαφορετικών βακτηριακών στελεχών του γένους *Kushneria* και το επίπεδο νεκρώσεων που αυτός προκάλεσε σε δίσκους φύλλων αμπέλου που δέχτηκαν επεμβάσεις 5 έως 8 ημέρες μετά την τεχνητή μόλυνση ( 5 έως 8dpi, αντίστοιχα). Η νέκρωση αξιολογήθηκε με κλίμακα 0-3 με το 3 να δηλώνει την ύπαρξη οριοθετημένης νεκρωτική περιοχής, καλύπτοντας πλήρως το σημείο προσβολής.

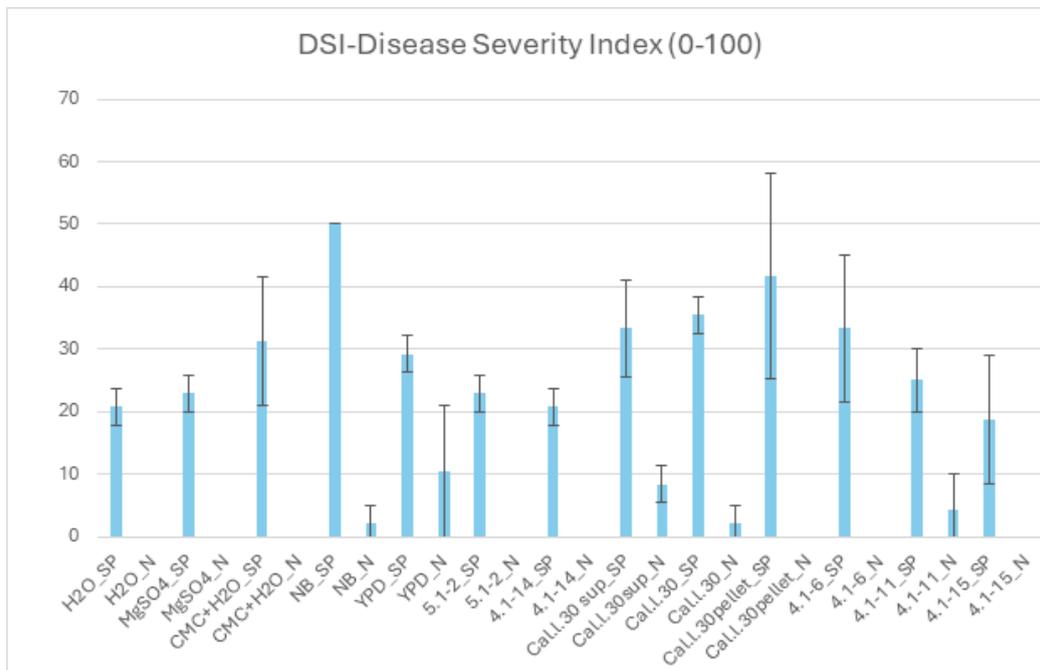
*B. In vivo βιοδοκιμές στελεχών των γενών Bacillus, Candida και Metschnikowia*

Αντίστοιχα, σε αυτή τη βιοδοκιμή με μικροβιακές απομονώσεις των γενών *Bacillus*, *Candida* και *Metschnikowia*, ο κάθε φυλλικός δίσκος θεωρείται μία βιολογική επανάληψη. Επίσης και σε αυτό τον πείραμα συμπεριλήφθηκαν και νανοσωματίδια χιτοζάνης με συζευγμένο σαλικυλικό οξύ (δείγματα nanos\_2C) για να πραγματοποιηθεί σύγκριση των διαφορετικών επεμβάσεων. Στο **Γράφημα 4.5.2- 12** φαίνεται ότι ειδικά

η μικροβιακή απομόνωση του γένους *Bacillus* Cal.r.29 έχει την ικανότητα προκαλεί έντονη μείωση τόσο στην νέκρωση του ιστού που προκαλείται από τη μόλυνση του παθογόνου όσο και στην παραγωγή σποριαγγείων του παθογόνου.



**Γράφημα 4.5.2- 12:** Μέση τιμή παραγωγής σποριαγγείων όπως αυτή εκτιμήθηκε με την χρήση κλίμακας 0-4 (με 0=μη παραγωγή και 4=Έντονη παραγωγή σποριαγγειοφόρων/σποριαγγείων, μη περιορισμένη στο σημείο της τεχνητής μόλυνσης) από τον ωομύκητα *P. viticola* μετά από την εφαρμογή μικροβιακών απομονώσεων στελεχών των γενών *Bacillus*, *Candida* και *Metschnikowia* και το επίπεδο νεκρώσεων που αυτός προκάλεσε σε δίσκους φύλλων αμπέλου που δέχτηκαν επεμβάσεις 5 έως 7 ημέρες μετά την τεχνητή μόλυνση (5 έως 7dpi, αντίστοιχα). Η νέκρωση αξιολογήθηκε με κλίμακα 0-3 με το 3 να δηλώνει την ύπαρξη οριοθετημένης νεκρωτικής περιοχής, καλύπτοντας πλήρως το σημείο προσβολής.



**Γράφημα 4.5.2- 13:** Ο δείκτης Disease Severity Index (DSI)\* για την παραγωγή σποριαγγείων του ωμούκητα *P. viticola* σε δίσκους φύλλων αμπέλου που δέχτηκαν επεμβάσεις με διαφορετικά στελέχη του βακτηρίου *Kushneria* sp και ζυμομύκητες (5 ημέρες μετά την τεχνητή μόλυνση).

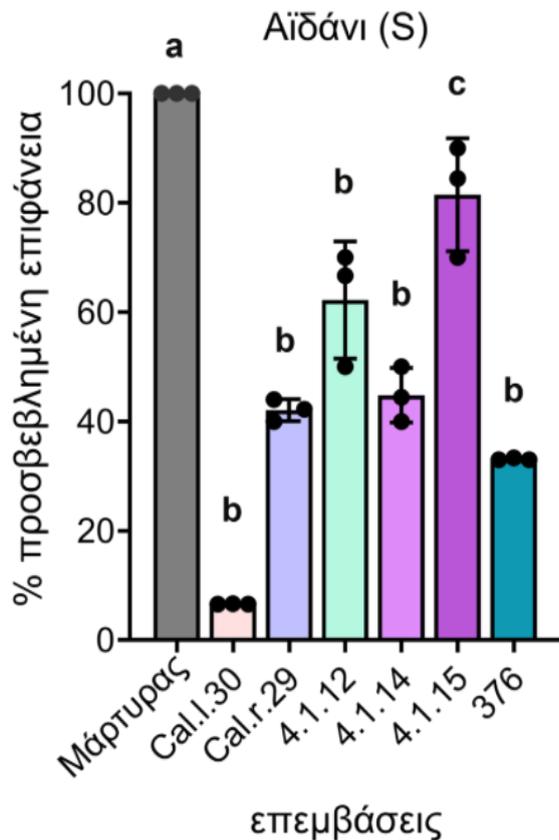
\* Disease Severity Index (DSI) υπολογίστηκε ως κάτωθι:  $DSI = \frac{[\text{Άθροισμα (της συχνότητας εμφάνισης κάθε κλάσης} \times \text{τιμή που παίρνει κάθε κλάση)]}{[(\text{συνολικού αριθμού των δίσκων}) \times (\text{μέγιστη τιμή των κλάσεων})]}$ .

Αναλύοντας τους παραπάνω πίνακες γίνεται κατανοητό ότι μόνο το στέλεχος Cal.r.29 παρεμπόδισε πλήρως την ανάπτυξη του ωμούκητα *Plasmopara viticola* σε δίσκους αμπέλου ποικιλίας Αϊδάνι. Μικρότερη δράση και μείωση της προσβολής παρουσίασε ένα στέλεχος του γένους *Kushneria* (402) και ένα στέλεχος ζυμομύκητα του γένους *Metschnikowia* (4.1.-15).

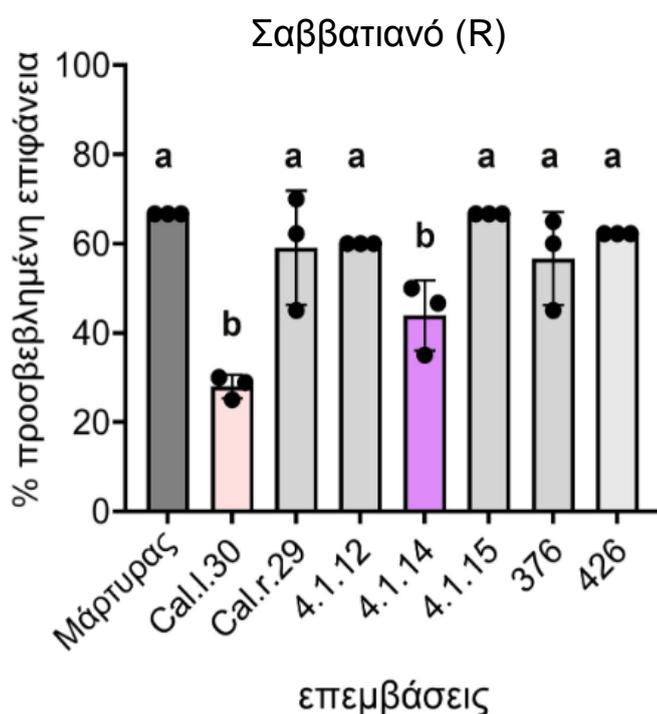
*Γ. In vivo βιοδοκιμές στελεχών των γενών Kushneria, Bacillus, Candida και Metschnikowia*

Με βάση την αξιολόγηση των παραπάνω αποτελεσμάτων, επιλέχθηκαν συγκεκριμένα στελέχη που φαίνεται να έχουν καλύτερη απόδοση ενάντια στον περονόσπορο της αμπέλου και πραγματοποιήθηκε επανάληψη του πειράματος. Επίσης, τα επιλεγμένα στελέχη αξιολογήθηκαν και σε μία ποικιλία αμπέλου ανθεκτική στον περονόσπορο. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στις παρακάτω εικόνες, όπου φαίνεται ότι οι μικροβιακές απομονώσεις των στελεχών Cal.l.30 και Cal.r.29 του γένους *Bacillus*, 376 του γένους *Kushneria* και 4.1.14 του γένους *Metschnikowia* μειώνουν σημαντικά το ποσοστό προσβεβλημένης επιφάνειας στους φυλλικούς δίσκους αμπέλου της ευαίσθητης ποικιλίας μετά τη μόλυνση από τον ωμούκητα *Plasmopara viticola*. Επίσης, σημαντική είναι και η μείωση του ποσοστού της προσβεβλημένης επιφάνειας στους φυλλικούς δίσκους αμπέλου της ανθεκτικής ποικιλίας μετά την εφαρμογή των μικροβιακών

απομονώσεων στελεχών Cal.l.30 του γένους *Bacillus* και 4.1.14 του γένους *Metschnikowia*.



**Γράφημα 4.5.2- 14:** Ποσοστό προσβεβλημένης επιφάνειας (δείκτης DSI) δίσκων φύλλων αμπέλου της ευαίσθητης, στον ωμόκητα *Plasmopara viticola*, ποικιλίας που δέχτηκαν επεμβάσεις με στελέχη βακτηρίων του γένους *Kushneria*, *Bacillus*, *Candida* και *Metschnikowia*. Η νέκρωση αξιολογήθηκε 6 ημέρες μετά την τεχνητή μόλυνση με κλίμακα 0 – 3 με το 3 να δηλώνει την ύπαρξη οριοθετημένης νεκρωτικής περιοχής, καλύπτοντας πλήρως το σημείο προσβολής. Τα διαφορετικά γράμματα δηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των επεμβάσεων ( $p < 0.0001$ )

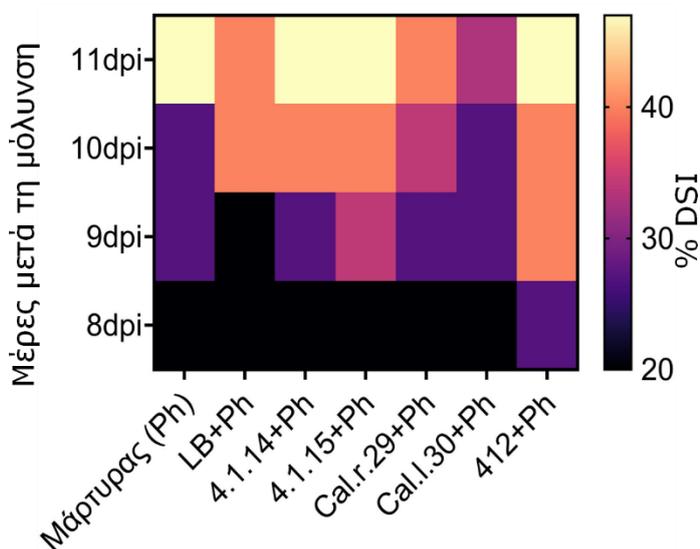


**Γράφημα 4.5.2- 15:** Ποσοστό προσβεβλημένης επιφάνειας (δείκτης DSI) δίσκων φύλλων της ανθεκτικής ποικιλίας Σαββατιανό (R) στον ωμόκητα *Plasmopara viticola*, μετά την εφαρμογή επεμβάσεων με στελέχη βακτηρίων του γένους *Kushneria*, *Bacillus*, *Candida* και *Metschnikowia*. Η νέκρωση αξιολογήθηκε 6 ημέρες μετά την τεχνητή μόλυνση με κλίμακα 0 – 3 με το 3 να δηλώνει την ύπαρξη οριοθετημένης νεκρωτικής περιοχής, καλύπτοντας πλήρως το σημείο προσβολής. Τα διαφορετικά γράμματα δηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των επεμβάσεων ( $p < 0.01$ )

## ***In planta* πειράματα στο παθοσύστημα τομάτα - *Phytophthora nicotianae***

### **1<sup>ο</sup> Πείραμα**

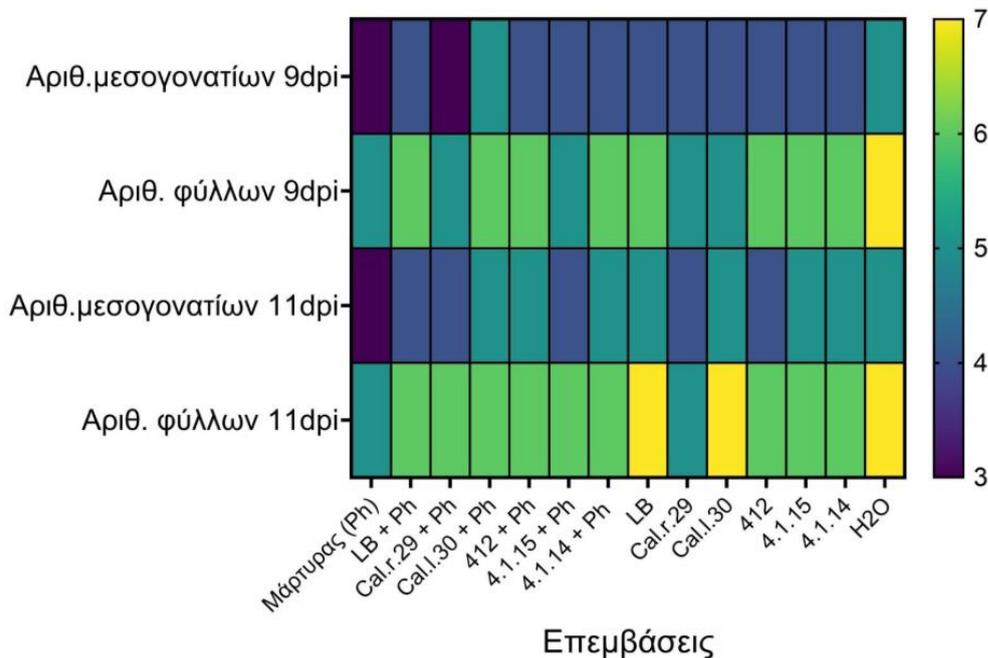
Οκτώ (8) μέρες μετά την εφαρμογή των μικροβιακών στελεχών και με την εμφάνιση συμπτωμάτων στους θετικούς μάρτυρες ξεκίνησε η αξιολόγηση της ασθένειας κάθε 24 ώρες για διάστημα τεσσάρων ημερών (**Γράφημα 4.5.2- 16**). Στο γράφημα φαίνεται ότι τα στελέχη βακίλλων Cal.r.29 και Cal.l.30 μείωσαν σημαντικά την ένταση της ασθένειας κατά 40%.



**Γράφημα 4.5.2- 16:** Ένταση προσβολής (DSI) από τον ωομύκητα *P. nicotianae* με βάση το δείκτη DSI

### **Αξιολόγηση ανάπτυξης των φυτών**

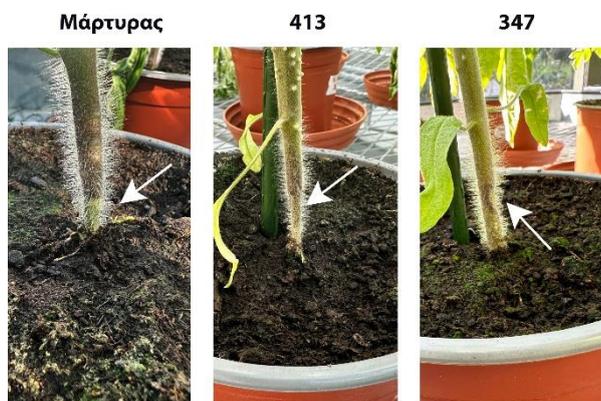
Στο παρόν πείραμα πραγματοποιήθηκε και αξιολόγηση της ανάπτυξης με καταγραφή φυσιολογικών χαρακτηριστικών ανάπτυξης των φυτών τομάτας. Συγκεκριμένα, στις 9 και 11 ημέρες μετά την τεχνητή μόλυνση (9 και 11dpi) πραγματοποιήθηκε καταγραφή του αριθμού μεσογονατίων διαστημάτων και φύλλων τόσο στις επεμβάσεις στις οποίες δεν πραγματοποιήθηκαν τεχνητές μολύνσεις όσο και αυτές με τις επεμβάσεις μικροβιακών στελεχών και το παθογόνο (**Γράφημα 4.5.2- 17**). Η μείωση της ασθένειας που προκλήθηκε από τους βιολογικούς παράγοντες φαίνεται και από τη βελτίωση της ανάπτυξης των φυτών τόσο σε αριθμό φύλλων όσο και σε αύξηση του αριθμού μεσογονατίων διαστημάτων του βλαστού



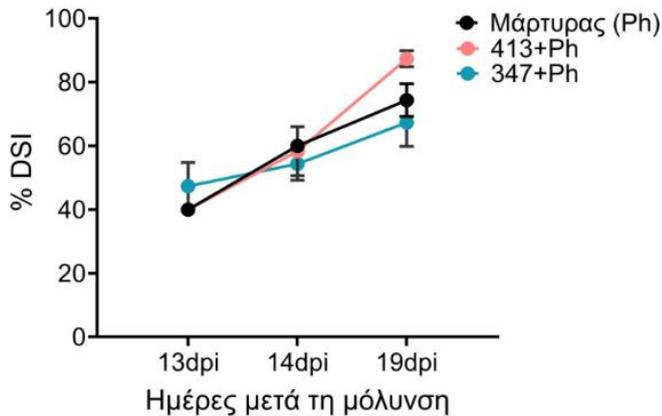
**Γράφημα 4.5.2- 17:** Γράφημα μετρήσεων των φυσιολογικών χαρακτηριστικών ανάπτυξης των φυτών τομάτας στο θερμοκήπιο. Μετρήσεις αριθμού μεσογονατίων διαστημάτων και φύλλων σε δύο διαφορετικές χρονικές στιγμές, 9 και 11 ημέρες μετά την τεχνητή μόλυνση.

### 2<sup>ο</sup> Πείραμα

Στο δεύτερο πείραμα θερμοκηπίου, φυτά τομάτας, στο στάδιο των τριών πραγματικών φύλλων, χρησιμοποιήθηκαν για ριζοπότισμα με τα στελέχη 413 και 347 του γένους *Kushneria*, μαζί με τις αντίστοιχες επεμβάσεις μαρτύρων, και δύο μέρες μετά πραγματοποιήθηκε εφαρμογή του μολύσματος. Πραγματοποιήθηκαν 3 αξιολογήσεις της ασθένειας ξεκινώντας από την 13<sup>η</sup> μέρα μετά την εφαρμογή του μολύσματος (**Εικόνα 4.5.2- 40**), χρόνος που παρατηρήθηκε εμφάνιση συμπτωμάτων στο θετικό μάρτυρα (**Γράφημα 4.5.2- 18**).



**Εικόνα 4.5.2- 40:** Ενδεικτικές φωτογραφίες φυτών μάρτυρα και φυτών μετά την εφαρμογή των μικροβιακών απομονώσεων στελεχών του γένους *Kushneria* με ριζοπότισμα, 19 ημέρες μετά την εφαρμογή του παθογόνου.

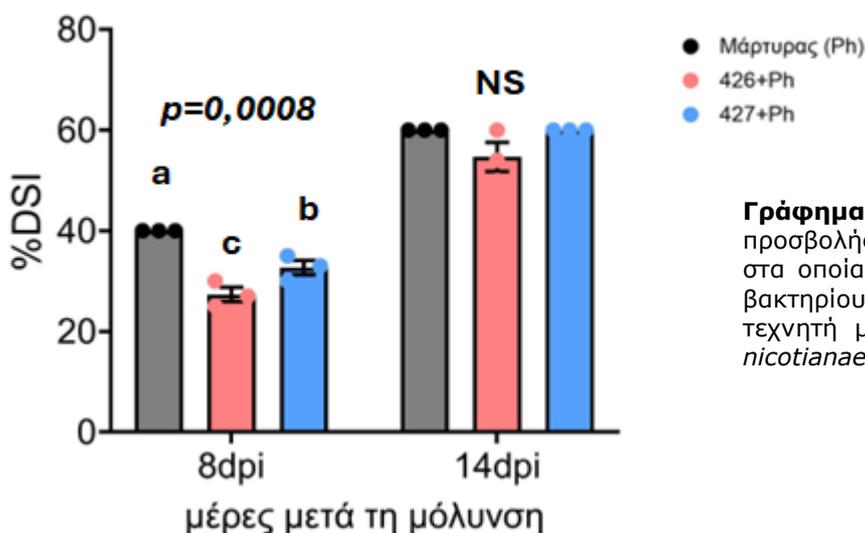


**Γράφημα 4.5.2- 18:** Ένταση της προσβολής (δείκτης DSI) φυτών τομάτας από τον ωμούκητα *P. nicotianae* στα οποία εφαρμόστηκαν βακτηριακά στελέχη του γένους *Kushneria* (413 και 347).

### 3<sup>ο</sup> Πείραμα

Στο τρίτο πείραμα θερμοκηπίου, φυτά τομάτας, στο στάδιο των δύο πραγματικών φύλλων, χρησιμοποιήθηκαν για ριζοπότισμα με τα στελέχη 426 και 427 του γένους *Kushneria*, μαζί με την αντίστοιχη επέμβαση ελέγχου (Μάρτυρας, νερό). Δύο ημέρες μετά την εφαρμογή των βακτηρίων, πραγματοποιήθηκε η εφαρμογή του μολύσματος στο υπόστρωμα με ριζοπότισμα. Πραγματοποιήθηκαν δύο αξιολογήσεις της ασθένειας, μία 6 ημέρες και μία 11 ημέρες μετά τη τεχνητή μόλυνση (11dpi).

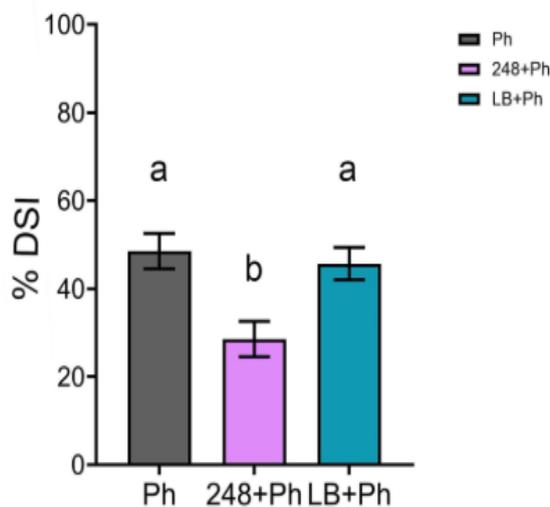
Στην παρακάτω **Γράφημα 4.5.2- 19** φαίνεται ότι η αποτελεσματικότητα των στελεχών που δοκιμάστηκαν ήταν χαμηλή, στις 8 και 14 ημέρες από την προσβολή. Όμως μεταξύ τους παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές.



**Γράφημα 4.5.2- 19:** Ένταση της προσβολής (δείκτης DSI) φυτών τομάτας στα οποία εφαρμόστηκαν τα στελέχη του βακτηρίου *Kushneria* 426 και 427, μετά την τεχνητή μόλυνση από τον ωμούκητα *P. nicotianae*

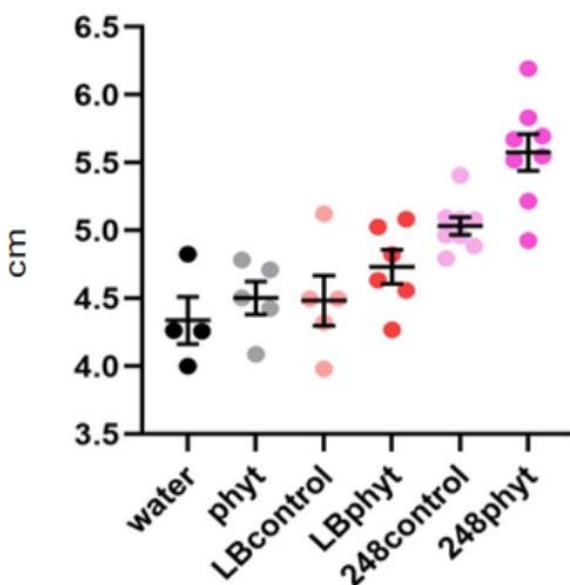
### 4<sup>ο</sup> Πείραμα

Στο τέταρτο πείραμα θερμοκηπίου, φυτά τομάτας, χρησιμοποιήθηκαν για ριζοπότισμα με τη μικροβιακή απομόνωση στελέχους ζυμομύκητα 248, μαζί με τις αντίστοιχες επεμβάσεις μαρτύρων, και δύο μέρες μετά την εφαρμογή του, πραγματοποιήθηκε το ριζοπότισμα με το μόλυσμα ζωοσπορίων του ωομύκητα. Η πρώτη αξιολόγηση της ασθένειας πραγματοποιήθηκε 15 ημέρες μετά τη τεχνητή μόλυνση (15dpi) και ακολούθησε άλλη μία αξιολόγηση στις 19 ημέρες μετά τη τεχνητή μόλυνση (19dpi). Στο **Γράφημα 4.5.2- 20** φαίνεται ότι το στέλεχος 248 ήταν αποτελεσματικό μειώνοντας της έντασης της προσβολής ο δείκτης έντασης προσβολής είναι στατιστικά σημαντικά χαμηλότερος αυτών των μαρτύρων.



**Γράφημα 4.5.2- 20:** Ένταση της προσβολής φυτών τομάτας στα οποία έγινε εφαρμογή του στελέχους ζυμομύκητα 248 και ακολούθησε τεχνητή μόλυνση με τον ωομύκητα *P. nicotianae*. Τα διαφορετικά λατινικά γράμματα δηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των επεμβάσεων ( $p < 0,0001$ )

Επίσης πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις φυσιολογικών χαρακτηριστικών ανάπτυξης, μέτρηση ύψους (δεν παρουσιάζονται τα δεδομένα) και της διαμέτρου του λαιμού των φυτών, σε όλες τις επεμβάσεις, 19 ημέρες μετά τη τεχνητή μόλυνση (**Γράφημα 4.5.2- 20**).



**Γράφημα 4.5.2- 21:** Μετρήσεις διαμέτρου του λαιμού των φυτών (βάση στελέχους) φυτών τομάτας που δέχτηκαν επεμβάσεις με το στέλεχος ζυμομύκητα με κωδικό 248.

Οι μετρήσεις έδειξαν ότι υπήρξαν στο χρονικό διάστημα καταγραφής σημαντικές

διαφοροποιήσεις στο ύψος των φυτών (**Γράφημα 4.5.2- 21**). Επιπλέον ο ζυμομύκητας με ή χωρίς το παθογόνο προκάλεσε πάχυνση του λαιμού κάνοντας τα φυτά περισσότερο εύρωστα.

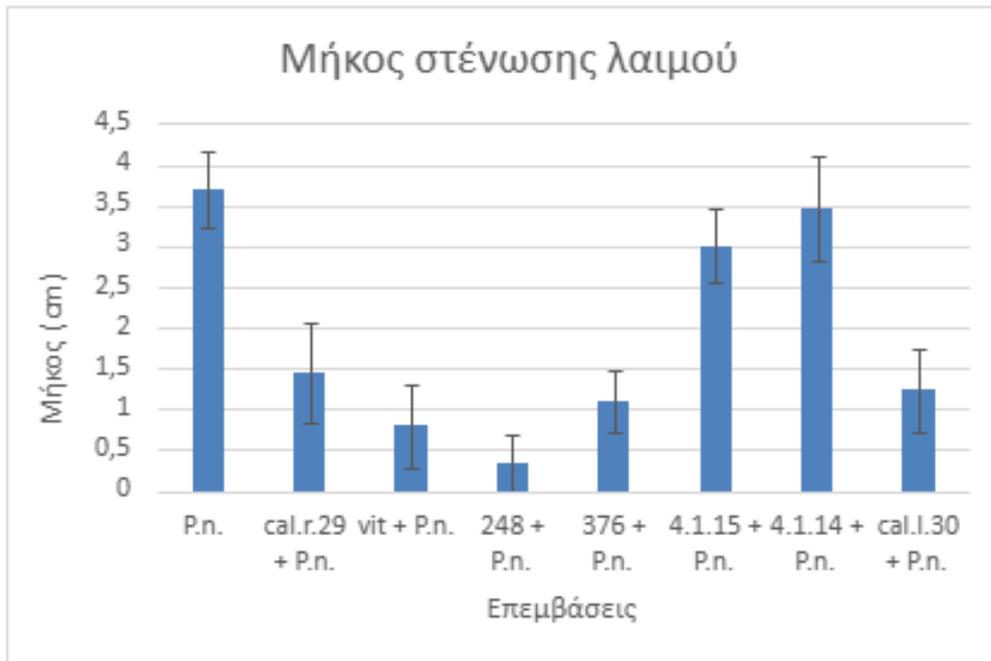


**Εικόνα 4.5.2- 41:** Πάνω: Αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες προσβεβλημένων φυτών τομάτας στα οποία πραγματοποιήθηκε αξιολόγηση της έντασης της προσβολής μετά την εφαρμογή της μικροβιακής απομόνωσης στελέχους ζυμομύκητα με κωδικό 248. Κάτω: Αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες ριζών των φυτών της κάθε επέμβασης στην οποία παρατηρείται σήψη και καστανός μεταχρωματισμός μετά την προσβολή από τον ωομύκητα *P. nicotianae*.

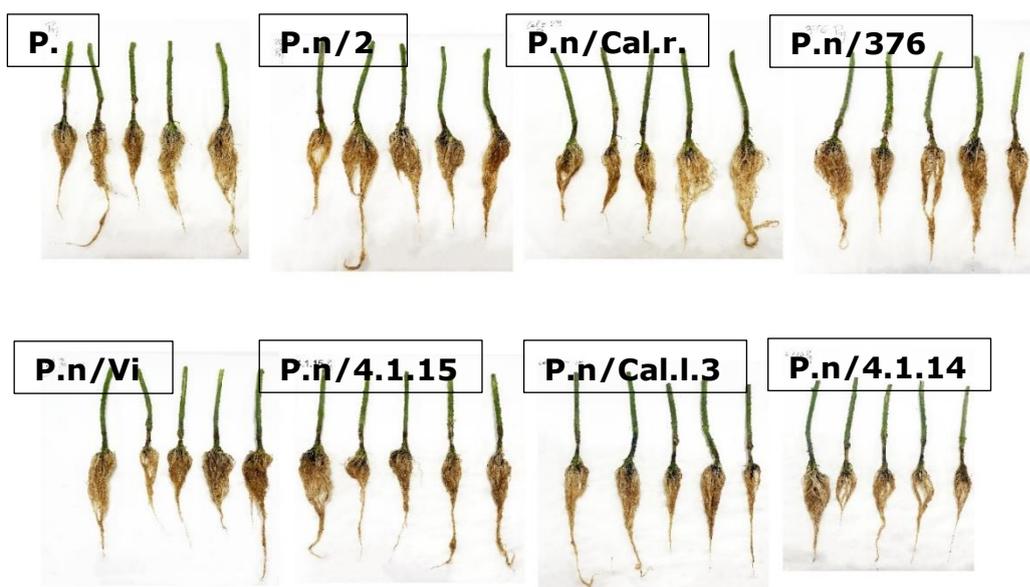
*Συγκεντρωτικό πείραμα στελεχών των γενών Kushneria, Bacillus, Candida, Metschnikowia, του στελέχους 248 και του σκευάσματος Vitacracin*

Στο συγκεκριμένο πείραμα, εκτός από τις μικροβιακές απομονώσεις που έχουν ήδη χρησιμοποιηθεί σε προηγούμενα πειράματα, αξιολογήθηκε και το εμπορικό σκεύασμα Vitacracin (<https://www.afepasa.com/en/product/vitacracin>). Το σκεύασμα Vitacracin αποτελείται από συνδυασμό ενδομυκορριζών και ριζοβακτηριών και χρησιμοποιείται για τον εμπλουτισμό του μικροβιώματος του εδάφους. Από τις παρακάτω Εικόνες γίνεται κατανοητό πως από όλα τα φυτά που μολύνθηκαν με *P. nicotianae*, αυτά που είχαν τα καλύτερα αποτελέσματα ήταν εκείνα που δέχθηκαν στα οποία εφαρμόστηκε ο βιολογικός παράγοντας 248. Πιο συγκεκριμένα, φαίνεται ότι αύξησαν το βάρος της

ρίζας μειώνοντας παράλληλα και την έκταση της νεκρωτικής κηλίδας (που προκαλούσε στένωση) του λαιμού στο στελέχος των φυτών. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι το μικροβιακό στέλεχος 4.1.15 ενώ είχε πολύ καλά αποτελέσματα βάρους ρίζας στα φυτά που εφαρμόστηκε, εντούτοις παρουσίασε μεγάλη έκταση στένωσης λαιμού. Τέλος, τα αποτελέσματα που προέκυψαν από το συνδυασμό *P. nicotianae* (P.n) και Vitacracin (Vit) ήταν πολύ καλά (**Γράφημα 4.5.2- 22 και Εικόνα 4.5.2- 42**).



**Γράφημα 4.5.2- 22:** Το μέσο μήκος της νεκρωτικής κηλίδας στο λαιμό φυτών τομάτας μετά τη τεχνητή μόλυνση με μυκηλιακό δίσκο *P. nicotianae*



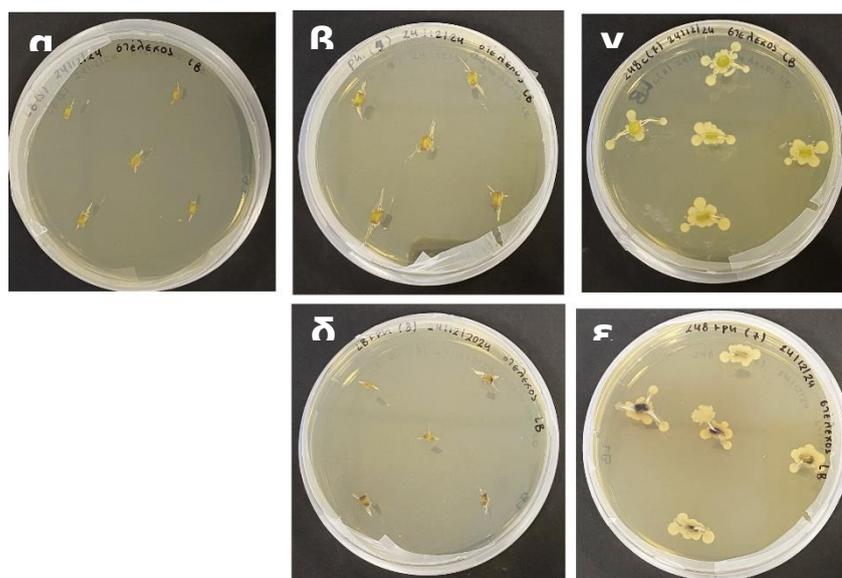
**Εικόνα 4.5.2- 2:** Νωπό βάρος ριζών των φυτών τομάτας που μολύνθηκαν με μυκηλιακούς δίσκους του ωμούκητα *Phytophthora nicotianae*.



**Γράφημα 4.5.2- 23:** Το μέσο βάρος των ριζών όλων των φυτών που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα αξιολόγησης των μικροβιακών στελεχών των γενών *Kushneria*, *Bacillus*, *Candida*, *Metschnikowia*, του στελέχους ζυμομύκητα 248 και του σκευάσματος Vitacracin.

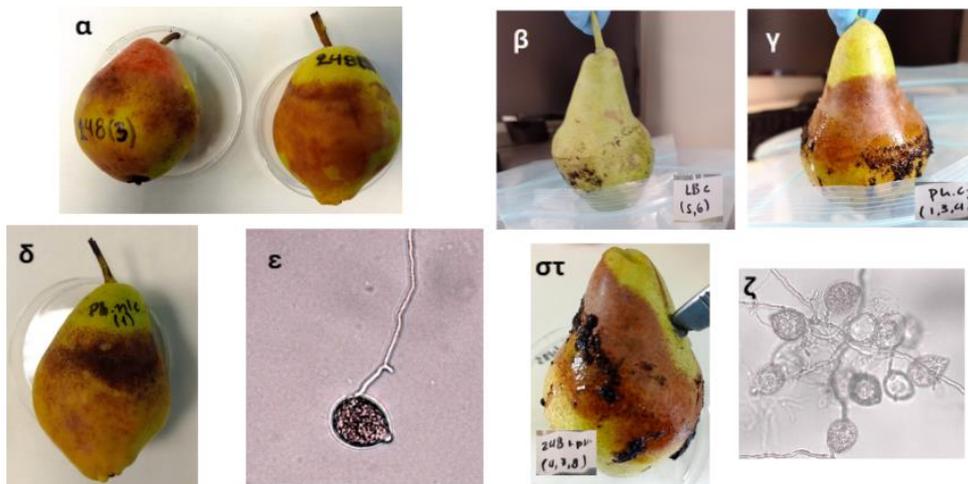
Απομονώσεις για τον έλεγχο παρουσίας των στελεχών των μικροβιακών απομονώσεων που χρησιμοποιήθηκαν σε διάφορα μέρη του φυτού και παρουσίας του παθογόνου μύκητα στο λαιμό των φυτών στο πείραμα 4

Οι απομονώσεις βιολογικών παραγόντων και παθογόνου πραγματοποιήθηκαν από απολυμασμένους φυτικούς ιστούς στην περιοχή του λαιμού των φυτών.



**Εικόνα 4.5.2- 3:** Αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες απομονώσεων που πραγματοποιήθηκαν από φυτικούς ιστούς για την παρουσία του στελέχους ζυμομύκητα

248, σε φυτά τομάτας στα οποία πραγματοποιήθηκε η εφαρμογή. Η δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε σε απόσταση 5-6 εκ. πάνω από το λαιμό. (α) τμήματα στελεχών φυτών με ριζοπότισμα μόνο θρεπτικού μέσου LB, (β) τμήματα στελεχών φυτών με ριζοπότισμα μόνο Pn, (γ) τμήματα στελέχους φυτών με ριζοπότισμα μόνο με τον ζυμομύκητα 248, (δ) τμήματα στελέχους φυτών με ριζοπότισμα θρεπτικού μέσου LB και Pn, (ε) τμήματα στελέχους φυτών με ριζοπότισμα 248 και *Phytophthora nicotianae* (Pn).



**Εικόνα 4.5.2- 44:** Ενδεικτικές φωτογραφίες θετικών αποτελεσμάτων της μεθόδου baiting για την επιβεβαίωση της παρουσίας και ανάπτυξης του ωομύκητα *P. nicotianae* στα φυτά τομάτας. (α, γ, δ και στ): Καρποί αχλαδιού με χαρακτηριστικές κηλίδες ένδειξης προσβολής από τον ωομύκητα *Phytophthora nicotianae* με τη μέθοδο baiting. (β) Καρπός αχλαδιού σε εδαφικό δείγμα στο οποίο πραγματοποιήθηκε ριζοπότισμα μόνο με το θρεπτικό μέσο LB. (ε και η) Ενδεικτικά σποριάγγεια του ωομύκητα *Phytophthora nicotianae*.

### ***In planta* πειράματα στο παθοσύστημα πιπεριά - *P. capsici***

#### **1<sup>ο</sup> Πείραμα**

Το συγκεκριμένο πείραμα που πραγματοποιήθηκε για την επιβεβαίωση της μολυσματικής ικανότητας του στελέχους του ΜΦΙ σε φυτά πιπεριάς έδειξε ότι το στέλεχος του Εργαστηρίου Μυκητολογίας με κωδικό 5 ήταν πολύ μολυσματικό στην πιπεριά.



**Εικόνα 4.5.2- 45:** Πείραμα παθογένειας στελέχους του ωμούκητα *P. capsici* σε φυτά πιπεριάς. Αριστερά: φυτά μάρτυρα, Δεξιά: φυτά στα οποία πραγματοποιήθηκε ριζοπότισμα με τον ωμούκητα *P. capsici*.

## 2<sup>ο</sup> Πείραμα

Στο δεύτερο πείραμα θερμοκηπίου η εφαρμογή του μολύσματος πραγματοποιήθηκε 2 μέρες μετά την εφαρμογή της μικροβιακής απομόνωσης στελέχους ζυμούκητα με κωδικό 248 με ριζοπότισμα, σε φυτά 14 μερών, στα οποία είχαν σχηματισθεί τα 2 πρώτα πραγματικά φύλλα. Πραγματοποιήθηκαν δύο αξιολογήσεις της ασθένειας, μία στις 5 μέρες και μία στις 14 μέρες μετά την τεχνητή μόλυνση.

Μετά το πέρας του πειράματος (23 dpi), πραγματοποιήθηκαν απομονώσεις από φυτικούς ιστούς σε εκλεκτικό θρεπτικό μέσο (PARB), για τον έλεγχο παρουσίας του παθογόνου.



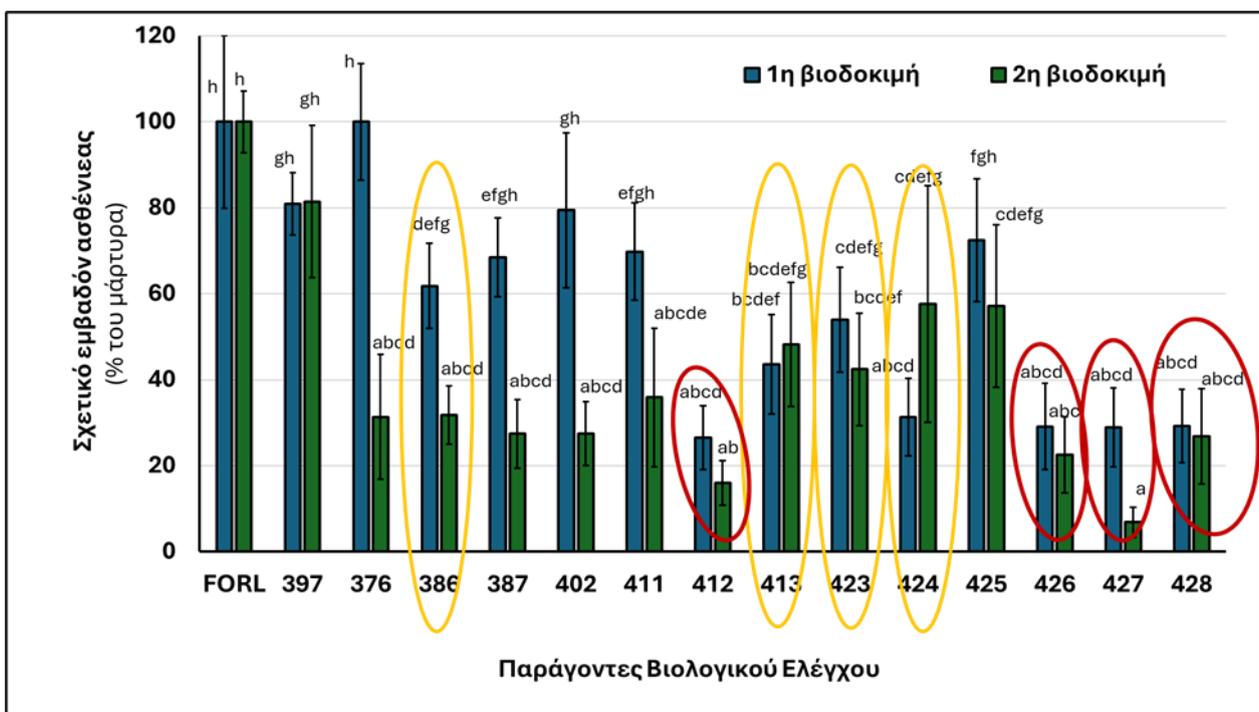
**Εικόνα 4.5.2- 4:** Φωτογραφία του πειράματος 2 στο παθοσύστημα πιπεριά – *P. capsici*.

(α) φυτά στα οποία πραγματοποιήθηκε ριζοπότισμα με το στέλεχος του ζυμομύκητα 248 και *P. capsici*, (β) φυτά όπου πραγματοποιήθηκε ριζοπότισμα μόνο με *P. capsici*.

Σύμφωνα με τις αξιολογήσεις που πραγματοποιήθηκαν σε αυτό το προκαταρτικό πείραμα αποτελεσματικότητας, μέσω μακροσκοπικής παρατήρησης, φάνηκε ότι κατά την εφαρμογή του βιολογικού παράγοντα 248+LB, η ένταση των συμπτωμάτων της ασθένειας περιορίστηκε εμφανώς. Συγκεκριμένα, τα φυτά στα οποία είχαν εφαρμοστεί οι τεχνητές μολύνσεις (θετικοί μάρτυρες) είχαν έντονη προσβολή στον λαιμό καθώς και εντονότερη εικόνα καχεξίας. Τα φυτά πιπεριάς στα οποία εφαρμόστηκε ο βιολογικός παράγοντας εμφανίζονταν περισσότερο εύρωστα, λιγότερο χλωρωτικά και με περιορισμένη προσβολή στον λαιμό, συγκριτικά με τους θετικούς μάρτυρες.

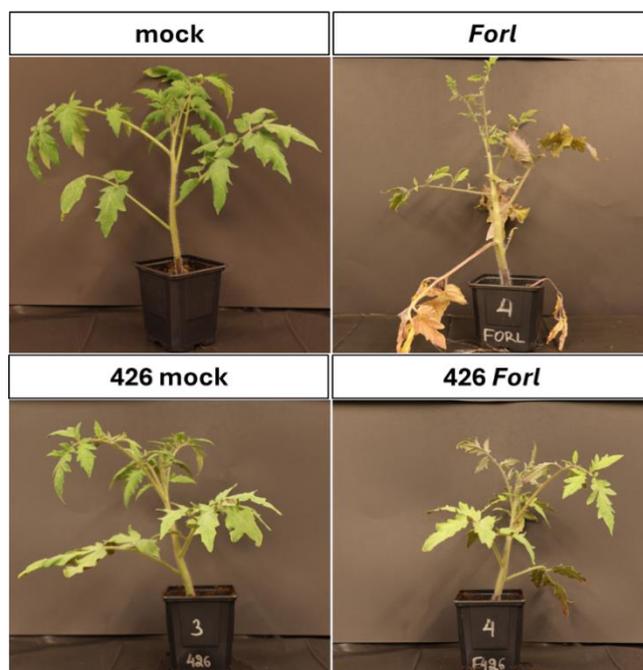
### ***In planta* βιοδοκιμές στο παθοσύστημα τομάτα - *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis lycopersici***

Από τους 19 παράγοντες βιολογικού ελέγχου (ΠΒΕ) που αξιολογήθηκαν σε δύο *in planta* δοκιμές σε φυτά τομάτας έναντι του *FORL*, τέσσερις ΠΒΕ (412, 426, 427 και 428) επέδειξαν υψηλή αποτελεσματικότητα, μειώνοντας την ένταση της ασθένειας κατά 70–93% (**Γράφημα 4.5.2- 23**). Μέτρια αποτελεσματικότητα (~50%) παρουσίασαν οι ΠΒΕ 386, 413, 423 και 424, ενώ οι υπόλοιποι (397, 376, 387, 402, 411 και 425) δεν επηρέασαν σημαντικά την ανάπτυξη του παθογόνου και την εκδήλωση των συμπτωμάτων της ασθένειας.



**Γράφημα 4.5.2- 24:** Αξιολόγηση της δράσης παραγόντων βιολογικού ελέγχου (ΠΒΕ) έναντι του *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* (*FORL*) σε δύο *in planta* δοκιμές. Απεικόνιση του σχετικού εμβαδού κάτω από την καμπύλη εξέλιξης της

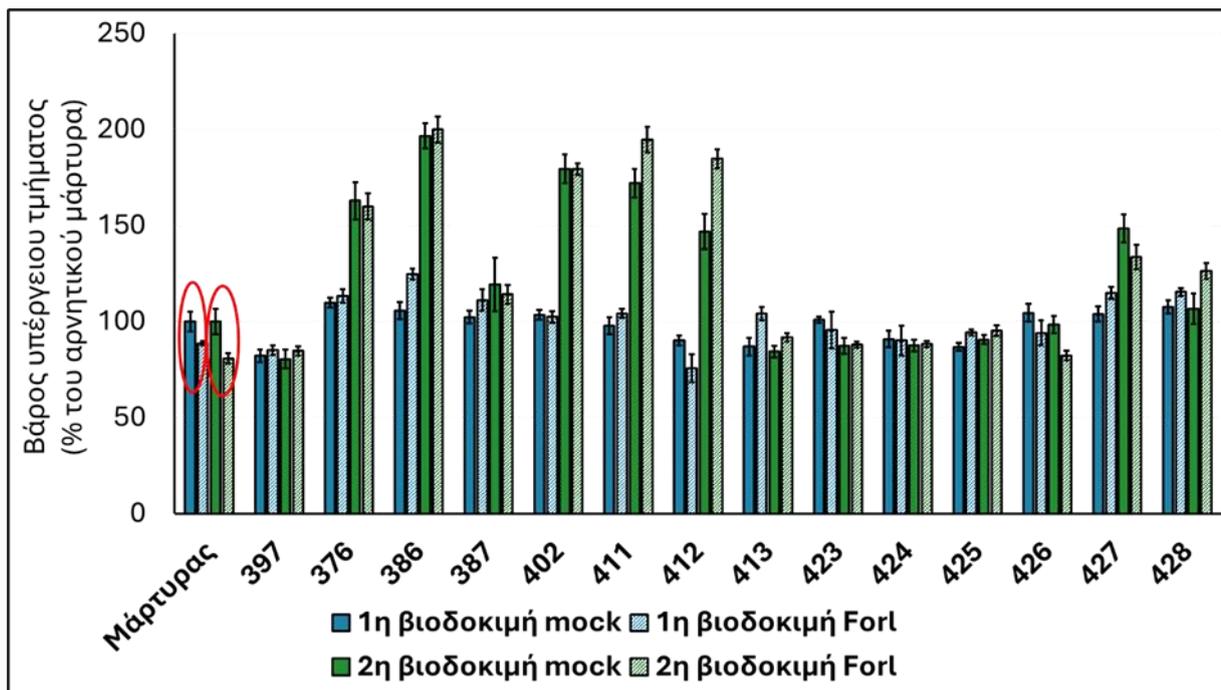
ασθένειας στα φυτά τομάτας μετά την εφαρμογή των ΠΒΕ, εκφρασμένου ως ποσοστό του μέγιστου δυνατού εμβαδού για όλη τη χρονική διάρκεια του πειράματος (Relative AUDPC). Οι κάθετες γραμμές πάνω στις στήλες αντιπροσωπεύουν το τυπικό σφάλμα, ενώ στήλες με διαφορετικά γράμματα διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σύμφωνα με το Fisher's LSD multiple range test ( $P \leq 0,05$ ).



**Εικόνα 4.5.2- 5:** Επίδραση του παράγοντα βιολογικού ελέγχου 426 σε φυτά τομάτας απουσία (mock) και παρουσία του φυτοπαθογόνου μύκητα *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis lycopersici* (FORL) 21 μέρες μετά τη μόλυνση με το παθογόνο.

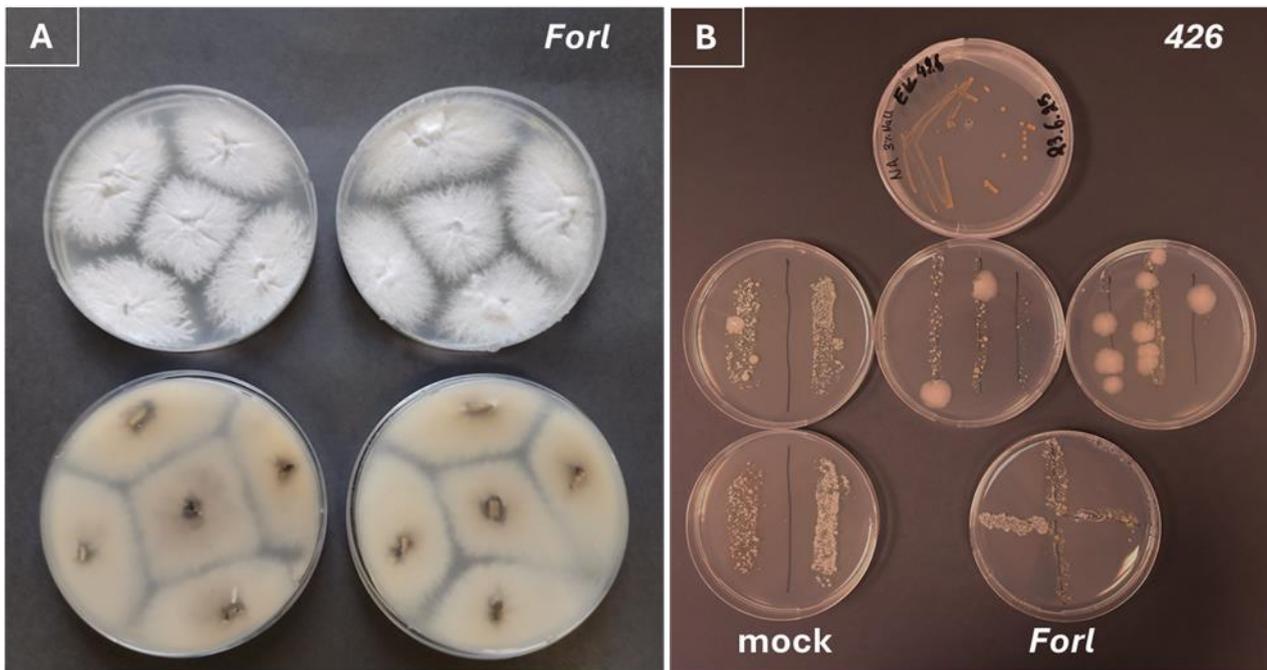
Η μέτρηση του χλωρού βάρους του υπέργειου μέρους των φυτών ανά επέμβαση, στο τέλος και των δύο βιοδοκιμών, παρουσιάζεται στο **Γράφημα 4.5.2- 25**. Τα φυτά του θετικού μάρτυρα (FORL) εμφάνισαν στατιστικά σημαντικά μειωμένη βιομάζα σε σύγκριση με τα αμόλυντα φυτά (αρνητικός μάρτυρας-mock) και στις δύο *in planta* δοκιμές. Αντίθετα, στις επεμβάσεις όπου εφαρμόστηκαν οι ΒΠΕ, η παρουσία του παθογόνου δεν φαίνεται να επηρεάζει αρνητικά το χλωρό βάρος του υπέργειου μέρους των φυτών.

Ο προσδιορισμός του χλωρού βάρους του ριζικού συστήματος δεν αξιολογήθηκε, καθώς κατά τη διαδικασία έκπλυσης των ριζών για την απομάκρυνση του εδαφικού υποστρώματος παρατηρήθηκε απώλεια τμημάτων του ριζικού συστήματος, γεγονός που καθιστά τα δεδομένα μη αξιόπιστα για ανάλυση και εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων.



**Γράφημα 4.5.2- 25:** Επίδραση του φυτοπαθογόνου μύκητα *Fusarium oxysporum f. sp. radicles lycopersici* (FORL) στο χλωρό βάρος του υπέργειου μέρους φυτών τομάτας, μετά από εφαρμογή παράγοντα βιολογικού ελέγχου, στο τέλος δύο *in planta* δοκιμών. Κάθε σημείο αντιπροσωπεύει το μέσο όρο 10 φυτών, ενώ οι κάθετες γραμμές δείχνουν το τυπικό σφάλμα.

Στο τέλος του πειράματος, κατά τη μακροσκοπική εξέταση των ριζών και του στελέχους (εξωτερικά και εσωτερικά) των φυτών τομάτας, παρατηρήθηκε εμφάνιση συμπτωμάτων στο 40–85% των φυτών. Επιπλέον, από το στέλεχος των φυτών που είχαν μολυνθεί με το παθογόνο, επιτεύχθηκε απομόνωση του FORL στο 100% των φυτών και στις δύο *in planta* δοκιμές (**Εικόνα 4.5.2- 48**). Αντίθετα, η απομόνωση των ΠΒΕ κυμάνθηκε από 0–60% στα φυτά που είχαν μολυνθεί με τον μύκητα και από 60–100% στα αμόλυντα φυτά, με εξαίρεση την απομόνωση 386, στην οποία δεν απομονώθηκε ο παράγοντας βιολογικού ελέγχου (0%) (**Εικόνα 4.5.2- 48**).



**Εικόνα 4.5.2-48:** Απομόνωση (A) του φυτοπαθογόνου μύκητα *Fusarium oxysporum f. sp. radices lycopersici* (FORL) και (B) του παράγοντα βιολογικού ελέγχου 426 από τα στελέχη των φυτών τομάτας στο τέλος της *in planta* δοκιμής.

### ***In planta* βιοδοκιμές με consortium μικροβιακών παραγόντων**

Σε συνέχεια της μελέτης των μεμονωμένων μικροβιακών απομονώσεων στα διάφορα παθοσυστήματα, αξιολογήθηκε πιο εντατικά το εμπορικό σκεύασμα ομάδας μικροβιακών απομονώσεων με το εμπορικό όνομα Vitacracin. Το σκεύασμα Vitacracin, που περιέχει *Rhizophagus irregularis*, *Septoglomus deserticola*, *Claroideoglomus etunicatum*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis* και *Bacillus licheniformis*, χρησιμοποιήθηκε με ριζοπότισμα σε διάλυμα 10% (δοσολογία ετικέτας) και αξιολογήθηκε στα εξής παθοσυστήματα:

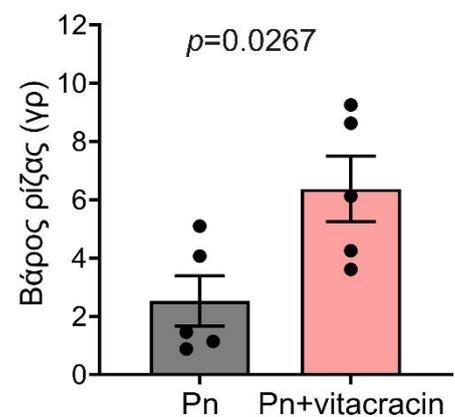
1. Τομάτα- *Phytophthora nicotianae*
2. Πιπεριά-*Phytophthora capsici*
3. Μελιτζάνα- *Verticillium dahliae*

Στο παθοσύστημα τομάτα- *Phytophthora nicotianae* αξιολογήθηκε η δράση του Vitacracin σε φυτά τομάτας ηλικίας 2 μηνών (**Εικόνα 4.5.2- 49**). Πραγματοποιήθηκαν δύο ριζοπότισματα με διαφορά μίας εβδομάδας και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ριζοπότισμα με αιώρημα ζωοσπορίων του ωμομύκητα όπως και στα προηγούμενα πειράματα.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το συγκεκριμένο σκεύασμα προστατεύει τα φυτά από τη μόλυνση από τον ωμομύκητα το οποίο ήταν εμφανές τόσο από τη μείωση των μακροσκοπικών συμπτωμάτων στα φυτά όσο και από τη σημαντική διαφορά στις μετρήσεις του νωπού βάρους της ρίζας μεταξύ των φυτών μαρτύρων μόνο με το παθογόνο και των φυτών όπου εφαρμόστηκε το σκεύασμα.

## Τομάτα

### *P. nicotianae* + Vitacracin



### *P. nicotianae*



**Εικόνα 4.5.2- 49:** Ενδεικτικές εικόνες φυτών τομάτας στις οποίες εφαρμόστηκε το σκεύασμα Vitacracin (*P. nicotianae* + Vitacracin) και φυτά μάρτυρα (*P. nicotianae*), 15 μέρες μετά την τεχνητή μόλυνση με αιώρημα ζωοσπορίων του ωομύκητα *P. nicotianae*. Δεξιά: Γράφημα μετρήσεων του νωπού βάρους της ρίζας των φυτών.

Στο παθοσύστημα πιπεριά- *Phytophthora capsici* αξιολογήθηκε η δράση του Vitacracin σε φυτά πιπεριάς ηλικίας 2 εβδομάδων (**Εικόνα 4.5.2- 50**), εφαρμογή που θα μπορούσε να πραγματοποιείται σε σπορεία. Πραγματοποιήθηκαν δύο ριζοπότισματα με διαφορά μίας εβδομάδας και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ριζοπότισμα με αιώρημα ζωοσπορίων του ωομύκητα όπως και στα προηγούμενα πειράματα.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το συγκεκριμένο σκεύασμα προστάτευσε τα φυτά από τη προσβολή από τον ωομύκητα. Τα φυτά πιπεριάς που δέχτηκαν μόνο το παθογόνο παρουσίασαν έντονη χλώρωση και πλάγιασμα των φυτών, ενώ τα φυτά όπου είχε εφαρμοστεί το σκεύασμα Vitacracin παρουσίασαν λιγότερη χλώρωση χωρίς πλάγιασμα των φυτών, μία εβδομάδα μετά την εφαρμογή του μολύσματος. Επίσης εμφανής ήταν και η προστασία της ρίζας των φυτών που παρόλο που παρουσίασαν καστανό μεταχρωματισμό, εντούτοις είχαν μεγαλύτερο ριζικό σύστημα σε σχέση με τα φυτά που δέχτηκαν μόνο το παθογόνο (**Εικόνα 4.5.2- 50**).

ΠΙΠΕΡΙΑ

Μάρτυρας

*P.capsici*



Vitacracin

*P.capsici* + Vitacracin



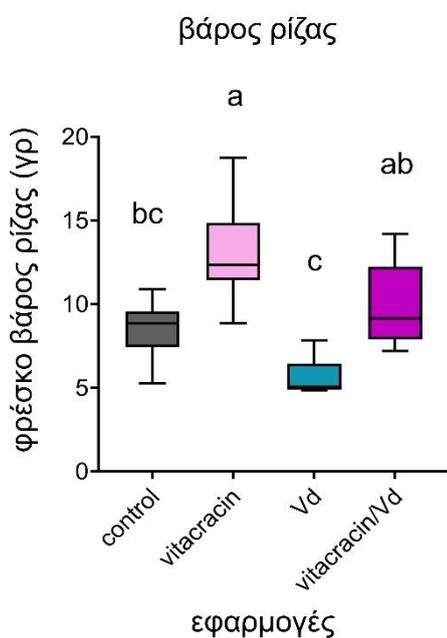
**Εικόνα 4.5.2- 6:** Ενδεικτικές εικόνες φυτών πιπεριάς στις οποίες εφαρμόστηκε το σκεύασμα Vitacracin και φυτά μάρτυρα 7 μέρες μετά τη μόλυνση με αιώρημα ζωοσπορίων του ωομύκητα *P. capsici*. Κάτω από κάθε ομάδα φυτών παρουσιάζονται φωτογραφίες των ριζών.

Στο παθοσύστημα μελιτζάνα- *Verticillium dahliae* αξιολογήθηκε η δράση του Vitacracin σε φυτά μελιτζάνας ηλικίας 3 εβδομάδων (**Εικόνα 4.5.2- 51**). Πραγματοποιήθηκαν δύο ριζοπότισματα με διαφορά μιας εβδομάδας και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ριζοπότισμα με αιώρημα κονιδίων του μύκητα.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το συγκεκριμένο σκεύασμα προστάτευσε σημαντικά τα φυτά από την προσβολή από τον μύκητα. Τα φυτά μελιτζάνας που δέχτηκαν μόνο το

παθογόνο παρουσίασαν έντονη χλώρωση, αποχρωματισμό και πτώση των φύλλων, ενώ τα φυτά όπου είχε εφαρμοστεί το σκεύασμα Vitacracin παρουσίασαν περιορισμένη χλώρωση και φυλλόπτωση, έως και 3 εβδομάδες μετά την εφαρμογή του μολύσματος. Επίσης σημαντική ήταν και η προστασία της ρίζας των φυτών. Τα φυτά στα οποία εφαρμόστηκε το σκεύασμα και το παθογόνο παρουσίασαν βάρους ρίζας όπως ο μάρτυρας (επέμβαση μόνο με νερό), ενώ τα φυτά στα οποία είχε πραγματοποιηθεί μόνο η εφαρμογή του παθογόνου παρουσίασαν σημαντικά μειωμένο βάρος ρίζας (**Εικόνα 4.5.2- 51**).

### μελιτζάνα



### vitacracin + Vd



### Vd



**Εικόνα 4.5.2- 51:** Ενδεικτικές εικόνες φυτών μελιτζάνας στις οποίες εφαρμόστηκε το σκεύασμα Vitacracin και φυτά μάρτυρα 20 μέρες μετά τη μόλυνση με αιώρημα κονιδίων του μύκητα *V. dahliae*. Δεξιά: Γράφημα μετρήσεων του νωπού βάρους της ρίζας των φυτών. Κάτω: φωτογραφίες των ριζών.

### 3 ΣΥΝΟΨΗ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα *in planta* πειράματα ανέδειξαν την αποτελεσματικότητα επιλεγμένων μικροβιακών στελεχών έναντι διαφόρων φυτοπαθογόνων σε καλλιέργειες τομάτας, αγγουριάς, πιπεριάς, μελιτζάνας και αμπελιού. Στο παθοσύστημα τομάτα-Cm, το ριζοπότισμα με το βακτήριο GL32 καθυστέρησε την εμφάνιση συμπτωμάτων βακτηριακού έλκους, ενώ τα SRL768 και GL2 προκάλεσαν πρώιμα συμπτώματα. Στο παθοσύστημα καρπούζι-A. citrulli, το GL5 παρουσίασε τα καλύτερα αποτελέσματα, ακολουθούμενο από SRL879 και SRL871. Στο παθοσύστημα αγγουριά-FORL, το SRL871 μείωσε τη συμπτωματολογία, ενώ τα SRL851 και SRL871 επέδειξαν μειωμένη συχνότητα επαναπομόνωσης. Στο παθοσύστημα μελιτζάνα-Vd, το SRL933 μείωσε τη βερτισιλλίωση, ενώ στο τομάτα-Vd, το SRL987 μείωσε τη συμπτωματολογία και μείωσε την Τελική Ένταση της Ασθένειας από 55,91% (θετικός μάρτυρας) σε 46,43% (SRL987) και 48,33% (SRL879). Στο παθοσύστημα τομάτα-Bc, τα SRL917, SRL851, SRL835, SRL1324 και SRL816 μείωσαν στατιστικά σημαντικά την AUDPC. Τα στελέχη *Bacillus halotolerans* Cal.l.30 και Cal.f.4 μείωσαν τη σήψη ριζών και στελέχους στην αγγουριά και τη βερτισιλλίωση στη μελιτζάνα, βελτίωσαν την ανάπτυξη των φυτών και αύξησαν την καρποφορία, ενώ ενεργοποίησαν την έκφραση γονιδίων άμυνας PR1 και PR4. Συνολικά, τα στελέχη Cal.l.30, Cal.f.4, GL32, GL5, SRL871, SRL987, SRL917, SRL851, SRL835, SRL1324 και SRL816 αποτελούν υποσχόμενα leads για νέα βιολογικά προϊόντα φυτοπροστασίας.

Επιπλέον, η αξιολόγηση άλλων ΠΒΕ απέδειξε υψηλή διαφοροποίηση στην αποτελεσματικότητα ανά παθοσύστημα. Στο ωίδιο αγγουριάς, το Cal.l.30 και το υπερκείμενό του απέδωσαν έως 85% προστασία, ενώ τα στελέχη *Kushneria* 376 και 426 μείωσαν την ένταση της ασθένειας μόνο κατά 20%. Στους ωομύκητες *Phytophthora nicotianae* και *P. capsici*, ο ζυμομύκητας 248 μείωσε έως 85% τις νεκρωτικές κηλίδες στη τομάτα και προστάτευσε τις ρίζες της πιπεριάς, ενώ το Cal.l.30 μείωσε την ένταση προσβολής στο λαιμό της τομάτας αλλά επηρέασε αρνητικά το βάρος των ριζών. Στον περονόσπορο αμπελιού και αγγουριού, το Cal.l.30 μείωσε την προσβολή κατά 95% και 40%, αντίστοιχα, ενώ το *Kushneria* 376 μείωσε την προσβολή δίσκων αμπελιού κατά 65%. Τέλος, το consortium μικροοργανισμών μείωσε σημαντικά τα συμπτώματα σε τομάτα, πιπεριά και μελιτζάνα, βελτιώνοντας την ανάπτυξη των ριζών και μειώνοντας τη συμπτωματολογία του λαιμού, δείχνοντας δυνατότητα χρήσης των ΠΒΕ μόνων τους ή σε συνδυασμό με εμπορικά σκευάσματα όπως το Vitacracin σε προγράμματα βιολογικής διαχείρισης εδαφογενών παθογόνων.

## 4 ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ

### Βιβλιογραφικές αναφορές

- Campbell, C.L., & Madden, L.V., 1990. Introduction to Plant Disease Epidemiology. John Wiley and Sons, New York.
- Christakis Christos A. , Daskalogiannis Georgia , Chatzaki Anastasia , Markakis Emmanouil A. , Mermigka Glykeria , Sagia Angeliki , Rizzo Giulio Flavio , Catara Vittoria , Lagkouvardos Ilias , Studholme David J. , Sarris Panagiotis F. 2021. Endophytic Bacterial Isolates From Halophytes Demonstrate Phytopathogen Biocontrol and Plant Growth Promotion Under High Salinity. *Frontiers in Microbiology* 12.
- Korolev N, Pérez-Artés E, Bejarano-Alcázar J, Rodríguez-Jurado D, Katan J, Katan T and Jiménez-Díaz RM 2001. Comparative study of genetic diversity and pathogenicity among populations of *Verticillium dahliae* from cotton in Spain and Israel. *European Journal of Plant Pathology* 107:443-456.
- LabTools, 2020. Διαθέσιμο Online: : <http://www.labtools.us> Τελευταία Πρόσβαση 21.08.2023.
- Vakalounakis D.J. 1996. Root and stem rot of cucumber caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum* f. sp. nov. *Plant Disease*, 80(3), 313.
- Vakalounakis, D.J., Doulis, A.G. and Klironomou, E. 2005. Characterization of *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-cucumerinum* attacking melon under natural conditions in Greece. *Plant Pathology* 54: 339-346.
- 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.I.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.I.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
- Pavlou, G.C., Vakalounakis, D.J., Ligoxigakis, E.K. (2002). Control of root and stem rot of cucumber, caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum*, by grafting onto resistant 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>
- Margaritopoulou, M., Nastos, S., Kotsaridis, K., Maratos, M., Fotopoulou, E., Tsalgatidou, P.C., Venieraki, A., Markellou, E. (2026). Biocontrol potential of *Bacillus halotolerans* Cal.I.30 and *Bacillus velezensis* Cal.r.29 against cucumber powdery mildew. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 141, 102994. doi.org/10.1016/j.pmpp.2025.102994.
- 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. I. 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.
- A. Pérez-García, D. Romero, D. Fernández-ortuño, F. Lopez-Ruiz, A. De Vicente, J.A. Tores, The powdery mildew fungus *Podosphaera fusca* (synonym *Podosphaera xanthii*), a constant threat to cucurbits, *Molecular Plant Pathology* 10(2) (2009) 153-160.
- M.T. McGrath, Fungicide resistance in cucumber powdery mildew: experiences and challenges, *Plant disease* 85(3) (2001) 236-245.
- C. Yue, C. Du, X. Wang, Y. Tan, X. Liu, H. Fan, Powdery mildew-induced changes in phyllosphere microbial community dynamics of cucumber, *FEMS Microbiology Ecology* 100(5) (2024) fae050.
- E. Ünlü, Ö. Çalış, A. Say, A.A. Karim, H. Yetişir, S. Yılmaz, Investigation of the effects of *Bacillus subtilis* and *Bacillus thuringiensis* as bio-agents against powdery mildew (*Podosphaera xanthii*) disease in zucchini (*Cucurbita pepo* L.), *Microbial Pathogenesis* 185 (2023) 106430.
- Y. Li, Y. Gu, J. Li, M. Xu, Q. Wei, Y. Wang, Biocontrol agent *Bacillus amyloliquefaciens* LJ02 induces systemic resistance against cucurbits powdery mildew, *Frontiers in Microbiology* 6 (2015) 883.