



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

Παραδοτέο Π.4.5.6: Μελέτη αποτελεσματικότητας συνθετικών μικροβιακών κοινοτήτων σε ευπαθείς ποικιλίες τομάτας και αγγουριάς έναντι των μυκήτων *Botrytis cinerea* και *Fusarium oxysporum*

Πληροφορίες για το έγγραφο

Αριθμός παραδοτέου: Π.4.5.6

Ενότητα εργασίας: ΕΕ4

Επικεφαλής δικαιούχος: [ΓΠΑ]

Συγγραφείς: [Σωτήρης Τζάμος, Ιωάννης Στριγγλής, Ειρήνη Πουλάκη, Βασίλης Δημητρακάς, Δάφνη Παρασκευοπούλου]

Έκδοση: 1

Είδος Παραδοτέου: [Έκθεση]

Ημερομηνία παράδοσης: [31/12/2025]

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: TAEDR-0535675

Ακρωνύμιο έργου: InnoPP

Ημερομηνία έναρξης: 15 Μαΐου 2023

Διάρκεια: 28 Μήνες

Συντονιστής Φορέας: Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Συντονιστής/ Επιστημονικός Υπεύθυνος: Ιωάννης Βόντας

Πίνακας Περιεχομένων

1	ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΣΤΟΧΟΙ	5
2	ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΩΝ ΕΡΓΑΣΙΩΝ	6
2.1	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	6
2.2	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ	6
3	ΣΥΝΟΨΗ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	11
4	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι- Βιβλιογραφικές Αναφορές	12

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 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 Π4.5.6

Σκοπός του παραδοτέου Π.4.5.6 είναι η αξιολόγηση των βακτηρίων που θα εντοπιστούν από την ανάλυση amplicon sequencing (Π.4.5.5: Χαρακτηρισμός μικροβιώματος σε ποικιλίες τομάτας και αγγουριάς με ανθεκτικότητα στους μύκητες *Botrytis cinerea* και *Fusarium oxysporum* και απομόνωση βακτηρίων με σκοπό το σχηματισμό αντιπροσωπευτικής συλλογής) σε *in vitro* συνθήκες, ως προς την ανταγωνιστική τους δράση έναντι των παθογόνων μυκήτων *Botrytis cinerea* και *Fusarium oxysporum* σε φυτά τομάτας και αγγουριάς, αντίστοιχα.

Τα αποτελέσματα του Π.4.5.5 έδειξαν την απουσία ανθεκτικότητας στις υπό εξέταση ποικιλίες τομάτας και αγγουριάς έναντι των μυκήτων *Botrytis cinerea* και *Fusarium oxysporum*. Για το λόγω αυτό δημιουργήθηκαν συνθετικές κοινότητες αποτελούμενες από τα γνωστά φυτοπροστατευτικά στελέχη *Bacillus velezensis* K165, *Pseudomonas putida* Z13 και *Pseudomonas simiae* WCS417.

Η αξιολόγηση των στελεχών K165, Z13 και WCS417 έδειξε τη φυτοπροστατευτική τους δράση ως απλές εφαρμογές έναντι των μυκήτων *Botrytis cinerea* και *Fusarium oxysporum* σε φυτά τομάτας και αγγουριάς, αντίστοιχα, με τη συνθετική κοινότητα να

μην προσδίδει επιπλέον προστασία στα φυτά αγγουριάς έναντι του μύκητα *Fusarium oxysporum* σε σύγκριση με τις μονές εφαρμογές των στελεχών, ενώ στη περίπτωση του μύκητα *Botrytis cinerea* σε φυτά τομάτας παρατηρήθηκε ότι η εφαρμογή της συνθετικής κοινότητας οδήγησε σε απώλεια της προστασίας.

1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΣΤΟΧΟΙ

Η μελέτη του μικροβιώματος των φυτών και ο εντοπισμός ωφέλιμων μικροοργανισμών με φυτοπροστατευτικές ιδιότητες αποτελούν κρίσιμους άξονες για την ανάπτυξη βιώσιμων στρατηγικών φυτοπροστασίας. Στο πλαίσιο της δράσης Π.4.5.5 στόχος ήταν ο χαρακτηρισμός του μικροβιώματος ανθεκτικών ποικιλιών τομάτας και αγγουριάς στους μύκητες *Botrytis cinerea* και *Fusarium oxysporum*. Ωστόσο, τα αποτελέσματα ανέδειξαν την απουσία ανθεκτικότητας των υπό εξέταση ποικιλιών στους συγκεκριμένους μύκητες, γεγονός που οδήγησε να επιλεγούν τρία γνωστά φυτοπροστατευτικά στελέχη – *Bacillus velezensis* K165 [Tjamos et al. 2004], *Pseudomonas putida* Z13 [Ziazia et al. 2021] και *Pseudomonas simiae* WCS417 [Lamers et al 1988] – τα οποία αξιολογήθηκαν τόσο ως μεμονωμένες εφαρμογές όσο και ως συνθετική κοινότητα, για την ικανότητά τους να προστατεύουν φυτά τομάτας και αγγουριάς από τους μύκητες *Botrytis cinerea* και *Fusarium oxysporum*, αντίστοιχα. Οι κύριοι στόχοι του παραδοτέου Π.4.5.6 είναι:

1. Εξέταση της φυτοπροστατευτικής αποτελεσματικότητας των επιλεγμένων στελεχών *Bacillus velezensis* K165, *Pseudomonas putida* Z13 και *Pseudomonas simiae* WCS417 τόσο ως μεμονωμένες εφαρμογές όσο και ως συνθετική βακτηριακή κοινότητα σε φυτά τομάτας και αγγουριάς.
2. Σύγκριση της αποτελεσματικότητας των μονών εφαρμογών έναντι της συνθετικής κοινότητας, με στόχο την ανάδειξη πιθανών συνεργιστικών ή ανταγωνιστικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των στελεχών.
3. Διερεύνηση του φυτοπροστατευτικού μηχανισμού δράσης των στελεχών *Bacillus velezensis* K165, *Pseudomonas putida* Z13 και *Pseudomonas simiae* WCS417

2 ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΩΝ ΕΡΓΑΣΙΩΝ

2.1 Υλικά και Μέθοδοι

2.1.1 Αξιολόγηση της φυτοπροστατευτικής δράσης των στελεχών *Bacillus velezensis* K165, *Pseudomonas putida* Z13 και *Pseudomonas simiae* WCS417 σε φυτά τομάτας εναντίον του μύκητα *Botrytis cinerea*

Πειράματα Παθογένειας

Η αξιολόγηση της φυτοπροστατευτικής δράσης των στελεχών *Bacillus velezensis* K165, *Pseudomonas putida* Z13 και *Pseudomonas simiae* WCS417 εναντίον του μύκητα *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis cucumerinum* [forc] πραγματοποιήθηκε σε φυτά αγγουριάς της ποικιλίας MINI UG6714. Η εφαρμογή των βακτηρίων πραγματοποιήθηκε με ριζοπότισμα στο στάδιο του 2^{ου} φύλλου και μετά από 5 ημέρες 10 ml σπορίων [10⁷ σπόρια/ml] του μύκητα forc τοποθετήθηκαν με ριζοπότισμα στα φυτά των διαφορετικών πειραματικών εφαρμογών. Η καταγραφή των συμπτωμάτων [μάρανση, χλώρωση, κιτρίνισμα, νέκρωση φύλλων] πραγματοποιήθηκε ανά τακτά χρονικά διαστήματα.

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έδειξε ότι τα στελέχη K165, Z13 και WCS417 μείωσαν σημαντικά την έκταση των νεκρωτικών κηλίδων σε σχέση με το μάρτυρα. Ενώ αξιοσημείωτο είναι ότι η εφαρμογή των στελεχών ως συνθετική κοινότητα δεν είχε φυτοπροστατευτική δράση.

Πληθυσμιακή ανάπτυξη των στελεχών K165, Z13 και WCS417

Για την μελέτη της πληθυσμιακής ανάπτυξης των στελεχών K165, Z13 και WCS417 στο ριζικό σύστημα των φυτών χρησιμοποιήθηκαν στελέχη ανθεκτικά στην αντιβιοτική ένωση ριφαμπικίνη.

Έκφραση γονιδίων άμυνας

Για την ανάλυση της έκφρασης των γονιδίων άμυνας *PIN2* [δείκτης επαγωγής της άμυνας που εξαρτάται από το γιασμονικό οξύ] και *PR1* [δείκτης επαγωγής της άμυνας που εξαρτάται από το σαλικυλικό οξύ] πραγματοποιήθηκε συλλογή φυλλαρίων από τις διαφορετικές πειραματικές εφαρμογές σε 2 χρονικές στιγμές [1 και 2 ημέρες μετά τη μόλυνση των φυτών].

2.1.2 Αξιολόγηση της φυτοπροστατευτικής δράσης των στελεχών *Bacillus velezensis* K165, *Pseudomonas putida* Z13 και *Pseudomonas simiae* WCS417 σε φυτά αγγουριάς εναντίον του μύκητα *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis cucumerinum*

Πειράματα Παθογένειας

Η αξιολόγηση της φυτοπροστατευτικής δράσης των στελεχών *Bacillus velezensis* K165, *Pseudomonas putida* Z13 και *Pseudomonas simiae* WCS417 εναντίον του μύκητα *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis cucumerinum* [forc] πραγματοποιήθηκε σε φυτά αγγουριάς της ποικιλίας MINI UG6714. Η εφαρμογή των βακτηρίων πραγματοποιήθηκε

με ριζοπότισμα στο στάδιο του 2^{ου} φύλλου και μετά από 5 ημέρες 10 ml σποριών [10⁷ σπόρια/ml] του μύκητα *forc* τοποθετήθηκαν με ριζοπότισμα στα φυτά των διαφορετικών πειραματικών εφαρμογών. Η καταγραφή των συμπτωμάτων [μάρανση, χλώρωση, κιτρίνισμα, νέκρωση φύλλων] πραγματοποιήθηκε ανά τακτά χρονικά διαστήματα.

Πληθυσμιακή ανάπτυξη των στελεχών K165, Z13 και WCS417

Για την μελέτη της πληθυσμιακής ανάπτυξης των στελεχών K165, Z13 και WCS417 στο ριζικό σύστημα των φυτών χρησιμοποιήθηκαν στελέχη ανθεκτικά στην αντιβιοτική ένωση ριφαμπικίνη.

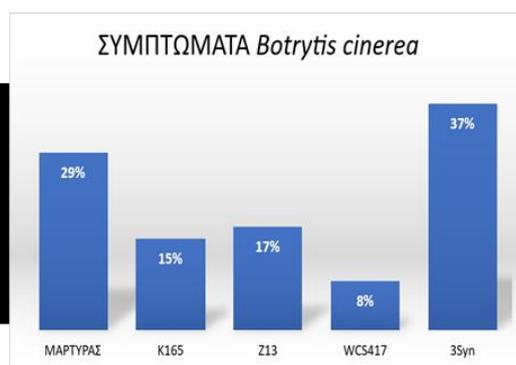
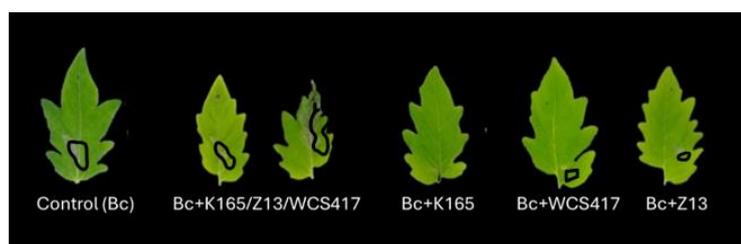
Έκφραση γονιδίων άμυνας

Για την ανάλυση της έκφρασης των γονιδίων άμυνας Chit1 [gi|167514, χιτινάση] και β-1,3-glucanase πραγματοποιήθηκε συλλογή του βλαστού των φυτών από τις διαφορετικές πειραματικές εφαρμογές σε 2 χρονικές στιγμές [4 και 6 ημέρες μετά τη μόλυνση των φυτών].

2.2 Αποτελέσματα και Συζήτηση

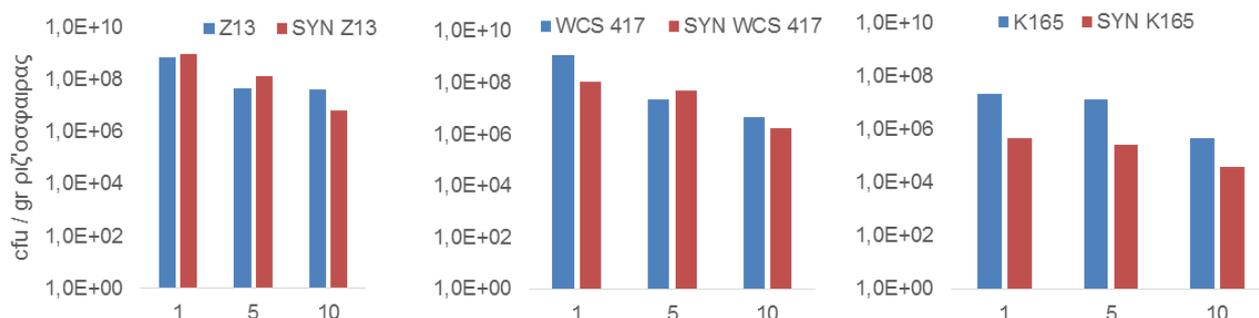
2.2.1 Αξιολόγηση της φυτοπροστατευτικής δράσης των στελεχών *Bacillus velezensis* K165, *Pseudomonas putida* Z13 και *Pseudomonas simiae* WCS417 σε φυτά τομάτας εναντίον του μύκητα *Botrytis cinerea*

Πειράματα Παθογένειας



Εικόνα 1. Ένταση της ασθένειας [μέγεθος νεκρωτικής κηλίδας] από το μύκητα *Botrytis cinerea* [Bc] σε φυτά τομάτας όπου είχαν εφαρμοσθεί τα στελέχη *Bacillus velezensis* K165, *Pseudomonas putida* Z13 και *Pseudomonas simiae* WCS417 στο ριζικό σύστημα ως απλές εφαρμογές ή συνθετική κοινότητα (SYN). Η φωτογραφία παρουσιάζει το μέγεθος της νεκρωτικής κηλίδας [μαύρο περίγραμμα] που προκάλεσε ο μύκητας σε χαρακτηριστικά φύλλα των διαφορετικών εφαρμογών, 5 ημέρες μετά τη μόλυνση.

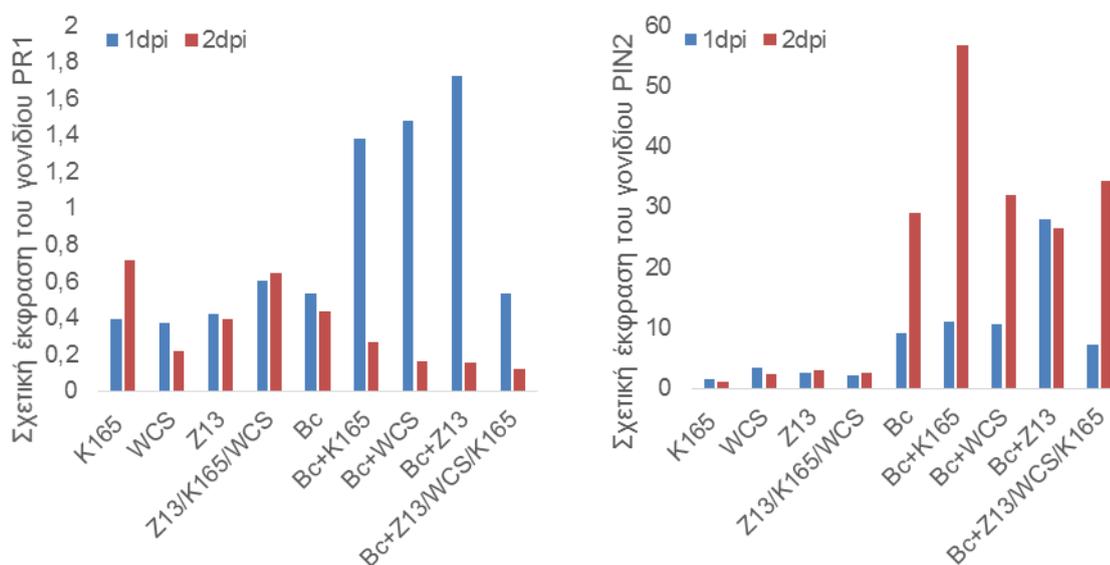
Πληθυσμιακή ανάπτυξη των στελεχών K165, Z13 και WCS417



Εικόνα 2. Πληθυσμιακή ανάπτυξη των στελεχών *Bacillus velezensis* K165, *Pseudomonas putida* Z13 και *Pseudomonas simiae* WCS417 στο ριζικό σύστημα φυτών τομάτας όπου είχαν εφαρμοσθεί, ως απλές εφαρμογές ή συνθετική κοινότητα (SYN), μετά από 1, 5 και 10 ημέρες από την εφαρμογή τους.

Έκφραση γονιδίων άμυνας

Τα *in planta* πειράματα έδειξαν την ευαισθησία των υπό εξέταση ποικιλιών στο μύκητα *B. cinerea* με αποτέλεσμα να μην κριθεί σκόπιμο να χαρακτηριστεί το μικροβίωμα των υπό εξέταση ποικιλιών.

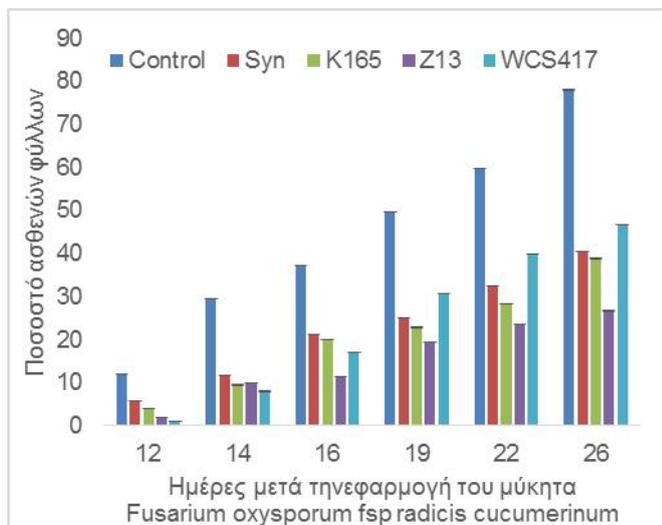


Εικόνα 3. Σχετική έκφραση των γονιδίων PR1 και PIN2 σε φυτά τομάτας όπου είχαν εφαρμοσθεί, ως απλές εφαρμογές ή συνθετική κοινότητα, τα στελέχη *Bacillus velezensis* K165, *Pseudomonas putida* Z13 και *Pseudomonas simiae* WCS417 και μετά από 5 ημέρες μολύνθηκαν με το μύκητα *Botrytis cinerea* [Bc]. Η δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε στις 1 και 2 ημέρες μετά τη μόλυνση με το μύκητα Bc.

2.2.2 Αξιολόγηση της φυτοπροστατευτικής δράσης των στελεχών *Bacillus velezensis* K165, *Pseudomonas putida* Z13 και *Pseudomonas simiae* WCS417 σε φυτά αγγουριάς εναντίον του μύκητα *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis cucumerinum*

Πειράματα Παθογένειας

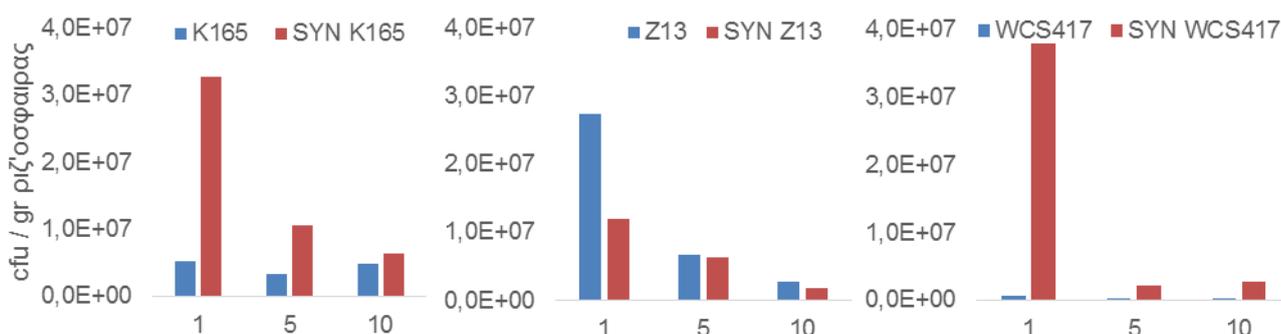
Τα *in planta* πειράματα έδειξαν την ευαισθησία των υπό εξέταση ποικιλιών στο μύκητα *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-cucumerinum* με αποτέλεσμα να μην κριθεί σκόπιμο να χαρακτηριστεί το μικροβίωμα των υπό εξέταση ποικιλιών.



Εικόνα 4. Ένταση της ασθένειας [ποσοστό ασθενών φύλλων] από το μύκητα *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis cucumerinum* [FORC] σε φυτά αγγουριάς όπου είχαν εφαρμοσθεί τα στελέχη *Bacillus velezensis* K165, *Pseudomonas putida* Z13 και *Pseudomonas simiae* WCS417 στο ριζικό σύστημα ως απλές εφαρμογές ή συνθετική κοινότητα (Syn). Η φωτογραφία παρουσιάζει τα φυτά των διαφορετικών εφαρμογών, 26 ημέρες μετά την εφαρμογή του παθογόνου μύκητα.

Πληθυσμιακή ανάπτυξη των στελεχών K165, Z13 και WCS417

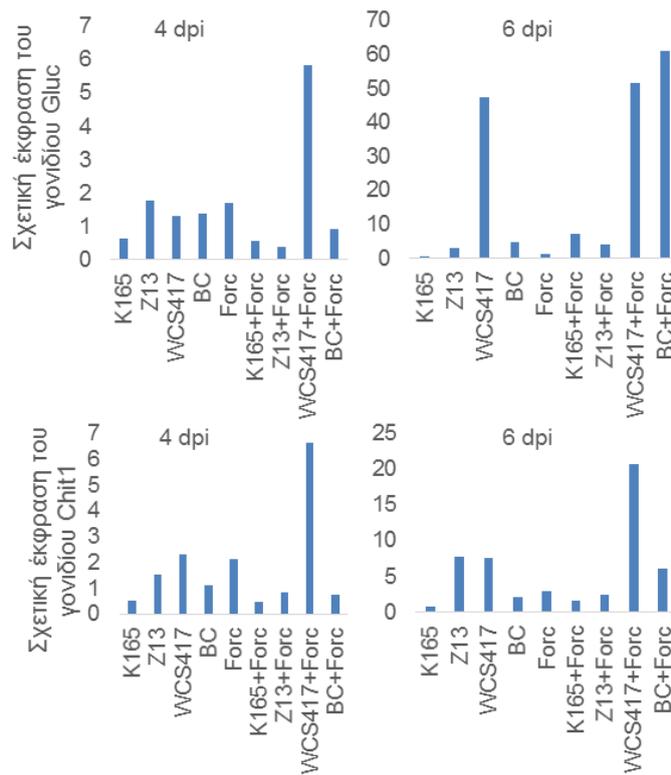
Η μέτρηση του πληθυσμού πραγματοποιήθηκε 1, 5 και 10 ημέρες μετά την εφαρμογή των στελεχών και διαπιστώθηκε η ικανότητα των στελεχών να αποικίζουν επιτυχώς το ριζικό σύστημα των φυτών, ενώ η εφαρμογή των στελεχών ως συνθετική κοινότητα είχε θετική επίπτωση στα μεγέθη των πληθυσμών των στελεχών K165 και WCS417.



Εικόνα 5. Πληθυσμιακή ανάπτυξη των στελεχών *Bacillus velezensis* K165, *Pseudomonas putida* Z13 και *Pseudomonas simiae* WCS417 στο ριζικό σύστημα φυτών τομάτας όπου είχαν εφαρμοσθεί, ως απλές εφαρμογές ή συνθετική κοινότητα (SYN), μετά από 1, 5 και 10 ημέρες από την εφαρμογή τους

Έκφραση γονιδίων άμυνας

Η ανάλυση της έκφρασης του γονιδίου Chit1 έδειξε την σημαντική έκφραση του στα φυτά που είχε προηγηθεί της μόλυνσης η εφαρμογή του στελέχους WCS417, 4 και 6 ημέρες μετά τη μόλυνση των φυτών. Παρομοίως, η έκφραση του γονιδίου β-1,3-glucanase ήταν σημαντικά υψηλή στα φυτά όπου είχε εφαρμοσθεί το στέλεχος WCS417. Αξιοσημείωτη είναι η παρατήρηση ότι η έκφραση του γονιδίου β-1,3-glucanase ήταν υψηλότερη του μάρτυρα σε όλες τις εφαρμογές των φυτοπροστατευτικών στελεχών στις 6 ημέρες μετά την εφαρμογή του παθογόνου.



Εικόνα 3. Σχετική έκφραση των γονιδίων Chit1 και β -1,3-glucanase [Gluc] σε φυτά αγγουριάς όπου είχαν εφαρμοσθεί, ως απλές εφαρμογές ή συνθετική κοινότητα, τα στελέχη *Bacillus velezensis* K165, *Pseudomonas putida* Z13 και *Pseudomonas simiae* WCS417, μετά από 4 και 6 ημέρες από την εφαρμογή του παθογόνου μύκητα [Forc]

3 ΣΥΝΟΨΗ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Σχετικά με το Παραδοτέο Π.4.5.6 χρησιμοποιήθηκαν τα γνωστά φυτοπροστατευτικά στελέχη *Bacillus velezensis* K165, *Pseudomonas putida* Z13 και *Pseudomonas simiae* WCS417, τα οποία αξιολογήθηκαν ως μονές εφαρμογές και συνδυασμός εναντίον των μυκήτων *Botrytis cinerea* και *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis cucumerinum* σε φυτά τομάτας και αγγουριάς, αντίστοιχα. Διαπιστώθηκε ότι η εφαρμογή των βακτηρίων ως μονές εφαρμογές μείωσε την ένταση της ασθένειας ενώ ο συνδυασμός των βακτηρίων δεν οδήγησε σε αύξηση της αποτελεσματικότητας. Οι μετρήσεις του πληθυσμού των βακτηρίων στο ριζικό σύστημα των φυτών έδειξε ότι και τα 3 στελέχη αποικίζουν επιτυχώς το ριζικό σύστημα. Η φυτοπροστατευτική δράση των στελεχών μπορεί να αποδοθεί στην ενεργοποίηση της άμυνας των φυτών αφού παρατηρήθηκε η επαγωγή της έκφρασης γονιδίων άμυνας παρουσία του παθογόνου.

Συμπερασματικά, τα 3 στελέχη, K165, Z13 και WCS417, παρουσιάζουν τη δυναμική χρήσης τους στη βιολογική αντιμετώπιση των ασθενειών, ενώ η εφαρμογή τους ως συνθετική κοινότητα δεν έδωσε περαιτέρω οφέλη σε σχέση με τις απλές εφαρμογές.

Αποτελέσματα των πειραμάτων ανακοινώθηκαν στο συνέδριο International Symposium on Plant Pathogenic Sclerotiniaceae (25-30 Μαΐου 2025, Θεσσαλονίκη)
Panagoula Soufra, Vasilis Dimitrakas, Eirini G. Poulaki, Ioannis A. Stringlis, Sotiris Tjamos. Evaluation of biocontrol agents for induced systemic resistance against *Botrytis cinerea* in tomato plants

4 ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι

Βιβλιογραφικές Αναφορές

Lamers JG, Schippers B, Geels FP (1988) Soil-borne diseases of wheat in the Netherlands and results of seed bacterization with pseudomonads against *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, associated with disease resistance. In: Jorna ML, Sloopmaker LAJ (eds) Cereal breeding related to integrated cereal production. Pudoc, Wageningen

Tjamos EC, Tsitsigiannis DI, Tjamos SE, Antoniou PP, Katinakis P, 2004. Selection and screening of endorhizosphere bacteria from solarized soils as biocontrol agents against *Verticillium dahliae* of solanaceous hosts. European Journal of Plant Pathology 110, 35–44.

Ziazia P, Poulaki EG, Gkizi D et al. Feeding the microbes: a strategy to control *Verticillium* wilt. Agronomy 2021; 11 :1946