



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

Παραδοτέο Π.4.5.3: Αποτελέσματα μελετών τρόπου δράσης – επαγωγής άμυνας φυτών επιλεγμένων στελεχών μικροοργανισμών

Πληροφορίες για το έγγραφο

Αριθμός παραδοτέου: **Π.4.5.3**

Ενότητα εργασίας: **ΕΕ4**

Επικεφαλής δικαιούχος: **[ΓΠΑ/ΕΛΓΟ-ΔΗΜΗΤΡΑ/ΜΦΙ/ΑΠΘ/ΔΠΘ/ΙΤΕ/ΕΛΜΕΠΑ]**

Συγγραφείς: **[Παναγιώτης Σαρρής, Παναγιώτης Μόσχου]**

Έκδοση: **1.0**

Είδος Παραδοτέου: **[Έκθεση-Δημοσίευση]**

Ημερομηνία παράδοσης: **[15/12/2025]**

Στοιχεία Πράξης

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

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

Κωδικός πράξης: ΤΑΕΔΡ-0535675

Ακρωνύμιο έργου: InnoPP

Ημερομηνία έναρξης: 15 Μαΐου 2023

Διάρκεια: 28 Μήνες
Συντονιστής Φορέας: Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών
Συντονιστής/ Επιστημονικός Υπεύθυνος: Ιωάννης Βόντας

Πίνακας Περιεχομένων

Contents

1	ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΣΤΟΧΟΙ	4
2	ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΩΝ ΕΡΓΑΣΙΩΝ	5
2.1	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	5
2.2	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	8
3	ΣΥΝΟΨΗ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	17
4	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι	18

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

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

Συνοπτική παρουσίαση του παραδοτέου 4.5.3

Σκοπός του παραδοτέου Π4.5.3 είναι να διερευνηθούν οι μηχανισμοί δράσης διαφόρων ενδοφυτικών απομονώσεων, τα οποία έχουν αποδειχθεί αποτελεσματικοί βιολογικοί παράγοντες σε φυτά μοντέλα και κηπευτικά (σολανώδη).

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,
- Ινστιτούτο Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας (IMBB) του Ιδρύματος Έρευνας και Τεχνολογίας (ΙΤΕ), και στο εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας φυτών του Καθ. Π. Μόσχου.

1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΣΤΟΧΟΙ

Εισαγωγή

Οι φυτικοί οργανισμοί έρχονται αντιμέτωποι με διάφορα παθογόνα σε όλο τον κύκλο της ζωής τους, όπως βακτήρια, μύκητες, έντομα, νηματώδεις κ.α. Ιδιαίτερα οι καλλιέργειες σημαντικά οικονομικών ειδών προσβάλλονται από μία πληθώρα παθογόνων, με αποτέλεσμα τη μείωση της παραγωγής παγκοσμίως. Το γεγονός αυτό έχει οδηγήσει στην ευρεία χρήση φυτοφαρμάκων, με δραματικές επιπτώσεις σε πολλά οικοσυστήματα (Daraban et al., 2023). Από την πλευρά τους, τα φυτά διαθέτουν μία πληθώρα μηχανισμών για να αντιμετωπίζουν τα διάφορα παθογόνα. Ένας από αυτούς είναι και το ωφέλιμο «μικροβίωμα» τους, το οποίο διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη ή μη της παθογένειας, εκτός από την αυξημένη παροχή σε μέταλλα και θρεπτικά στοιχεία, την προώθηση της ανάπτυξής τους και την ευεργετική τους δράση έναντι αβιοτικών καταπονήσεων (Pieterse et al., 2014). Τα τελευταία χρόνια μελετάται η συμβολή των ωφέλιμων μικροβίων σε φυτικούς οργανισμούς στην προετοιμασία και επαγωγή της άμυνας τους, απουσία του παθογόνου, μία κατάσταση που ονομάζεται επαγόμενη συστημική αντίσταση (Induced Systemic Resistance, ISR) (priming), και το πώς αυτή τους βοηθά να αντιμετωπίσουν μελλοντικές μολύνσεις από παθογόνα μικρόβια (Pieterse et al., 2014).

Σκοπός του παρόντος εγγράφου

Στην παρούσα υποενότητα εργασίας 4.5.3 μελετήθηκε η ικανότητα επιλεγμένων μικροβιακών στελεχών να επάγουν την άμυνα των φυτών (priming) μέσω χρήσης μελετών RT-qPCR και τρανσκριπτομικής ανάλυσης.

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), 2.2. Αποτελέσματα και Συζήτηση (με υποπαραγράφους ανά πείραμα).
- 3. Σύνοψη και Συμπεράσματα:** Βασικά ευρήματα της έρευνας και σχετικά συμπεράσματα.
- 4. Παράρτημα:** Βιβλιογραφικές αναφορές και δημοσίευση αποτελεσμάτων σε συνέδριο της ΕΦΕ.

2 ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΩΝ ΕΡΓΑΣΙΩΝ

2.1 Υλικά και Μέθοδοι

2.1.1 Αποτελέσματα μελετών τρόπου δράσης – επαγωγής άμυνας φυτών επιλεγμένων στελεχών μικροοργανισμών (Εργ. Καθ. Π. Σαρρή)

Προκειμένου να διερευνηθούν οι μηχανισμοί δράσης ενδοφυτικών μικροβιακών απομονώσεων ως προς την ικανότητά τους να επάγουν την άμυνα των φυτών, επιλέχθηκαν μικροοργανισμοί για τους οποίους δε φάνηκε να υπάρχει κάποια *in vitro* δράση ενάντια σε εξεταζόμενα φυτοπαθογόνα (**Εικόνα 4.5.3-1**). Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν οι ενδοφυτικές απομονώσεις SRL307, SRL347 και SRL386.

Τα φυτά που χρησιμοποιήθηκαν ήταν η ποικιλία της τομάτας Micro-Tom, η οποία είναι μία ποικιλία «νανάκι», χαρακτηριστική για τον γρήγορο κύκλο ζωής της (γρήγορη ανάπτυξη και καρποφορία). Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκήπιο.

Οι μικροοργανισμοί SRL307, SRL347 και SRL386 μεγάλωσαν σε πλούσιο θρεπτικό μέσο Nutrient Agar (NA) και στη συνέχεια μία μικρής κλίμακας (5 mL σε 50 mL χωρητικότητας Falcon δοκιμαστικό σωλήνα) προκαλλιέργεια Nutrient Broth (NB) εμβολιάστηκε με τον εκάστοτε μικροοργανισμό (ημέρα 0). Την επόμενη ημέρα, μεγαλύτερες καλλιέργειες (250 mL σε 2 λίτρα γυάλινες κωνικές φλάσκες) NB εμβολιάστηκαν με την κάθε προκαλλιέργεια (ημέρα 1) και αφέθηκαν να μεγαλώσουν για ~ 36 ώρες, στους 28° C, υπό ανάδευση (200 rpm). Την 3^η ημέρα, όταν οι καλλιέργειες είχαν κορεστεί, τα δείγματα προετοιμάστηκαν για ριζοπότισμα. Συγκεκριμένα, οι μικροοργανισμοί φυγοκεντρήθηκαν σε 2700 rpm για 10 λεπτά, ξεπλύθηκαν με αποστειρωμένο υπερκάθαρο νερό και στη συνέχεια, συγκεντρώθηκαν σε τελική συγκέντρωση που να αντιστοιχεί σε 10⁸ κύτταρα/mL. Κάθε φυτό τομάτας ριζοποτίστηκε με συνολικά 15 mL, ενώ για κάθε χειρισμό υπήρχαν τρεις βιολογικές επαναλήψεις. Ως μάρτυρας ελέγχου χρησιμοποιήθηκε απιονισμένο νερό. Ακολούθησε συλλογή του φυλλικού ιστού στις 0, 24, 48 και 72 ώρες (3 επαναλήψεις * 4 χειρισμούς * 4 χρονικά διαστήματα = 48 φυτικά δείγματα). Τα φυτά έως και τις 72 ώρες δεν εμφάνισαν κάποιο φαινότυπο (**Εικόνα 4.5.3-2**).

Μετά τη συλλογή ιστού, ακολούθησε λειοτριβήση του ιστού σε υγρό άζωτο και εκχύλιση ολικού RNA με τη μέθοδο θειοκυανικής γουανιδίνης-φαινόλης-χλωροφορμίου. Συγκεκριμένα, 1 mL διαλύματος εξαγωγής RNA (φαινόλη 38% v/v, 0.8 M ισοθειοκυανική γουανιδίνη, 0.4 M θειοκυανικό αμμώνιο, 0.1 M οξικό νάτριο, γλυκερόλη 5% v/v) προστέθηκαν σε 100 mg λειοτριβημένου ιστού και αναμειχθηκαν έντονα με τη χρήση αναδευτήρα σωληναρίων (vortex). Έπειτα από επώαση για 10 λεπτά στους 28°C πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρωση σε 12,600 × g για 10 λεπτά στους 4°C. Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε καθαρό σωληνάριο και προστέθηκαν 200 μL χλωροφόρμιο. Το μείγμα ανακινήθηκε και τα δείγματα επώαστηκαν για 10 λεπτά στους 28°C. Ακολούθησε φυγοκέντρωση σε 12,600 × g για 10 λεπτά στους 4°C και η υδατική φάση απομονώθηκε και αναμειχθηκε με 250 μL ισοπροπανόλη και 250 μL διάλυμα αλάτων (0.8 M κιτρικό νάτριο, 1.2 M NaCl). Έπειτα από επώαση για 10 λεπτά στους 28°C πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρωση σε 12,600 × g για 10 λεπτά στους 4°C. Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και το ίζημα (που περιλαμβάνει τα νουκλεϊκά οξέα) ξεπλύθηκε με την προσθήκη 75% αιθανόλης και φυγοκέντρωση για 5 λεπτά στους 4°C. Η αιθανόλη απομακρύνθηκε και αφού το ίζημα στέγνωσε, επαναδιαλυτοποιήθηκε σε 40

μL υπερκάθαρο νερό. Η ποσότητα του RNA μετρήθηκε στη συσκευή NanoDrop™ Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, United States) και η ποιότητά του ελέγχθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1% β/ό.

Το απομονωμένο RNA, προτού χρησιμοποιηθεί στις αντιδράσεις αντίστροφης μεταγραφής, υπέστη κατεργασία με DNase I (Roche, Basel, Switzerland) για να απομακρυνθούν υπολείμματα DNA. Οι αντιδράσεις προετοιμάστηκαν σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή και επώαστηκαν στους 37°C για μία ώρα, ενώ η μέθοδος απενεργοποίησης του ενζύμου ήταν διαφορετική στην περίπτωση που το RNA χρησιμοποιήθηκε μόνο για αντίστροφη μεταγραφή και qRT-PCR, ή για RNA-seq.

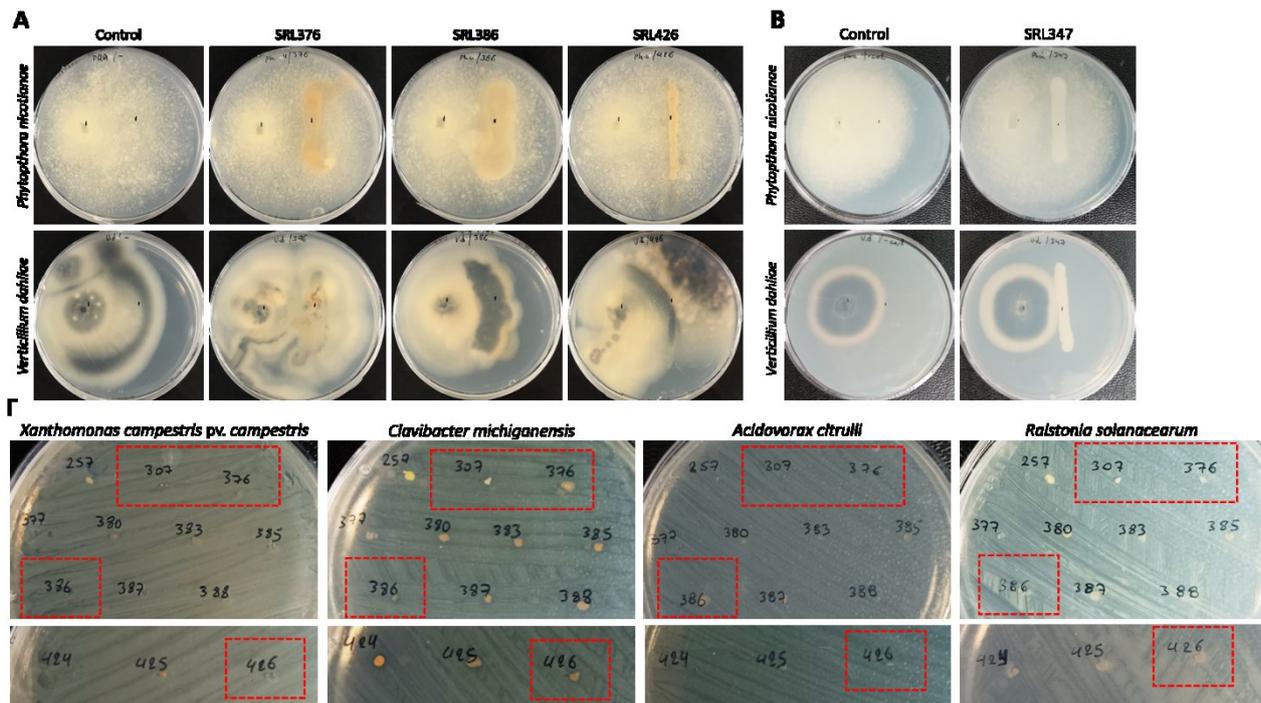
Όταν το RNA δεν προοριζόταν για μεταγραφωμική αλληλούχηση, η απενεργοποίηση έγινε με τρεις κύκλους ψύξης-τήξης της αντίδρασης με χρήση υγρού αζώτου. Σε περίπτωση που το RNA προοριζόταν για μεταγραφωμική αλληλούχηση η απενεργοποίηση έγινε με φαινόλη και ακολούθησε περαιτέρω καθαρισμός των δειγμάτων. Συγκεκριμένα, προστέθηκε υπερκάθαρο νερό σε κάθε αντίδραση ώστε να φτάσει τον όγκο των 200 μL και στη συνέχεια προστέθηκαν 200 μL φαινόλης. Τα δείγματα αναδεύτηκαν και ακολούθησε φυγοκέντρηση σε 16,000 × g για 3 λεπτά. Η υδατική φάση απομονώθηκε και αναμιχθηκε με ίσο όγκο διαλύματος χλωροφορμίου και ισοαμλικής αλκοόλης σε αναλογία 24:1 και ακολούθησε φυγοκέντρηση σε 16,000 × g για 3 λεπτά. Η υδατική φάση απομονώθηκε και αναμιχθηκε με δύομισι φορές τον όγκο της σε 100% αιθανόλη και το 1/10 του όγκου της σε 3 M οξικό νάτριο pH 5.2. Έπειτα, επώαστηκε στους -20°C για 30 λεπτά. Ακολούθησε φυγοκέντρηση σε 16,000 × g, στους 4°C για 30 λεπτά και απομακρύνθηκε το υπερκείμενο. Το ίζημα ξεπλύθηκε με την προσθήκη 70% αιθανόλης και φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στους 4°C. Η αιθανόλη απομακρύνθηκε και αφού το ίζημα στέγνωσε, επαναδιαλυτοποιήθηκε σε 40 μL υπερκάθαρο νερό. Το RNA αποθηκεύτηκε στους -80°C και η αλληλούχηση ολικού μεταγραφώματος πραγματοποιήθηκε στην εταιρεία BGI Genomics (έδρα Πολωνία). Για την ανάλυση των αποτελεσμάτων αξιοποιήθηκε η πλατφόρμα Dr. Tom Data Visualisation Solution (BGI Genomics, China).

Για την αντίστροφη μεταγραφή του RNA χρησιμοποιήθηκε η αντίστροφη μεταγραφάση Engineered M-MLV Reverse Transcriptase Basic Kit (EnzyQuest, Ηράκλειο Κρήτης, Ελλάδα) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Ως υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε 1 μg RNA.

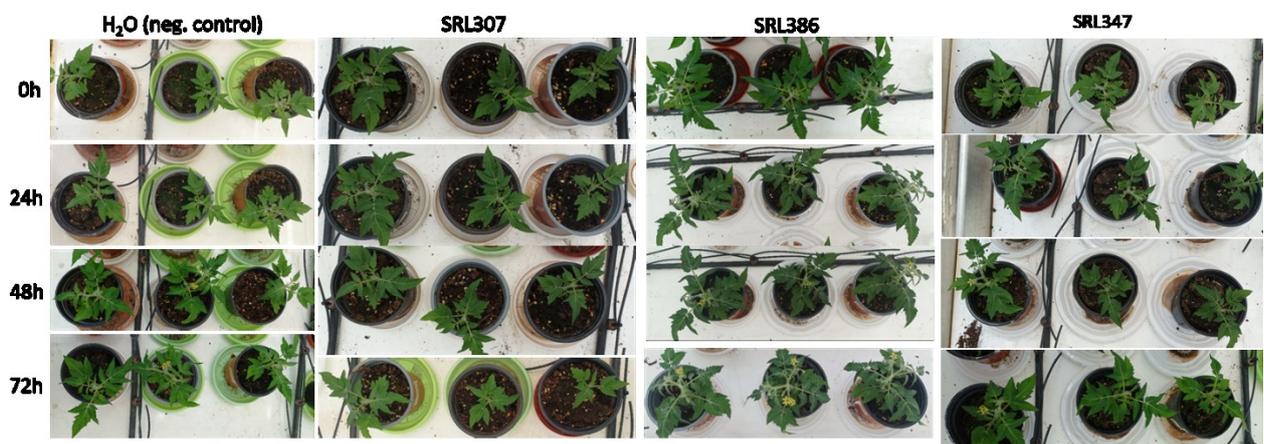
Η qPCR έγινε στο σύστημα CFX96 Connect Real-Time PCR Detection System (Bio-rad, Hercules, California, United States). Για την προετοιμασία της αντίδρασης χρησιμοποιήθηκε το μείγμα KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix (2X) Universal (Roche, Basel, Switzerland) με τελικό όγκο αντίδρασης τα 10 μL, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η ποσότητα του RNA ανά αντίδραση ήταν 2 ng. Το πρόγραμμα της PCR περιλάμβανε επώαση στους 95°C για 3 λεπτά, 40 κύκλους πολλαπλασιασμού (95°C για 10 δευτερόλεπτα, 60°C για 20 δευτερόλεπτα, 75°C για 1 δευτερόλεπτο) και ένα στάδιο σχεδιασμού καμπύλης τήξεως (95°C για 15 δευτερόλεπτα, 65°C για 5 δευτερόλεπτα και αύξηση της θερμοκρασίας έως τους 95°C ανά 0.5°C τη φορά.

Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν μέσω της εφαρμογής Bio-Rad CFX Manager Έκδοση 3.0 (Bio-rad, Hercules, California, United States). Ως γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο που κωδικοποιεί για την ακτίνη της τομάτας (Victor Flors et al., 2007)

(Πίνακας 4.5.3-1). Για τη σύγκριση των επιπέδων έκφρασης των επιλεγμένων γονιδίων μεταξύ των υπό μελέτη φυτών και των φυτών-ελέγχου ακολουθήθηκε η μέθοδος ΔΔCt (Livak & Schmittgen, 2001). Για τη γραφική αναπαράσταση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκαν οι μέσοι όροι έκφρασης για κάθε γονίδιο \pm τυπικό σφάλμα (means \pm SEM) και αξιοποιήθηκε η εφαρμογή GraphPad Prism version 8.0 (GraphPad Software).



Εικόνα 4.5.3-1. *In vitro* δοκιμασίες αντιπαραβολών μικροβιακών απομονώσεων ενάντια διαφόρων φυτοπαθογόνων. Α, Β. Απουσία κάποιας αναστολής στην ανάπτυξη του φυτοπαθογόνου μύκητα *Verticillium dahliae* και φυτοπαθογόνου ωομύκητα *Phytophthora nicotianae* (20 ημέρες ανάπτυξης στους 25° C) από τα SRL376, SRL386 και SRL426 (Α) και SRL347 (Β) (σε σχέση με τους αντίστοιχους μάρτυρες-controls). Να σημειωθεί πως ο *Verticillium dahliae* στις δύο εικόνες στο (Β) έχει αναπτυχθεί για 10 ημέρες στους 25° C. Γ. Απουσία κάποιας αναστολής στην ανάπτυξη των φυτοπαθογόνων βακτηρίων *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, *Clavibacter michiganensis*, *Acidovorax citrulli* και *Ralstonia solanacearum* (3 ημέρες ανάπτυξης στους 28° C) από τα SRL307, SRL376, SRL386 και SRL426 (κόκκινα τετράγωνα).



Εικόνα 4.5.3-2. Φαινοτυπικός έλεγχος των φυτών τομάτας ποικιλίας Micro-Tom στις 0, 24, 48 και 72 ώρες μετά το ριζοπότισμα με τις μικροβιακές απομονώσεις SRL307, SRL386 και SRL426. Ως μάρτυρας

ελέγχου, τα φυτά ποτίστηκαν με απιονισμένο, αποστειρωμένο νερό.

Πίνακας 4.5.3-1. Νουκλεοτιδικές αλληλουχίες των ζευγών εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την RT-qPCR.

	Αλληλουχία (5' → 3')		Αλληλουχία (5' → 3')
SIActin-Fw	AAC TGGGATGATATGGAGAAGA	SIActin-Rv	TCTCAACATAATCTGGGTCAT
SIPR1-Fw	TCTTGTGAGGCCCAAATTC	SIPR1-Rv	ATAGTCTGGCCTCTCGGACA
SIPDF1A-Fw	TACAGTTCTGCCACTGCTCG	SIPDF1A-Rv	AACTCCGGGTGCATTTCTCA
SILoxD-Fw	CCATCCTCACCACCTCATC	SILoxD-Rv	TACTCGGGATCGTTCTCGTC

2.2 Αποτελέσματα

2.2.1 Αποτελέσματα RT-qPCR συγκεκριμένων γονιδίων σηματοδοτικών μονοπατιών

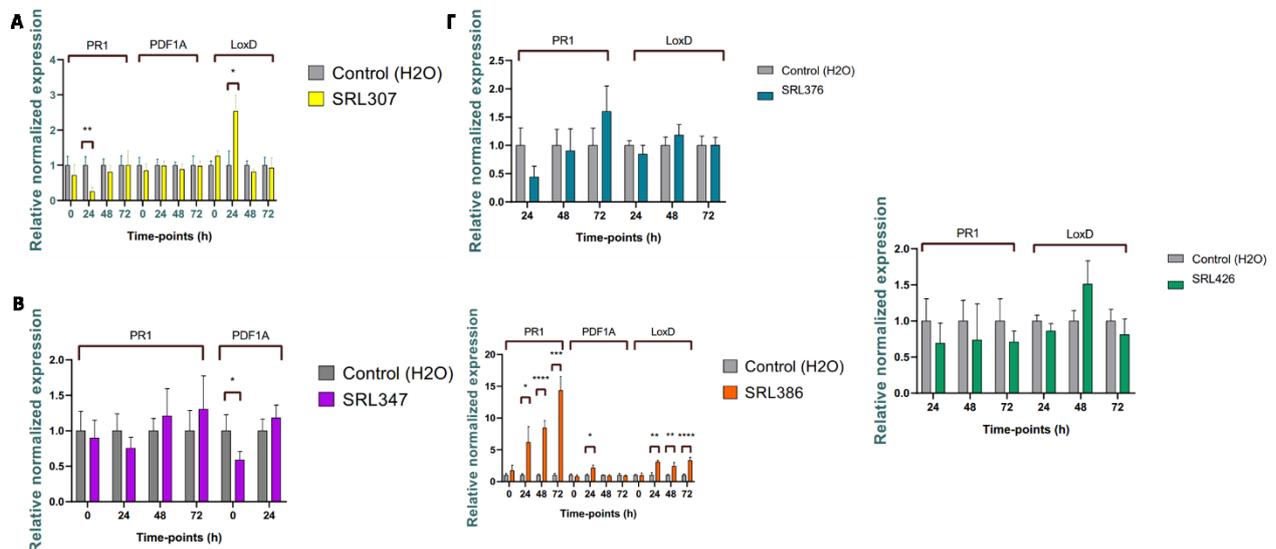
Για να διαπιστωθεί εάν οι υπό εξέταση βακτηριακές απομονώσεις έχουν την ικανότητα να επάγουν την άμυνα των φυτών, πραγματοποιήθηκε αρχικά έλεγχος με τη χρήση ποσοτικής PCR σε πραγματικό χρόνο (RT-qPCR), ελέγχοντας την έκφραση στα φύλλα σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα από το ριζοπότισμα. Για το σκοπό αυτό, επιλέχθηκαν τα γονίδια των σηματοδοτικών μονοπατιών του σαλικυλικού οξέος, *PR1* (Solyc09g007010.1) (Aimé et al., 2013) και του γιασμονικού οξέος, *PDF1A* (Solyc07g015860.3) και *LoxD* (Solyc03g122340.3) (Dimoroulou et al., 2019) (οι αλληλουχίες των εκκινητών απεικονίζονται στον **Πίνακα 4.5.3-1**, Μέρος 2.1). Στην **εικόνα 4.5.3-3**, παρουσιάζονται συνολικά τα διαγράμματα της έκφρασης των διαφορετικών γονιδίων, ανά χειρισμό και χρονικό διάστημα μετά το ριζοπότισμα με τις μικροβιακές απομονώσεις SRL307, SRL347, SRL386, SRL376 και SRL426.

Η απομόνωση SRL307 είναι ένας στρεπτομύκτης και το ριζοπότισμα φυτών τομάτας έδειξε στις 24 ώρες μείωση του *PR1* γονιδίου και ταυτόχρονα αύξηση της έκφρασης του *LoxD* γονιδίου, ενώ η έκφραση του *PDF1A* έμεινε ανεπηρέαστη σε όλα τα χρονικά διαστήματα (**Εικόνα 4.5.3-3Α**).

Η απομόνωση SRL347 είναι ένας ζυμομύκτης και το ριζοπότισμα φυτών τομάτας δεν έδειξε στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα για την έκφραση του *PR1*, ενώ στις 0 ώρες τα επίπεδα της έκφρασης του *LoxD* των φυτών ήταν ήδη μειωμένα, τα οποία φαίνονται στις 24 ώρες να ανεβαίνουν αλλά χωρίς στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα (**Εικόνα 4.5.3-3Β**).

Οι απομονώσεις SRL376, SRL386 και SRL426 ανήκουν στο γένος *Kushneria* και το ριζοπότισμα με τις τρεις διαφορετικές απομονώσεις, που φαίνεται να είναι καινούρια είδη και διαφορετικά μεταξύ τους (βλ. Π4.5.4), εμφάνισαν διαφορετικά αποτελέσματα (**Εικόνα 4.5.3-3Γ**). Η απομόνωση SRL386 έδειξε την πιο ισχυρή επαγωγή της άμυνας, με την έκφραση των *PR1* και *LoxD* γονιδίων να βρίσκεται σε όλα τα χρονικά διαστήματα που μελετήθηκαν αυξημένη. Παράλληλα, και η έκφραση του *PDF1A* στις 24 ώρες ήταν αυξημένη. Οι άλλες δύο απομονώσεις *Kushneria* spp. δεν έδειξαν στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα, παρόλο που φαίνεται μία αυξητική τάση στις 72 ώρες του *PR1* στην

περίπτωση του SRL376 και στις 48 ώρες του *LoxD* στην περίπτωση του SRL426.



Εικόνα 4.5.3-3. Γραφήματα με την έκφραση γονιδίων PR1, PDF1A και *LoxD* στα φύλλα τομάτας ύστερα από μεταχείριση (Α) με την απομόνωση SRL307 που ανήκει στο γένος *Streptomyces* (κίτρινο χρώμα), (Β) το ζυμομύκητα SRL347 (Β) (μωβ χρώμα) και (Γ) τις απομονώσεις SRL376 (μπλε χρώμα), SRL386 (πορτοκαλί χρώμα) και SRL426 (πράσινο χρώμα) που ανήκουν στο γένος *Kushneria*.

2.2.2 Αποτελέσματα μεταγραφωμικής ανάλυσης της τομάτας μετά τις μεταχειρίσεις με τις απομονώσεις SRL307 και SRL386.

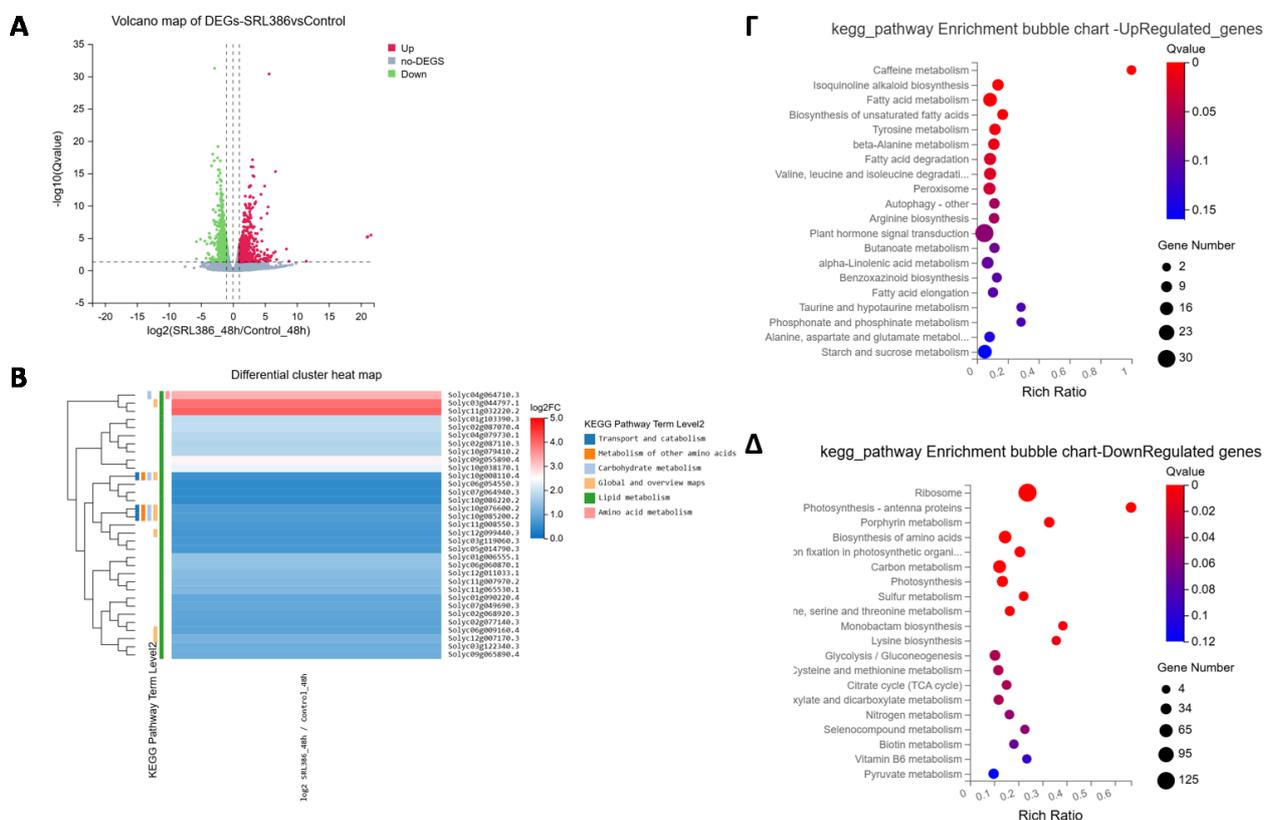
Εκτός από την αξιολόγηση συγκεκριμένων γονιδίων, που αφορούν τη σηματοδότηση της άμυνας μέσω κυρίως των σηματοδοτικών μονοπατιών του σαλικυλικού οξέος και του γιασμονικού οξέος, πραγματοποιήθηκε μεταγραφωμική ανάλυση των φυτών τομάτας σε συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα και μεταχειρίσεις. Πιο αναλυτικά, παρατηρείται στον **Πίνακα 4.5.3-2** τα δείγματα και η αλληλούχιση που πραγματοποιήθηκε στην BGI.

Πίνακας 4.5.3-2. Επιλεγμένα δείγματα φυτών τομάτας από το παραπάνω πείραμα (2.1.2) στάλθηκαν για mRNA ή/και lncRNA και sRNA seq.

Μεταχείριση	Χρονικό διάστημα	Αλληλούχιση	Τεχνολογία Αλληλούχισης
SRL386 (vs H ₂ O)	48 ώρες	mRNA seq	DNBSEQ Eukaryotic Transcriptome PE150
		lncRNA seq	DNBSEQ PE100
		sRNA seq	DNBSEQ UMI Small RNA sequencing
SRL307 (vs H ₂ O)	24 ώρες	mRNA seq	DNBSEQ Eukaryotic Transcriptome PE150

Μετά την αλληλούχιση ακολούθησε βασική ανάλυση των δειγμάτων από την BGI και περαιτέρω ανάλυση στην πλατφόρμα Dr. Tom Data Visualisation Solution (BGI Genomics, China). Το γονιδίωμα αναφοράς που χρησιμοποιήθηκε στην ανάλυση ήταν το *Solanum lycopersicum* ITAG4.0. Στη μεταχείριση των φυτών τομάτας με το SRL386,

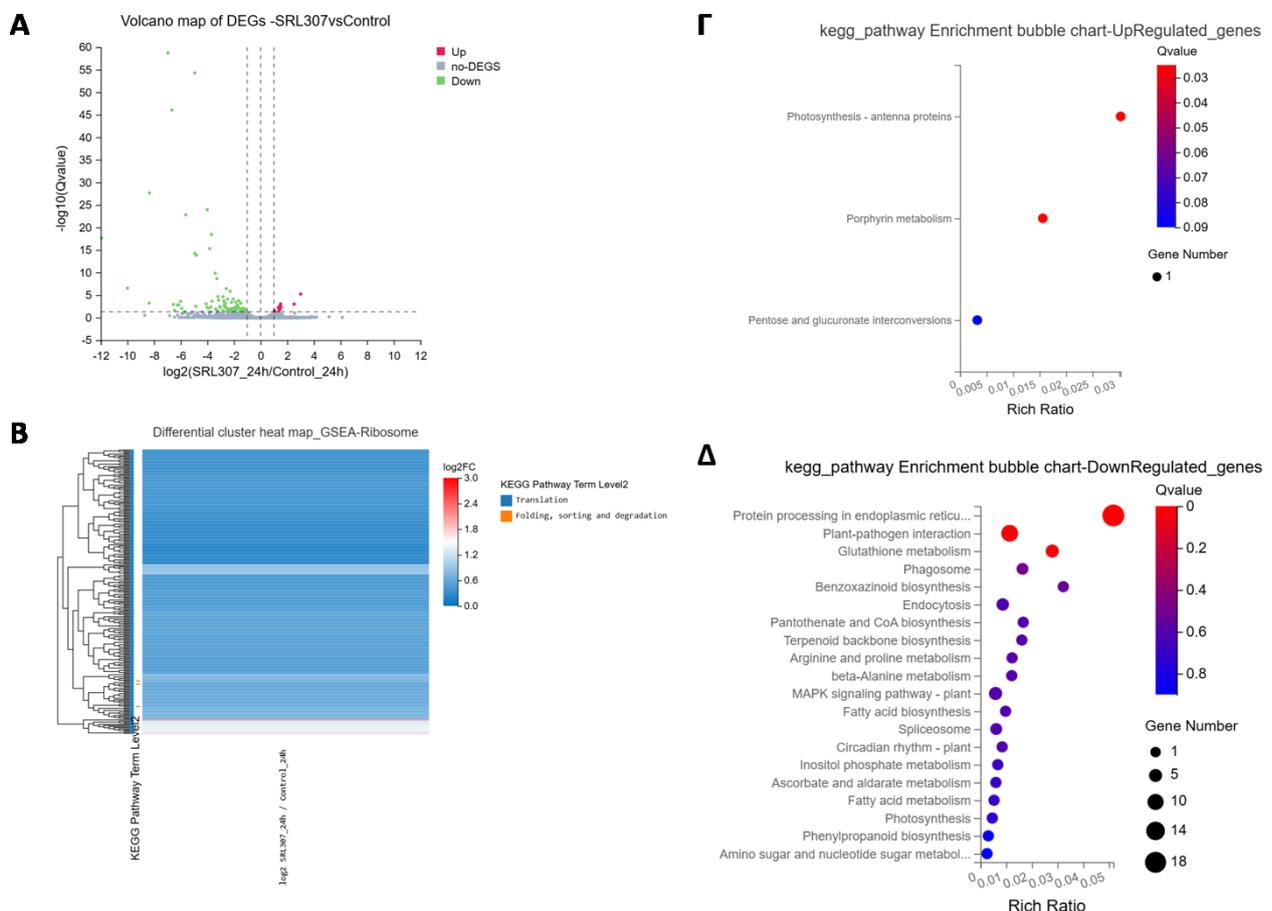
μεταβλήθηκε η έκφραση συνολικά 2102 γονιδίων και συγκεκριμένα 931 ανοδικά και 1171 καθοδικά. Στην **εικόνα 4.5.3-4Α** παρουσιάζονται τα διαφορικά εκφραζόμενα (υπερ- και υπο-εκφραζόμενα) γονίδια σε ένα γράφημα τύπου Volcano, σε σχέση με τα δείγματα ελέγχου ($Q \text{ value} \geq 1$). Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε μία ανάλυση εμπλουτισμού γονιδιακών συνόλων (Gene Set Enrichment Analysis, GSEA) με σκοπό να προσδιοριστούν τα μονοπάτια KEGG που παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές και συνεπείς διαφορές μεταξύ των δύο ομάδων (SRL386 σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου). Στην ανάλυση αυτή λαμβάνονται υπόψη οι παράγοντες NES (Normalized Enrichment Score) και FDR, που είναι μία διορθωμένη τιμή στατιστικής σημαντικότητας πολλαπλών υποθέσεων (όσο μικρότερη είναι η FDR, τόσο πιο αξιόπιστο είναι το αποτέλεσμα εμπλουτισμού). Τα 5 πιο εμπλουτισμένα μονοπάτια στην ανάλυση αυτή αφορούσαν το μεταβολισμό του α-λινολενικού οξέος (00592), την αυτοφαγία (04136), την αποικοδόμηση της βαλίνης, λευκίνης και ισολευκίνης (00280), την αποικοδόμηση των λιπαρών οξέων (00071) και τη βιοσύνθεση βενζοξαζινοειδών (00402). Συγκεκριμένα, στο μονοπάτι του μεταβολισμού του α-λινολενικού οξέος παρατηρήθηκαν 33 εμπλουτισμένα γονίδια σε 6 διαφορετικές κατηγορίες μεταβολισμού και καταβολισμού, όπως απεικονίζονται στο γράφημα στην **εικόνα 4.5.3-4Β**. Τέλος, πραγματοποιήθηκαν αναλύσεις εμπλουτισμού για το μονοπάτι της KEGG και συγκεκριμένα για τα γονίδια που είχαν διαφορική έκφραση ($|\log_2FC| \geq 0$, και $Q \text{ value} \leq 0,05$). Οι αναλύσεις αυτές έγιναν ξεχωριστά για τα υπερεκφραζόμενα (**Εικόνα 4.5.3-4Γ**) και υποεκφραζόμενα γονίδια (**Εικόνα 4.5.3-4Δ**).



Εικόνα 4.5.3-4. Ανάλυση της μεταγραφωμικής ανάλυσης των φυτών με τη μεταχείριση SRL386. Α. Γράφημα τύπου Volcano με τα υπερεκφραζόμενα (κόκκινο χρώμα), υποεκφραζόμενα (πράσινο χρώμα) και μη διαφορικά εκφρασμένα (γκρι χρώμα) γονίδια σε σχέση με το μάρτυρα. Το γράφημα δημιουργήθηκε με όριο τα γονίδια να έχουν $Q \text{ value} \geq 1$. Στον οριζόντιο άξονα παρατηρείται η αλλαγή στην έκφραση σε

σχέση με τον μάρτυρα μετά τη μετατροπή σε \log_2 , ενώ στον κάθετο άξονα παρατηρείται η τιμή σημαντικότητας του κάθε γονιδίου μετά τη μετατροπή σε $-\log_{10}$ (Qvalue). Β. Γράφημα – θερμικός χάρτης όπου απεικονίζονται τα 33 εμπλουτισμένα στην ανάλυσή μας γονίδια της κατηγορίας της KEGG «μεταβολισμός του α-λινολενικού οξέος» στις υποκατηγορίες της KEGG. Στην προεπιλεγμένη αντιστοίχιση χρωμάτων, όσο θερμότερο είναι το μπλοκ χρωμάτων, τόσο υψηλότερο είναι το επίπεδο έκφρασης και όσο ψυχρότερο είναι το μπλοκ χρωμάτων, τόσο χαμηλότερο είναι το επίπεδο έκφρασης. Γ, Δ. Γράφημα εμπλουτισμού των γονιδίων που υπερεκφράζονται (Γ) και υποεκφράζονται (Δ) σε σχέση με το μάρτυρα, στα διάφορα μονοπάτια της KEGG.

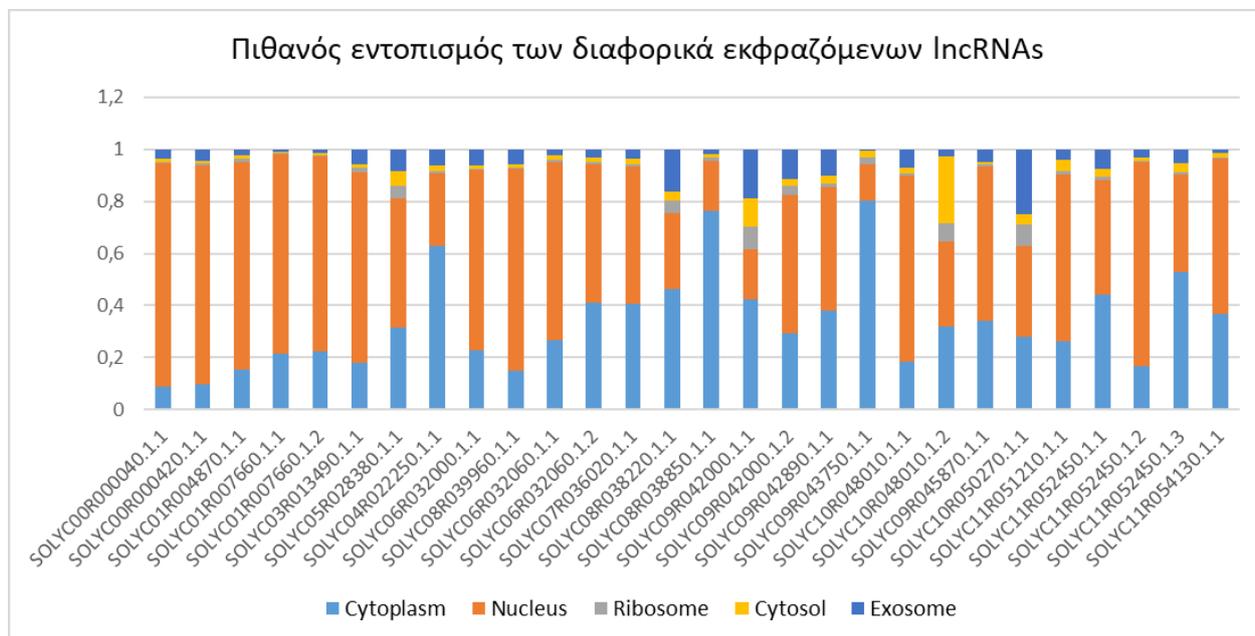
Αντίστοιχα, πραγματοποιήθηκαν οι ίδιες αναλύσεις και για τη μεταγραφωμική ανάλυση των φυτών τομάτας που δέχθηκαν τη μεταχείριση SRL307 (σε σύγκριση με το μάρτυρα ελέγχου). Αντίθετα με τη μεταχείριση SRL386, εδώ υπήρχαν μόνο 84 διαφορικά εκφραζόμενα γονίδια (9 υπερεκφραζόμενα και 75 υποεκφραζόμενα) (**Εικόνα 4.5.3-5A**). Στην ανάλυση GSEA, οι 5 πιο εμπλουτισμένες κατηγορίες ανήκαν στις «Ribosome» (03010), «Photosynthesis-antenna proteins» (00196), «Carbon metabolism» (01200), «Citrate cycle-TCA» (00020) και «Photosynthesis» (00195). Στην πρώτη κατηγορία βρίσκονται 385 γονίδια, τα οποία ως επί των πλείστων ανήκουν στην κατηγορία KEGG της μετάφρασης (**Εικόνα 4.5.3-5B**). Τέλος, μόνο τρία από τα 9 γονίδια είναι εμπλουτισμένα στις κατηγορίες της φωτοσύνθεσης-antenna proteins, μεταβολισμό πορφυρινών και αλληλομετατροπές πεντόζης και γλυκουρονικού οξέος (**Εικόνα 4.5.3-5Γ**), ενώ τα υποεκφραζόμενα γονίδια έχουν πιο ευρεία κατανομή σε KEGG κατηγορίες (**Εικόνα 4.5.3-5Δ**), όπως στην επεξεργασία πρωτεϊνών στο ενδοπλασματικό δίκτυο, αλληλεπιδράσεις παθογόνου-ξενιστή κτλ.



Εικόνα 4.5.3-5. Ανάλυση της μεταγραφωμικής ανάλυσης των φυτών με τη μεταχείριση SRL307. Α.

Γράφημα τύπου Volcano με τα υπερεκφραζόμενα (κόκκινο χρώμα), υποεκφραζόμενα (πράσινο χρώμα) και μη διαφορετικά εκφρασμένα (γκρι χρώμα) γονίδια σε σχέση με το μάρτυρα. Το γράφημα δημιουργήθηκε με όριο τα γονίδια να έχουν Qvalue ≥ 1 . Στον οριζόντιο άξονα παρατηρείται η αλλαγή στην έκφραση σε σχέση με τον μάρτυρα μετά τη μετατροπή σε \log_2 , ενώ στον κάθετο άξονα παρατηρείται η τιμή σημαντικότητας του κάθε γονιδίου μετά τη μετατροπή σε $-\log_{10}$ (Qvalue). Β. Γράφημα – θερμικός χάρτης όπου απεικονίζονται τα 385 εμπλουτισμένα στην ανάλυσή μας γονίδια της κατηγορίας της KEGG «Ριβόσωμα» στις δύο υποκατηγορίες της KEGG, «μετάφραση» και «αναδίπλωση, διαλογή και αποικοδόμηση». Στην προεπιλεγμένη αντιστοίχιση χρωμάτων, όσο θερμότερο είναι το μπλοκ χρωμάτων, τόσο υψηλότερο είναι το επίπεδο έκφρασης και όσο ψυχρότερο είναι το μπλοκ χρωμάτων, τόσο χαμηλότερο είναι το επίπεδο έκφρασης. Γ, Δ. Γράφημα εμπλουτισμού των γονιδίων που υπερεκφράζονται (Γ) και υποεκφράζονται (Δ) σε σχέση με το μάρτυρα, στα διάφορα μονοπάτια της KEGG.

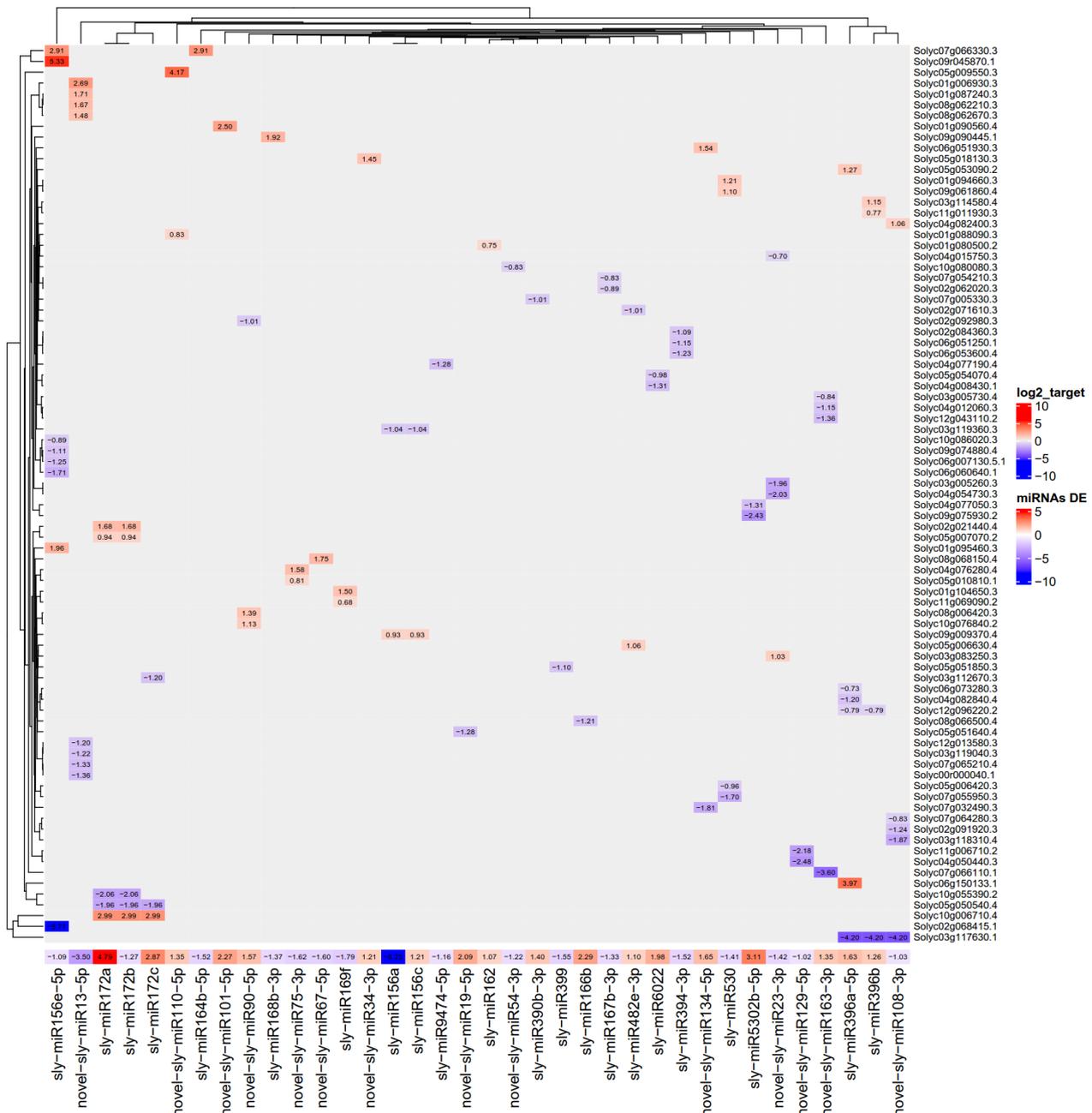
Επιπλέον, όπως αναφέρθηκε πραγματοποιήθηκε αλληλούχιση και των μεγάλων μη-κωδικοποιών μορίων RNAs (lncRNAs) στα φυτά τομάτας που δέχθηκαν τη μεταχείριση SRL386. Συνολικά, 22 lncRNAs εκφράστηκαν διαφορετικά σε σύγκριση με τον μάρτυρα και συγκεκριμένα τα 13 υπερεκφράστηκαν και τα 9 υποεκφράστηκαν. Ακόμη, τα 6 από αυτά, παρατηρήσαμε ότι είχαν και ισομορφές. Καθώς ο ρόλος των lncRNAs δεν είναι τόσο καλά μελετημένος και μόνο τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί εργαλεία μελέτης, πραγματοποιήθηκε η μελέτη τους με υπολογιστικά εργαλεία. Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε *in silico* μελέτη του πιθανού εντοπισμού τους ενδοκυτταρικά, μέσω του εργαλείου lncLocator 2.0. Στην **Εικόνα 4.5.3-6** παρουσιάζονται οι πιθανοί εντοπισμοί τους. Για τα περισσότερα lncRNAs ο εντοπισμός τους προβλέπεται στον πυρήνα και για 5 από αυτά στο κυτταρόπλασμα.



Εικόνα 6. Πιθανός εντοπισμός των διαφορετικά εκφραζόμενων lncRNAs μέσα στο κύτταρο.

Εκτός από τη mRNA αλληλούχιση, πραγματοποιήθηκε και αλληλούχιση μικρών RNAs (small RNAs, και συγκεκριμένα των miRNAs) από τα δείγματα των φυτών τομάτας που δέχθηκαν τη μεταχείριση SRL386. Συνολικά, στο δείγμα υπήρχαν 47 διαφορετικά εκφραζόμενα miRNAs, 21 ανοδικής έκφρασης και 26 καθοδικής έκφρασης. Από τα 47, τα 18 αναφέρονται ως novel sRNAs, καθώς δεν έχουν αναφερθεί σε προηγούμενες βάσεις δεδομένων μικρών RNAs της τομάτας. Για κάθε ένα από τα 47 διαφορετικά

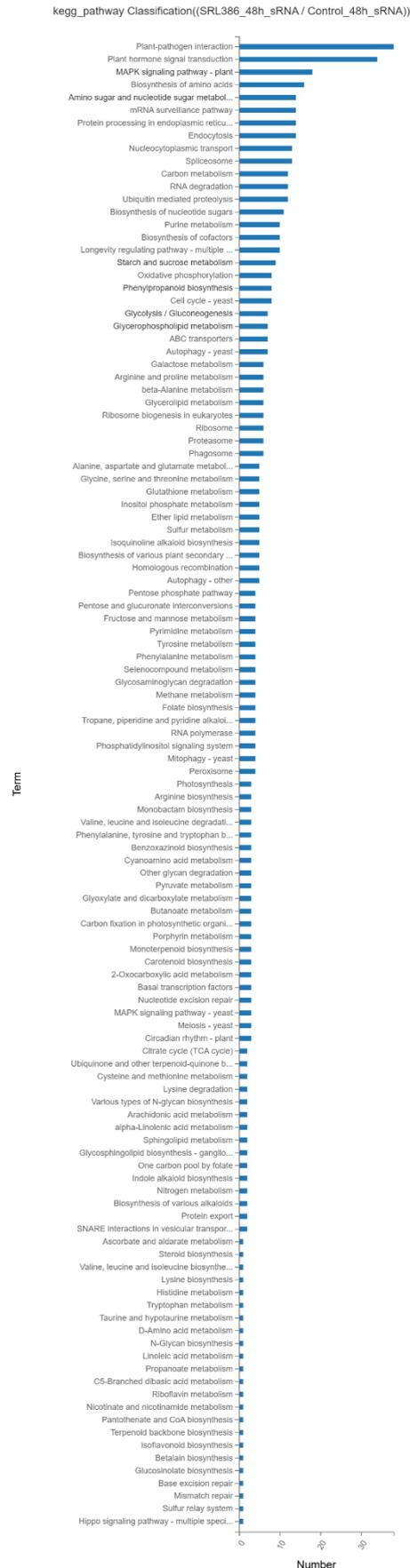
εκφραζόμενα miRNAs βρέθηκαν οι mRNA ή lncRNAs στόχοι τους, και έγινε παραλληλισμός με τα διαφορικά εκφραζόμενα mRNAs/lncRNAs από τις προηγούμενες αλληλουχίσεις (Εικόνα 4.5.3-7) Από τους στόχους, οι δύο ήταν διαφορικά εκφραζόμενα lncRNAs. Συγκεκριμένα, βρέθηκαν διαφορικά εκφραζόμενοι mRNA/lncRNA στόχοι για τα 36 από τα 47 διαφορικά εκφραζόμενα miRNAs και απεικονίζεται με κόκκινο χρώμα η υπερέκφραση και με μπλε χρώμα η υποέκφραση.



Εικόνα 7. Γράφημα - θερμικός χάρτης, όπου στον οριζόντιο άξονα απεικονίζονται τα διαφορικά εκφραζόμενα miRNAs ύστερα από τη μεταχείριση SRL386 στα φυτά τομάτας. Στον κάθετο άξονα απεικονίζονται τα διαφορικά εκφραζόμενα mRNAs/lncRNAs από την ίδια μεταχείριση, και τα οποία προβλέφθηκαν ως στόχοι των miRNAs. Τα χρώματα αποτελούν ένδειξη της υπερ- (κόκκινο) ή υπο- (μπλε) έκφρασης σε σχέση με το μάρτυρα ελέγχου.

Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε ανάλυση των στόχων όλων των διαφορικά εκφραζόμενων miRNAs και φαίνεται πως οι στόχοι τους έχουν ως κύριο ρόλο τις

αλληλεπιδράσεις παθογόνου-ξενιστή, τη σηματοδότηση μέσω ορμονών και τη σηματοδότηση μέσω ΜΑΡΚ (**Εικόνα 4.5.3-8**).



Εικόνα 8. Απεικόνιση του αριθμού των στόχων των διαφορεικά εκφραζόμενων miRNAs και η ταξινόμηση



Με τη χρηματοδότηση
της Ευρωπαϊκής Ένωσης
NextGenerationEU

τους σε μονοπάτια της ΚΕΓΓ.

3 ΣΥΝΟΨΗ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η παρούσα μελέτη ανέδειξε την ικανότητα διαφορετικών ειδών *Kushneria* spp. και ενός είδους *Streptomyces* sp. να επάγουν την ανοσοαπόκριση φυτών τομάτας με διαφορετικό τρόπο. Συγκεκριμένα το είδος *Kushneria* sp. SRL386 φάνηκε να επάγει πιο ισχυρά την άμυνα των φυτών τομάτας και μάλιστα ταυτόχρονα το μονοπάτι του σαλικυλικού οξέος και του γιασμονικού οξέος, όπως φαίνεται και από τις στοχευμένες qPCRs αλλά και από τη μεταγραφωμική ανάλυση. Φαίνεται πως ο μεταβολισμός του α-λινολενικού οξέος και η βιοσύνθεση του γιασμονικού οξέος είναι το πρωταρχικό μονοπάτι που μεταβάλλεται, στα φυτά που έχουν μεταχειριστεί με το *Kushneria* sp. SRL386.

Επιπλέον, η μελέτη των μικρών και μεγάλων μη-κωδικοποιών RNAs μπορεί να οδηγήσει στην ανακάλυψη νέων μονοπατιών ρύθμισης της ανοσοαπόκρισης αυτής. Όπως φάνηκε, τα μικρά RNAs που ρυθμίζονται διαφορετικά μετά την μεταχείριση με το *Kushneria* sp. SRL386 στοχεύουν ποικίλα mRNAs ή/και lncRNAs, ορισμένα από τα οποία τα βρήκαμε να είναι και αυτά διαφορετικά εκφραζόμενα. Μάλιστα από τη βιοπληροφορική ανάλυση που πραγματοποιήθηκε, φαίνεται πως οι περισσότεροι στόχοι των miRNAs αφορούν γονίδια που εμπλέκονται στην αλληλεπίδραση με παθογόνα ("plant-pathogen interaction"), στη μεταγωγή σήματος φυτικής ορμόνης ("plant hormone signal transduction") και στη σηματοδότηση μέσω MAPK ("MAPK signaling pathway – plant").

4 ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι

Βιβλιογραφικές Αναφορές

- Aimé, S., Alabouvette, C., Steinberg, C., & Olivain, C. (2013). The Endophytic Strain *Fusarium oxysporum* Fo47 : A Good Candidate for Priming the Defense Responses in Tomato Roots. *MPMI*, 26(8), 918–926.
- Daraban, G. M., Hlihor, R. M., & Suteu, D. (2023). Pesticides vs. Biopesticides: From Pest Management to Toxicity and Impacts on the Environment and Human Health. *Toxics*, 11(12). <https://doi.org/10.3390/toxics11120983>
- Dimopoulou, A., Theologidis, I., Liebmann, B., & Kalantidis, K. (2019). *Bacillus amyloliquefaciens* MBI600 differentially induces tomato defense signaling pathways depending on plant part and dose of application. *Scientific Reports*, 9, 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-55645-2>
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real- Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods*, 25, 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Pieterse, C. M. J., Zamioudis, C., Berendsen, R. L., Weller, D. M., Van Wees, S. C. M., & Bakker, P. A. H. M. (2014). Induced systemic resistance by beneficial microbes. *Annual Review of Phytopathology*, 52, 347–375. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082712-102340>
- Victor Flors, Maria de la O. Leyva, B. V., Finiti, I., Real, M. D., Garcia-Agustin, P., Alan B. Bennett, & Carmen Gonzalez-Bosch. (2007). Absence of the endo-b-1,4-glucanases Cel1 and Cel2 reduces susceptibility to *Botrytis cinerea* in tomato. *The Plant Journal*, 52, 1027–1040. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03299.x>
- Δημοσίευση αποτελεσμάτων στο 21^ο Φυτοπαθολογικό συνέδριο της Ελληνικής Φυτοπαθολογικής Εταιρείας – 04-07/11/2024, Πάφος, Κύπρος.

Vassiliki A. Michalopoulou¹, Christos A. Christakis², Maria Plakogiannaki^{2,3}, Panagiotis F. Sarris^{1,2,4}

¹Institute of Molecular Biology and Biotechnology, Foundation of Research and Technology, Heraklion, Crete, 70013.

²Department of Biology, University of Crete, Heraklion, Crete, 70013.

³Department of Biochemistry & Biotechnology, University of Thessaly, Larisa, 41500.

⁴Biosciences, University of Exeter, Exeter, United Kingdom.

Background
Improvement of crop management strategies is needed, due to:

- The demands of adaptation to climate change
- the emergence of new and more aggressive phytopathogens
- the deterioration of agricultural soil quality

SOLUTION ? → Microbial endophytes

Microbial endophytes (bacteria, yeasts and fungi) have been isolated from different CWR halophytes.

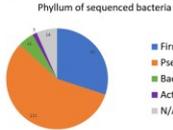
- Specifically, a number of bacterial isolates were cultured and examined for species identification, as well as for *in vitro* assays.
- Moreover, the induced plant defense responses of some bacterial isolates were examined, specifically for those that did not show any *in vitro* inhibitory action on the phytopathogens growth.



Isolation and identification of bacteria

- More than **200 bacteria** were isolated and identified through **16S rDNA sequencing**. Most of them belong to the phyla of Firmicutes and Pseudomonadota and genera *Bacillus*, *Brevibacillus* and *Pseudomonas*, respectively.
- While most of the sequenced bacteria belong to the genus *Bacillus* and *Pseudomonas* and 16S rDNA is not able to provide with species information for these genera, some of the sequenced bacteria were further examined for species identification using **rpmB DNA sequencing**. For most cases, the species was identified. Moreover, for two bacteria that were identified as identical with 16S rDNA sequencing, rpmB DNA sequencing identified them as two different species of the same genus, that in fact, gave different results in inhibition assays of bacterial pathogens.

Phylum of sequenced bacteria



Clavibacter michiganensis
Paracitovorax citrulli
Xanthomonas campestris pv. campestris



Inhibition of bacterial phytopathogens growth in vitro

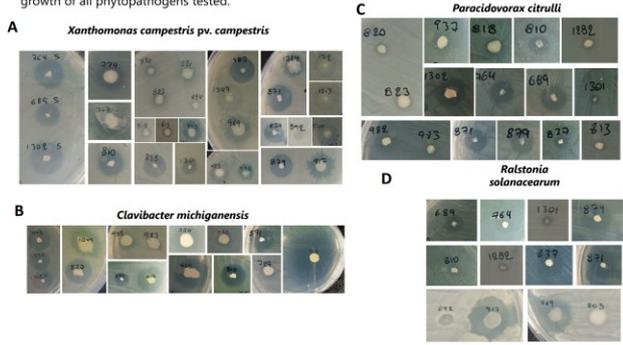
- All the isolates were tested *in vitro* for their ability to inhibit different phytopathogens bacteria, such as *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (A), *Clavibacter michiganensis* (Cm) (B), *Paracitovorax citrulli* (Pc) (C) and *Ralstonia solanacearum* (Rs) (D).
- Most of the inhibition zones were observed for Xcc, while there were some isolates that inhibited the growth of all phytopathogens tested.

A *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*

B *Clavibacter michiganensis*

C *Paracitovorax citrulli*

D *Ralstonia solanacearum*

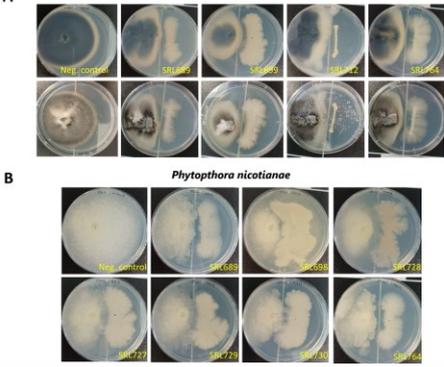


Inhibition of *Verticillium dahliae* and *Phytophthora nicotianae* growth in vitro

- Some selected isolates were tested *in vitro* for their ability to inhibit the growth of the fungus *Verticillium dahliae* (A) and the oomycete *Phytophthora nicotianae* (B).

A *Verticillium dahliae*

B *Phytophthora nicotianae*



Optimum culture conditions of the isolates for the inhibition of bacterial phytopathogens growth in vitro.

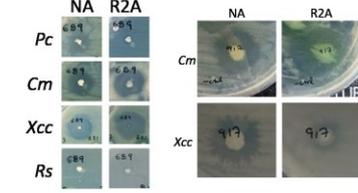
- The isolates that showed a significant inhibition of bacterial phytopathogens growth were further tested to find the optimum culture conditions for the metabolites production.
- NA and R2A nutrient media were used, as rich and poor media, respectively.
- Most isolates produced a bigger inhibition zone in NA medium, while SRL689 behaved differently according to the phytopathogens tested (A).
- Some isolates like the SRL917, were able or not to produce siderophores, according to the medium grown (B).

NA R2A

Pc Cm Xcc Rs

NA R2A

Cm Xcc



Induced defense responses in tomato by two isolates that do not exhibit inhibitory effects in phytopathogens growth in vitro.

- For some isolates, that did not inhibit any phytopathogen's growth *in vitro* (A), we sought to examine if they were able to induce the defense responses of tomato plants (priming).
- Tomato plants (cultivar Micro-Tom) that were grown in greenhouse, were watered with 10⁸ cells of H₂O (negative control) SRL307 and SRL386. Leaf tissue was collected from triplicate plants (different plant samples) at 0h, 24h, 48h and 72h (B).
- Priming was examined using PR-1 (C) specific primers via qRT-PCR. Actin was used as a reference gene.

A SRL307 SRL386

Cm Rs
Xcc Pc

Phytophthora nicotianae *Verticillium dahliae*

B H₂O (neg. control) SRL307 SRL386

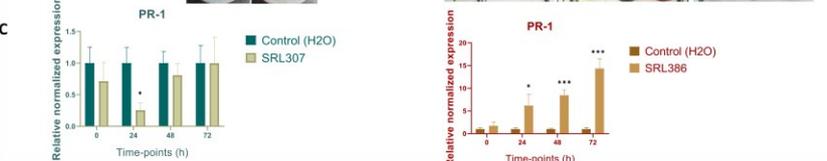
0h 24h 48h 72h

C PR-1

Relative normalized expression

Control (H₂O) SRL307

Control (H₂O) SRL386



Identification of bacterial isolates

- More than 200 bacteria were identified via 16S rDNA sequencing. Where the 16S rDNA sequencing could not provide with species information but only genus, further identification with rpmB sequencing was performed, defining the species.

Inhibition assays

- Several bacterial isolates cause the inhibition of growth of phytopathogenic microorganisms, while SRL689 and SRL764 inhibit the growth of all tested phytopathogens.
- The optimum conditions of the metabolites production of the beneficial bacteria was examined, using a rich (NA) and a poor (R2A) nutrient medium. Differential results were obtained, depending on the combination of the beneficial and the phytopathogens microorganism.

Induced plant defense responses (Priming)

- For two bacterial isolates that did not exhibit any inhibitory effect on the phytopathogens growth *in vitro*, it was observed that the plant defenses were induced, in the absence of any pathogen. Further examination with a larger set of primers and more bacterial isolates is planned for the future.

Conclusions