



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

**Παραδοτέο Π.4.5.7:** Αναφορά αποτελεσματικότητας βιολογικών σκευασμάτων για την αντιμετώπιση του ωιδίου και της όξινης σήψης σε εμπορικούς αμπελώνες επιτραπέζιων ποικιλιών αμπέλου

### Πληροφορίες για το έγγραφο

Αριθμός παραδοτέου: **Π.4.5.7.**

Ενότητα εργασίας: **ΕΕ4**

Επικεφαλής δικαιούχος: **ΓΠΑ**

Συγγραφείς: **Δημήτριος Τσιτσιγιάννης, Σταύρος Κοροβέσης, Χαρίκλεια Καβρουματζή, Ειρήνη Κώτση, Αναστασία Παπαγεωργίου**

Έκδοση: **1.0**

Είδος Παραδοτέου: **Έκθεση**

Ημερομηνία παράδοσης: 15-11-2025

### 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

<b>1</b>	<b>ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΣΤΟΧΟΙ .....</b>	<b>5</b>
<b>2</b>	<b>ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΩΝ ΕΡΓΑΣΙΩΝ .....</b>	<b>6</b>
2.1	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ .....	6
2.2	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....	18
<b>3</b>	<b>ΣΥΝΟΨΗ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ .....</b>	<b>49</b>
<b>4</b>	<b>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι- Βιβλιογραφικές Αναφορές.....</b>	<b>50</b>

## 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 ασθενειών και 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 Π4.5.7

Στο Παραδοτέο 4.5.7. παρουσιάζεται η αξιολόγηση βιοδιεγερτών σε συνδυασμό μεταξύ τους ή με άλλα βιομυκητοκτόνα ή χημικά ΦΠΠ για την αντιμετώπιση του του ωιδίου, της τεφράς και της μαύρης σήψης σε πειράματα σε εμπορικό αμπελώνα στην Αλεξάνδρεια Ημαθίας. Όλα τα βιολογικά σκευάσματα που αξιολογήθηκαν Mix BIO, Skim Milk (αποβουτυρωμένο γάλα), Septum (φυτικό εκχύλισμα *Equisetum* sp.), Terranum (βιολογικό μυκητοκτόνο, με βάση τη λεκιθίνη) μείωσαν τη σοβαρότητα και την ένταση του ωιδίου σε φύλλα και βότρες. Η εφαρμογή MIX BIO περιελάμβανε μικροβιακά φυτοπροστατευτικά προϊόντα (*Amylo X - Bacillus amyloliquefaciens*, *Serenade - Bacillus amyloliquefaciens*, *Polyversum - Pythium oligandrum*) και βιοδιεγέρτες (*Fytosave - cos-oga*, *Romeo-cerevisane*, *Limocide-orange oil*).

Επιπλέον, πέντε στελέχη βακτηρίων και πέντε ζυμών από αμπελώνες της Σαντορίνης, καθώς και κομποστοποιημένα προϊόντα, αξιολογήθηκαν σε *in vitro* και *ex vivo* πειράματα σε ράγες αμπέλου και σε καρπούς τομάτας. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα βακτηριακά στελέχη BS57, BS63, BS48 ήταν πιο αποτελεσματικά *in vitro*, μέσω πιθανών παραγωγής αντιμικροβιακών ενώσεων και αντιβιοτικών, ενώ τα στελέχη ζυμών YS55, YS137, YS44 επέδειξαν ανώτερη δράση σε ράγες αμπέλου, ανταγωνίζοντας το παθογόνο *B. cinerea* για χώρο και θρεπτικά συστατικά. Τα στελέχη ζυμών μείωσαν την κονιδιογένεση κατά 30–65% και ανέστειλαν αποτελεσματικά τον *B. cinerea*. Σχετικά με τον *A. carbonarius*, σχεδόν όλοι οι βιολογικοί παράγοντες μείωσαν την παραγωγή ωχρατοξίνης Α (με μέγιστο 45%), ενώ όλοι ανέστειλαν την κονιδιογένεση.

## 1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΣΤΟΧΟΙ

Τα χημικά φυτοφάρμακα, αν και αποτελεσματικά στην καταπολέμηση των ασθενειών των φυτών, ενέχουν σημαντικούς κινδύνους για το περιβάλλον, τους οργανισμούς-μη στόχους και μπορούν να αφήσουν υπολείμματα στα τρόφιμα, επηρεάζοντας έτσι την ανθρώπινη υγεία. Επίσης, η διαρκώς εντεινόμενη διαδικασία εκδήλωσης ανθεκτικότητας από τους φυτοπαθογόνους μικροοργανισμούς-στόχους συμπληρώνει τις ικανές και αναγκαίες συνθήκες προώθησης της βιολογικής αντιμετώπισης στον τομέα της φυτοπροστασίας.

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η αξιολόγηση και η ανάδειξη πιθανών αποτελεσματικών βιολογικών παραγόντων προσαρμοσμένων στις μικροκλιματολογικές συνθήκες του Θηραϊκού αμπελώνα, ως προς την παρεμπόδιση του μύκητα *Botrytis cinerea* και *Aspergillus carbonarius*. Επίσης, στόχος της μελέτης ήταν και η *ex vivo* αξιολόγηση και η αποτελεσματικότητα εμπορικών σκευασμάτων, ως προς την παρεμπόδιση του μύκητα, που ανήκουν στην ευρύτερη κατηγορία των προϊόντων των βιοδιεγερτών (biostimulants) που προάγουν τη «βιοενίσχυση» των φυτών (κομποστοποιημένα προϊόντα). Οι μικροβιακοί παράγοντες αξιολογήθηκαν αρχικά *in vitro* σε «διπλές καλλιέργειες» και στη συνέχεια *ex vivo*, σε μια προσπάθεια ερμηνείας των διαφορετικών κατηγοριών μηχανισμών δράσεων τους. Η σύγκριση της δράσης των υπό αξιολόγηση μικροοργανισμών σε δύο διαφορετικά παθοσυστήματα, διαβαθμισμένης πολυπλοκότητας, όπως αυτή προκύπτει από τις τριτροφικές αλληλεπιδράσεις στη μία περίπτωση (*ex vivo* πειράματα) και της αλληλεπίδρασης παθογόνου-μικροβιακών παραγόντων στην άλλη (*in vitro* πειράματα) συνέβαλε στην εξαγωγή χρήσιμων συμπερασμάτων για τους μηχανισμούς δράσης των βιοπαραγόντων. Τα συμπεράσματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην επιλογή στελεχών για περαιτέρω δοκιμές μεγαλύτερης κλίμακας, όπως είναι και η επέκταση της αξιολόγησής τους στο πεδίο-αγρό, με τελικό σκοπό την εμπορική αξιοποίηση τους, τόσο σε προσυλλεκτικό, όσο και σε μετασυλλεκτικό επίπεδο.

**Ο σκοπός του παρόντος εγγράφου αφορά στην αξιολόγηση** καινοτόμων πρωτότυπων προϊόντων και νέων υπό ανάπτυξη βιολογικών σκευασμάτων με βάση βακτήρια και ζύμες έναντι παθογόνων της αμπέλου καθώς και εμπορικά βιολογικά σκευάσματα, για την αντιμετώπιση του ωιδίου και της μαύρης σήψης σε αμπελώνες επιτραπέζιων ποικιλιών αμπέλου.

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, 2.2. Αποτελέσματα και Συζήτηση.
- 3. Σύνοψη και Συμπεράσματα:** Βασικά ευρήματα της έρευνας και σχετικά συμπεράσματα.
- 4. Παράρτημα:** Βιβλιογραφικές αναφορές.

## 2 ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΩΝ ΕΡΓΑΣΙΩΝ

### 2.1 Υλικά και Μέθοδοι

#### **Πείραμα 1. Αξιολόγηση βιολογικών σκευασμάτων σε εμπορικό αμπελώνα**

Ο στόχος του πειράματος ήταν η αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας βιολογικών σκευασμάτων (εμπορικών και υπό ανάπτυξη) για την αντιμετώπιση του ωιδίου και της μαύρης σήψης (*Aspergillus section Nigri*). Έγινε επιλογή εμπορικού αμπελώνα επιτραπέζιων σταφυλιών ποικιλίας Crimson στην περιοχή της Αλεξάνδρειας Ημαθίας (χωριό Βρυσάκι). Όλα τα πειράματα σχεδιάστηκαν σύμφωνα με το σχέδιο RCBD (Randomized Complete Block Design). Σε κάθε τεμάχιο οι εφαρμογές ήταν τυχαιοποιημένες. Κάθε εφαρμογή αποτελούνταν από 4 τεμάχια με 40 πρέμνα. Όλα τα προγράμματα ψεκασμού ξεκίνησαν στο τέλος της ανθοφορίας (BBCH 69) και ολοκληρώθηκαν στο BBCH 81-83 (αρχή ωρίμανσης). Στον παρακάτω πίνακα αναφέρονται οι εφαρμογές με τα βιολογικά σκευάσματα, οι δοσολογίες και τα στάδια στα οποία έγιναν οι ψεκασμοί. Η εφαρμογή MIX BIO περιλαμβάνει μικροβιακά φυτοπροστατευτικά προϊόντα (*Amylo X - Bacillus amyloliquefaciens*, *Serenade - Bacillus amyloliquefaciens*, *Polyversum- Pythium oligandrum*) και βιοδιεγέρτες (*Fytosave - cos-oga*, *Romeo-cerevisane*, *Limocide-orange oil*). Εφαρμόστηκαν επίσης τα σκευάσματα *Septum* (φυτικό εκχύλισμα *Equisetum* sp.), *Terranum* (βιολογικό μυκητοκτόνο, με βάση τη λεκιθίνη) και αποβουτυρωμένο γάλα (skim milk).

#### **Πίνακας εφαρμογών βιολογικών σκευασμάτων σε εμπορικό αμπελώνα επιτραπέζιων σταφυλιών ποικιλίας Crimson**

Trt No.	Treatment Name	Form Conc	Form Unit	Form Type	Rate Rate	Rate Unit	Appl Code	Appl Timing
1	UNTREATED CHECK							
MIX BIO	AMYLO-X	25	%	WG	2,5	kg/ha	A	BBCH 69-71
	FYTOSAVE	1,25	%	SL	2,0	L/ha	C	BBCH 75
	SERENADE ASO	96,69	%	SC	4,0	L/ha	D	BBCH 77-79
	ROMEO	94,1	%	WP	0,25	kg/ha	E	BBCH 79-81
	LIMOCIDE	5,67	%	ME	1,6	L/ha	F	BBCH 81
	POLYVERSUM WP	17,5	%	WP	0,3	kg/ha	G	BBCH 81-83
3	SEPTUM (Φυτικό εκχύλισμα <i>Equisetum</i> sp.)				0,5	L/100 L	A	BBCH 69-71
4	TERRANUM (Βιολογικό μυκητοκτόνο, με βάση την Λεκιθίνη)				0,4	L/100 L	A	BBCH 69-71
5	SKIM MILK				10	L/100 L	C	BBCH 75
	SKIM MILK				10	L/100 L	D	BBCH 77-79

## **Πείραμα 2. Αξιολόγηση νέων υπό ανάπτυξη βιολογικών σκευασμάτων με βάση βακτήρια και ζύμες έναντι των φυτοπαθογόνων μυκήτων *Botrytis cinerea* και *Aspergillus flavus***

Χρησιμοποιήθηκαν βακτήρια και ζύμες από τη Μικροβιακή Συλλογή του Εργαστηρίου Φυτοπαθολογίας που είχαν απομονωθεί από το Θηραϊκό αμπελώνα στη Σαντορίνη με σκοπό να βρεθούν αποτελεσματικά στελέχη που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως δραστικές ουσίες σε υπό ανάπτυξη βιομυκητοκτόνα κατά του μύκητα *Botrytis cinerea* και *Aspergillus carbonarius* και των ωχρατοξινών. Πρόκειται για ενδημικά, επιφυτικά στελέχη βακτηρίων και ζυμών τα οποία απομονώθηκαν από αντιπροσωπευτικούς αμπελώνες στη νήσο της Σαντορίνης, τον Ιούλιο του 2021. Με βάση προηγούμενες μελέτες επιλέχθηκαν οι 5 πιο αποτελεσματικές ζύμες (YS5, YS44, YS114, YS137, YS144) και τα 5 πιο αποτελεσματικά στελέχη βακτηρίων (BS43, BS48, BS57, BS63, BS85), σύμφωνα με *in vitro* και *ex vivo* προκαταρκτικά πειράματα εναντίον του ωχρατοξικογόνου μύκητα *Aspergillus carbonarius* (**Πίνακα**) (Περιβολάρης, 2024). Διερευνήθηκε περαιτέρω η ανταγωνιστική ικανότητα των επιλεγμένων ζυμών και βακτηρίων εναντίον των μυκήτων *Botrytis cinerea* και *Aspergillus carbonarius*.

**Πίνακας 4.5.7-1:** Απομονώσεις βακτηρίων (BS) και ζυμών (YS)

<b>Απομονώσεις Βακτηρίων - Ζυμών</b>	
BS 43	<i>Bacillus halotolerans</i>
BS 48	<i>Bacillus subtilis</i>
BS 57	<i>Bacillus halotolerans</i>
BS 63	<i>Bacillus tequilensis</i>
BS 85	<i>Pantoea agglomerans</i>
YS 5	<i>Debaryomyces nepalensis</i>
YS 44	<i>Candida railenensis</i>
YS 114	<i>Aureobasidium pullulans</i>
YS 137	<i>Aureobasidium pullulans</i>
YS 144	<i>Candida railenensis</i>

Επίσης τα υπό ανάπτυξη προϊόντα IKORGANIC Compost A και Compost B αξιολογήθηκαν για την αντιμετώπιση των σήψεων ραγών αμπέλου από τον μύκητα *Botrytis cinerea*.

### **IKORGANIC Compost A (υπό ανάπτυξη προϊόν)**

Αποτελείται από υπολείμματα καλλιέργειας κρεμμυδιού και χλωρά κλαδέματα. Με τη μέθοδο της αερόβιας κομποστοποίησης παράγεται στερεό compost το οποίο επεξεργάζεται για τη δημιουργία του υγρού τελικού προϊόντος.

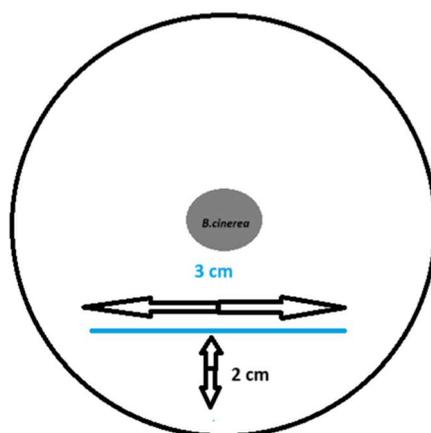
## **IKORGANIC Compost B (υπό ανάπτυξη προϊόν)**

Αποτελείται από υπολείμματα καλλιέργειας κρεμμυδιού, χλωρά κλαδέματα και στρωμνή μανιταριών και προκύπτει με τη μέθοδο που προαναφέρθηκε.

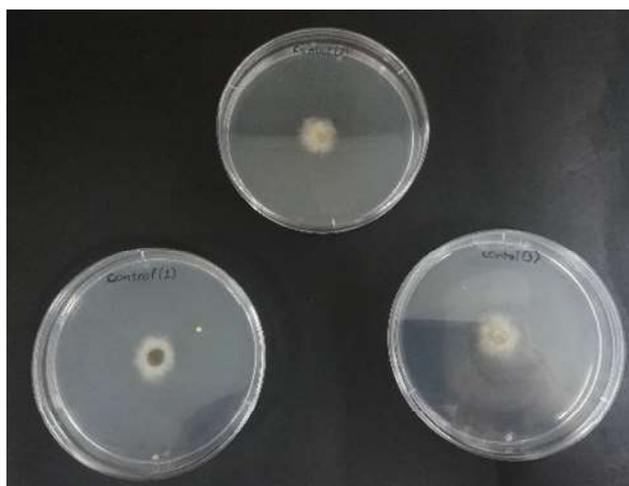
Η αξιολόγηση των απομονωθεισών ζυμών, βακτηρίων αλλά και των κομποστοποιημένων προϊόντων βασίστηκε σε τεχνητές μολύνσεις σε ράγες σταφυλιών και μικρόκαρπες τομάτες. Χρησιμοποιήθηκαν καρποί ομοιόμορφοι ως προς το μέγεθος, το στάδιο ωριμότητας και χωρίς μηχανικές ή άλλες ορατές βλάβες. Για τα *ex vivo* πειράματα και συγκεκριμένα για τα σταφύλια η μόλυνση έγινε επί επιτραπέζιων ποικιλιών. Στο 1<sup>ο</sup> πείραμα, οι μολύνσεις έγιναν σε ράγες ποικιλίας Σουλτανίνας (λευκή ποικιλία), στο 2<sup>ο</sup> πείραμα σε ράγες ποικιλίας Φράουλα (ερυθρή ποικιλία) και στο 3<sup>ο</sup> πείραμα, οι μολύνσεις έγιναν επί μικρόκαρπης τομάτας και συγκεκριμένα του υβριδίου – Lobello F1 (τοματίνι βελανίδι, *S. Lycopersicum var. pyriforme*).

## ***In vitro* διερεύνηση της ανταγωνιστικής ικανότητας των επιφυτικών ζυμών, και βακτηρίων κατά του *Botrytis cinerea***

Η διπλή καλλιέργεια μύκητα και βακτηρίου στο ίδιο τρυβλίο, είναι μία απλή μέθοδος ανίχνευσης αντιμυκητιακής δράσης των βιοπαραγόντων. Η δράση γίνεται εμφανής με τη δυσκολία του μύκητα να αναπτυχθεί στο υπόστρωμα, σε σχέση με το μάρτυρα και την εμφάνιση της ζώνης αναστολής. Ο εμβολιασμός των μικροοργανισμών έγινε σε τρυβλία Petri, διαμέτρου 9cm. Μετά την ενεργοποίηση των 5 στελεχών ζυμών και των 5 στελεχών βακτηρίων σε τεχνητό θρεπτικό υπόστρωμα YMA και NAG αντίστοιχα, κάθε βιολογικός παράγοντας τοποθετήθηκε σε απόσταση 2 cm από την περιφέρεια ενός τρυβλίου Petri (διαμέτρου 9 cm) που περιείχε υπόστρωμα PDA (PDA, Merck, Darmstadt, Γερμανία), υπό ασηπτικές συνθήκες, μέσα στο θάλαμο κάθετης νηματικής ροής. Κάθε βιολογικός παράγοντας εμβολιάστηκε σε ευθύγραμμο τμήμα, μήκους 3 cm, (**Εικόνα 4.5.7-1**) με τη χρήση αποστειρωμένου βακτηριακού κρίκου και στη συνέχεια όλες οι επεμβάσεις αφέθηκαν να αναπτυχθούν για 48 ώρες στους 23 °C. Για κάθε επέμβαση βιολογικού παράγοντα εφαρμόστηκαν 3 επαναλήψεις (3 τρυβλία PDA). Στη συνέχεια κατά την 3<sup>η</sup> ημέρα του πειράματος, ένα κυκλικό τεμάχιο (mycelium agar plug - διαμέτρου 5 mm), που ελήφθη από την περιφέρεια μιας φρεσκοαναπτυγμένης αποικίας *B. cinerea*, αναπτυγμένου σε υπόστρωμα PDA, τοποθετήθηκε στο κέντρο του τρυβλίου ανάπτυξης. Μετά τον εμβολιασμό του μύκητα, τα τρυβλία επώαστηκαν για 5 ημέρες στους 23 °C. Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκαν τρυβλία στα οποία τοποθετήθηκε μόνο ο μύκητας (**Εικόνα 4.5.7-2**).



**Εικόνα 4.5.7-1.** Σχέδιο διπλής καλλιέργειας μύκητα-βακτηρίου και μύκητα -ζύμης



**Εικόνα 4.5.7-2.** Θετικός μάρτυρας κατά τη 2η D.P.I.

**Ex vivo διερεύνηση της ανταγωνιστικής ικανότητας των επιφυτικών ζυμών, βακτηρίων και κομποστοποιημένων προϊόντων κατά του *Botrytis cinerea* σε ράγες αμπέλου**

Οι υπό αξιολόγηση μικροοργανισμοί ενεργοποιήθηκαν με γραμμική διασπορά (streaking) σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα PDA από τους -80C. Τα τρυβλία τοποθετήθηκαν σε επωαστικό θάλαμο στους 28°C για 48 ώρες.

Απολύμανση καρπών. Οι ράγες (8 ανά επανάληψη) αποκόπηκαν από τη ράχη του σταφυλιού με 0,5 cm. μίσχου με προσοχή, ώστε να μην προκληθεί τραυματισμός. Στη συνέχεια ακολούθησε απολύμανση με εμφάπτιση σε διάλυμα χλωρίνης 10% v/v για 5 λεπτά (domestic bleach solution 4,85% NaOCl). Ακολουθώντας, η εμφάπτιση συνεχίστηκε σε διάλυμα αιθανόλης 70% v/v για 10 λεπτά, ενώ στο τέλος έγιναν

δύο εκπλύσεις με αποστειρωμένο νερό (**Εικόνα 4.5.7-3**). Στη συνέχεια, οι καρποί αφέθηκαν να στεγνώσουν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος σε θάλαμο οριζόντιας νηματικής ροής, πάνω σε διηθητικό χαρτί. Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε για την απολύμανση στους καρπούς τομάτας, ενώ και εδώ κατά τη μεταχείριση των καρπών δόθηκε προσοχή για την αποφυγή τόσο τραυματισμών, όσο και απομάκρυνσης του ποδίσκου.

### **Προετοιμασία αιωρήματος κυττάρων ανταγωνιστικών ζυμών και βακτηρίων και διαλύματος κομποστοποιημένων προϊόντων**

Αρχικά, για τα *ex vivo* πειράματα στις επιτραπέζιες ποικιλίες σταφυλιών παρασκευάστηκαν οι υγρές θρεπτικές καλλιέργειες NG για τα βακτήρια και αντίστοιχα YM για τις ζύμες. Κωνικές φιάλες των 250 ml, περιεκτικότητας 100 ml θρεπτικού υλικού YM ή NG εμβολιάστηκαν με μια μικρή ποσότητα κυττάρων ζύμης ή βακτηρίων από το κάθε στέλεχος που είχε ήδη καλλιεργηθεί στα τρυβλία αντίστοιχα και επώαστηκαν για 48 ώρες σε περιστροφικό αναδευτήρα σε θερμοκρασία 25 °C και σε 180 στροφές ανά λεπτό (rpm). Ταυτόχρονα σε 2 φιαλίδια τύπου falcon 50 ml, τοποθετήθηκε υγρό θρεπτικό YM και NG, ως μάρτυρες, τα οποία επίσης επώαστηκαν στο orbital. Τέλος, έγινε φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 9000 rpm, προκειμένου να επιτευχθεί ο διαχωρισμός φάσεων και η επακόλουθη συλλογή των κυττάρων των ζυμών ή των βακτηρίων. Όσον αφορά τα βακτήρια, μετά τη φυγοκέντρηση έγινε η παρασκευή εναιωρήματος βακτηριακών κυττάρων τελικής συγκέντρωσης  $10^8$  cfu/ml αιωρήματος για κάθε επέμβαση σε ρυθμιστικό διάλυμα Saldo plus 15 SL (0,02% v/v). Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης των βακτηρίων έγινε με φωτομέτρηση για τα βακτήρια. Στη συνέχεια ακολούθησε η εμβάπτιση των καρπών σε κάθε στέλεχος βακτηρίου, για 30 min, στους 150 rpm, στους 25 °C σε κωνικές φιάλες. Οι καρποί επιμερίστηκαν ισόποσα σε 3 υγρούς θαλάμους/κουτιά, δηλαδή 3 επαναλήψεις με 8 ράγες ανά επανάληψη και εφαρμογή.



Εικόνα 4.5.7-1. Διαδικασία απολύμανσης των ραγών σταφυλιών

Για τις ζύμες, μετά τη φυγοκέντρηση απομακρύνθηκε το υπερκείμενο υγρό και λήφθηκε το ίζημα των κυττάρων (**Εικόνα 4.5.7-4**). Ακολούθησε επαναιωρηματοποίηση των κυττάρων με την προσθήκη 10 ml αποστειρωμένου νερού και πολύ καλή ανάδευση. Στη συνέχεια έγινε μέτρηση του αριθμού των κυττάρων με τη χρήση αιματοκυτταρόμετρου, ενώ με διαδοχικές αραιώσεις, όπου κρίθηκε απαραίτητο, ρυθμίστηκε η παρασκευή αιωρήματος κυττάρων της κάθε εξεταζόμενης ζύμης τελικής συγκέντρωσης  $10^7$  cfu/ml. Αφού έγινε η αναφερθείσα ρύθμιση, λήφθηκε η απαραίτητη ποσότητα από το αρχικό επαναιωρηματοποιημένο διάλυμα σε τελικό όγκο 100 ml μέσα στην κωνική φιάλη που περιέχονται οι 25-30 καρποί της κάθε επέμβασης. Τέλος, προστέθηκαν 20 ml ρυθμιστικού διαλύματος Saldo plus στην κωνική φιάλη της κάθε επέμβασης (**Εικόνα 4.5.7-5**) και

ακολούθησε η ανακίνηση των καρπών για 30 min, στους 150 rpm, στους 25 °C.



**Εικόνα 4.5.7-4.** Τα αξιολογούμενα στελέχη των βακτηρίων και ζυμών μετά τη διαδικασία της φυγοκέντρησης και την απομάκρυνση του υπερκείμενου υγρού



**Εικόνα 4.5.7-5.** Εμβάπτιση των καρπών τομάτας σε αιωρήματα των υπό ανάπτυξη βιολογικών παραγόντων (βακτήρια, ζύμες)

#### **Εμβάπτιση των καρπών με τα κομποστοποιημένα προϊόντα**

Η εμβάπτιση των ραγών με την κάθε επέμβαση κομποστοποιημένου προϊόντος έγινε σε τελικό όγκο 100 ml, περιεκτικότητας εξ' ολοκλήρου του ετοιμόχρηστου προϊόντος εκχυλίσματος κρεμμυδιού για την μία επέμβαση και αντίστοιχα του ετοιμόχρηστου προϊόντος εκχυλίσματος μανιταριού για την άλλη, τόσο στην πειραματική διαδικασία επώασής τους στις επιτραπέζιες ποικιλίες σταφυλιού, όσο και στην αντίστοιχη στα τοματίνια. Η διαδικασία της εμβάπτισης έγινε στον περιστροφικό αναδευτήρα για 30 min. και στις ρυθμιζόμενες συνθήκες των 150 rpm και 25.C. Ως μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν ράγες εμβαπτισμένες σε ρυθμιστικό διάλυμα Saldo plus 20ml σε 100 ml αποστειρωμένου νερού.

#### **Επώαση των βιολογικών παραγόντων στους καρπούς**

Αφού ολοκληρώθηκε η διαδικασία της εμβάπτισης για κάθε βιολογικό παράγοντα, οι ράγες αφήνονταν επί διηθητικού χαρτιού στο θάλαμο νηματικής ροής για να στεγνώσουν, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Ακολούθως τοποθετήθηκαν ανά 8 μέσα σε πλαστικά κουτιά (υγροί θάλαμοι) διαστάσεων 11x17x5 cm, τα οποία

προηγουμένως είχαν απολυμανθεί με τη χρήση UV ακτινοβολίας, εντός του θαλάμου οριζόντιας νηματικής ροής. Οι ράγες τοποθετήθηκαν εντός καπακιών - με τη χρήση αποστειρωμένης μεταλλικής λαβίδας - ως βάσεις που τις κρατούσαν σταθερές, έτσι ώστε να μην έρχονταν σε επαφή με τα νωπά διηθητικά χαρτιά. Στο εσωτερικό των κουτιών προστέθηκε διηθητικό χαρτί το οποίο με την προσθήκη νερού διατηρούνταν νωπό, με σκοπό την προσομοίωση συνθηκών υψηλής σχετικής υγρασίας (>90%). Ιδιαίτερη προσοχή δόθηκε ώστε εντός των επαναλήψεων της ίδιας επέμβασης να επιλεγούν καρποί κατά το δυνατόν του ίδιου μεγέθους. Στη συνέχεια, τα κουτιά (υγροί θάλαμοι) τοποθετούνταν κλειστά σε επωαστικό θάλαμο ελεγχόμενων συνθηκών στους 25 °C, με φωτοπερίοδο 12 ώρες και σχετική υγρασία 90-95% για 24 ώρες, μέχρι να ακολουθήσει η μόλυνση από τον μύκητα (**Εικόνες 4.5.7-6** **Error! Reference source not found.**).



**Εικόνα 4.5.7-6.** Στέγνωμα ραγών μετά την εμφάνισή τους στους βιολογικούς παράγοντες στο θάλαμο οριζόντιας νηματικής ροής επί διηθητικών χαρτιών



**Εικόνα 4.5.7-7.** Τοποθέτηση καρπών τομάτας σε πλαστικά κουτιά και τοποθέτησή τους σε επωαστικούς θαλάμους

## Μολύνσεις καρπών με το μύκητα *Botrytis cinerea*

Ένα μικρό κομμάτι θρεπτικού υποστρώματος (block) από καλλιέργεια επτά ημερών, του μύκητα *Botrytis cinerea* τοποθετήθηκε σε 5 ml απεσταγμένου-αποστειρωμένου νερού. Στη συνέχεια, έγινε καλή ανάδευση όπου με τη βοήθεια αιματοκυτταρόμετρου η συγκέντρωση των κονιδίων ρυθμίστηκε στα  $5 \times 10^4$  κονιδία (cfu) ανά ml. Στο τελικό εναιώρημα κονιδίων προστέθηκε Tween®20 0,05% v/v.

Μετά την πάροδο 24 ωρών από την εφαρμογή με τους βιολογικούς παράγοντες ακολούθησε η τεχνητή μόλυνση. Στο 1<sup>ο</sup> και 3<sup>ο</sup> πείραμα σε κάθε ράγα σταφυλιού της ποικιλίας Σουλτανίνας ή τοματινιού προκλήθηκε πληγή διαμέτρου 2mm και βάθος 3 mm. περίπου, με τη χρήση αποστειρωμένου νυστεριού. Σε κάθε πληγή τοποθετήθηκαν 20 ml μολύσματος και συγκέντρωσης  $5 \times 10^4$  κονιδίων/ml. Τέλος, τα κουτιά με τις ράγες τυλίγονταν με μεμβράνη και τοποθετούνταν εκ νέου στον επωαστικό θάλαμο. Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκαν ράγες που είχαν μολυνθεί μόνο από το μύκητα. Ως αρνητικοί μάρτυρες αντίστοιχα καρποί που εμβολιάστηκαν με 20 ml απεσταγμένου-αποστειρωμένου νερού. Στο 2<sup>ο</sup> πείραμα, η τεχνητή μόλυνση ήταν διαφορετική. Σε κάθε ράγα της επιτραπέζιας ποικιλίας φράουλα εφαρμόστηκε ψεκασμός του μολύσματος (αιώρημα κονιδίων του μύκητα), χωρίς την πρόκληση πληγής. Ειδικότερα, σε κάθε υγρό θάλαμο-κουτί εφαρμόσθηκε τελικός όγκος 2 ml μολύσματος, συγκέντρωσης  $5 \times 10^4$  κονιδίων/ml. Μετά την πραγματοποίηση των τεχνητών μολύνσεων οι υγροί θάλαμοι μεταφέρθηκαν σε επωαστικούς θαλάμους, με σκοπό την επώαση του μύκητα σε ελεγχόμενες συνθήκες, θερμοκρασίας (στους 20-25 °C) και σχετικής υγρασίας (90-95%). Από αυτό το στάδιο και έπειτα λαμβάνονταν φωτογραφίες σε καθημερινή βάση, για την οπτική καταγραφή της εξέλιξης των συμπτωμάτων.

## Τεχνικές οπτικοποίησης και ποσοτικοποίησης του παραγόμενου μυκηλίου του μύκητα *B. cinerea* στα *in vitro* και *ex vivo* πειράματα

***In vitro* πειράματα (Διπλές Καλλιέργειες – Dual Cultures).** Η τακτική παρατήρηση της ανάπτυξης του μυκηλίου επί των τρυβλίων πραγματοποιούνταν μέσω λήψης μετρήσεων και φωτογραφιών. Στο πείραμα των διπλών καλλιεργειών η λήψη των μετρήσεων και των φωτογραφιών πραγματοποιήθηκε κατά την 2<sup>η</sup>, 3<sup>η</sup>, 4<sup>η</sup>, 5<sup>η</sup> ημέρα μετά τον ενοφθαλμισμό των τρυβλίων (τοποθέτηση του βοτρυτή στο τρυβλίο ανάπτυξης). Προκειμένου να υπολογιστεί η επί τοις % παρεμπόδιση της ανάπτυξης του μύκητα, από κάθε επανάληψη-τρυβλίο της κάθε επέμβασης υπολογίστηκε η ακτίνα του μυκηλίου του βοτρυτή με σημείο αναφοράς το κέντρο του αρχικού «δίσκου» του εμβολιασμένου μύκητα μέσα στο τρυβλίο, για την κάθε χρονική στιγμή. Η ολοκλήρωση των μετρήσεων έγινε την 5<sup>η</sup> ημέρα μετά τη μόλυνση, όταν μέσω της οπτικής παρατήρησης ο θετικός μάρτυρας έφτασε στο μέγιστο της ανάπτυξης του. Στις μεν αποτελεσματικές επεμβάσεις ήταν εμφανής η ανάπτυξη ζώνης παρεμπόδισης. Στις δε λιγότερο ή καθόλου αποτελεσματικές επεμβάσεις, η μυκηλιακή υφή του βοτρυτή σταματούσε να αναπτύσσεται κατά την επαφή του με τα στελέχη ζυμών/βακτηρίων ή ξεπερνούσε την καλλιέργεια των

τελευταίων αντίστοιχα, ενώ στο μάρτυρα ο βοτρυτής είχε φθάσει στο μέγιστο της ανάπτυξης του.

Η παραπάνω διαδικασία οδήγησε στον υπολογισμό της επί τοις % παρεμπόδισης ανάπτυξης του μυκηλίου του βοτρυτή για κάθε χρονική στιγμή, ξεχωριστά για κάθε επανάληψη της κάθε επέμβασης σύμφωνα με τον τύπο):

$$\text{Αναστολή Μυκηλιακής Ανάπτυξης} = \frac{(\text{Μάρτυρας} - \text{Επέμβαση})}{\text{Μάρτυρας}} \times 100$$

Όταν το ποσοστό αναστολής υπερβαίνει το 20% θεωρείται ότι ο μύκητας αναστέλλεται δραστικά (Tiru et al., 2013; Chang et al., 2007).

### **Ex vivo πειράματα**

Η τακτική παρατήρηση της ανάπτυξης του μυκηλίου επί των εφαρμογών πραγματοποιούνταν μέσω λήψης φωτογραφιών από κινητή συσκευή έξυπνου τηλεφώνου (smartphone). Πιο συγκεκριμένα, από το 1<sup>ο</sup> πείραμα (επιτραπέζια ποικιλία Σουλτανίνα) φωτογραφίες ελήφθησαν κατά την 4<sup>η</sup>, 5<sup>η</sup>, 6<sup>η</sup>, 7<sup>η</sup> και 8<sup>η</sup> ημέρα μετά τη μόλυνση (Days Post Infection - D.P.I.). Αντίστοιχα από το 2<sup>ο</sup> πείραμα (επιτραπέζια ποικιλία Φράουλα), οι φωτογραφίες αντιστοιχούσαν στην 3<sup>η</sup>, 4<sup>η</sup>, 5<sup>η</sup>, 6<sup>η</sup>, 7<sup>η</sup>, 10<sup>η</sup> και 11<sup>η</sup> ημέρα μετά τη μόλυνση, ενώ στο 3<sup>ο</sup> πείραμα (τοματίνια) λήψεις φωτογραφιών έγιναν κατά τη 2<sup>η</sup>, 3<sup>η</sup>, 4<sup>η</sup>, 5<sup>η</sup>, 6<sup>η</sup>, 7<sup>η</sup>, 8<sup>η</sup>, 9<sup>η</sup>, 10<sup>η</sup>, 11<sup>η</sup>, 12<sup>η</sup>, 13<sup>η</sup> και 14<sup>η</sup> ημέρα μετά τη μόλυνση. Ειδικότερα, για την ανάλυση των εικόνων και για τον υπολογισμό της ανάπτυξης του μύκητα χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό Photoshop CC 2019. Έτσι, υπολογίσθηκε το εμβαδόν της προσβεβλημένης επιφάνειας (σε cm<sup>2</sup>) ξεχωριστά για κάθε καρπό, δημιουργώντας φωτογραφίες σε ασπρόμαυρη κλίμακα, αντίθετης φάσης. Η παραπάνω διαδικασία οδήγησε στην εξαγωγή κρίσιμων αποτελεσμάτων όπως η εξέλιξη της σοβαρότητας της ασθένειας (Disease Severity) και ο προσδιορισμός της περιοχής κάτω από την καμπύλη εξέλιξης της ασθένειας (AUDPC). Ο υπολογισμός της τελευταίας παραμέτρου συνέβαλε στον προσδιορισμό της συνολικής σοβαρότητας της ασθένειας (συνολικό Disease Severity) εκφρασμένο ως AUDPC.

### **Καταμέτρηση παραγόμενων κονιδίων του *B. cinerea* (ex vivo πειράματα)**

Το κριτήριο για την ολοκλήρωση κάθε ex vivo πειραματικής διαδικασίας και για την καταμέτρηση των κονιδίων ήταν η οπτική παρατήρηση μετατροπής του λευκού, βαμβακώδους μυκηλίου σε γκριζο στην πλειοψηφία των επεμβάσεων και φυσικά ως μέτρο σύγκρισης ο θετικός μάρτυρας να έχει φθάσει στο μέγιστο της προσβολής. Έτσι, σε όλα τα πειράματα η καταμέτρηση των κονιδίων έγινε την τελευταία ημέρα μετά την μόλυνση (D.P.I.) και πιο συγκεκριμένα, στο 1<sup>ο</sup> πείραμα κατά την 8<sup>η</sup> D.P.I., στο 2<sup>ο</sup> πείραμα κατά την 11<sup>η</sup> D.P.I. και στο 3<sup>ο</sup> πείραμα κατά την 14<sup>η</sup> D.P.I.



**Εικόνα 4.5.7-8.** Διαδικασία πολτοποίησης των καρπών και τοποθέτησης

Αρχικά έγινε η πολτοποίηση των καρπών ανά υγρό θάλαμο/κουτί σε ένα φιαλίδιο falcon. Ακολούθησε 10 φορές αραιώση αρχικά και διερευνητικά στο θετικό μάρτυρα, τοποθετήθηκαν από 20 μl σε κάθε πλάκα του αιματοκυτταρόμετρου και ακολούθησε παρατήρηση στο οπτικό μικροσκόπιο. Αν κρινόνταν σκόπιμο λόγω εύρεσης πυκνού διαλύματος κονιδίων και προς διευκόλυνση της τελικής καταμέτρησης των κονιδίων πραγματοποιούνταν 100 φορές αραιώση. Η παραπάνω διαδικασία οδήγησε στην εξαγωγή κρίσιμων αποτελεσμάτων και συμπερασμάτων μέσω της ποσοτικοποίησης της ανταγωνιστικής ικανότητας των εν δυνάμει βιολογικών παραγόντων έναντι της ικανότητας παραγωγής κονιδίων του φυτοπαθογόνου μύκητα.

### **Μολύνσεις καρπών με το μύκητα *Aspergillus carbonarius***

Πραγματοποιήθηκαν τεχνητές μολύνσεις ραγών ποικιλίας «Απτική» για την αξιολόγηση της ανταγωνιστικής δράσης των 10 επιλεγμένων βακτηρίων και ζυμών (**Πίνακας 4.5.7-1**) έναντι του ωχρατοξικογόνου μύκητα *A. carbonarius* AC29.

**Προετοιμασία αιωρήματος κονιδίων στελεχών του μύκητα *Aspergillus carbonarius*.** Αρχικά, το στέλεχος του μύκητα AC29 ενεργοποιήθηκε και επώαστηκε σε τριβλίο με θρεπτικό υπόστρωμα MEA στους 28°C για 5 ημέρες, μέχρι να καλυφθεί πλήρως με κονίδια και μυκήλιο. Αφού το τριβλίο καλύφθηκε πλήρως, πρώτα δημιουργήθηκε πυκνό μόλυσμα με 20ml ddH<sub>2</sub>O και στη συνέχεια έγινε μέτρηση της συγκέντρωσης του πυκνού αιωρήματος κονιδίων, με τη βοήθεια αιματοκυτταρόμετρου. Τέλος, ρυθμίστηκε η τελική συγκέντρωση του μολύσματος, ώστε να είναι 10<sup>4</sup> κονίδια/ml.

**Τεχνητές μολύνσεις ραγών.** Την πρώτη ημέρα, έγινε η ενεργοποίηση των ζυμών και βακτηρίων καθώς και η ενεργοποίηση του στελέχους AC29 σε PDA. Οι ζύμες ενεργοποιήθηκαν αρχικά σε στερεό θρεπτικό μέσο YMA και τα βακτήρια σε NAG. Μετά την ανάπτυξή τους στα στερεά μέσα, εμβολιάστηκαν στα αντίστοιχα υγρά θρεπτικά μέσα YM (Yeast Malt broth) και NG (Nutrient Glucose broth), στα οποία επώαστηκαν για περίπου 48 ώρες υπό αερόβιες συνθήκες (σε αναδευτήρα στους 150 rpm) και σε θερμοκρασία 25°C, με σκοπό την ενεργοποίηση και τον

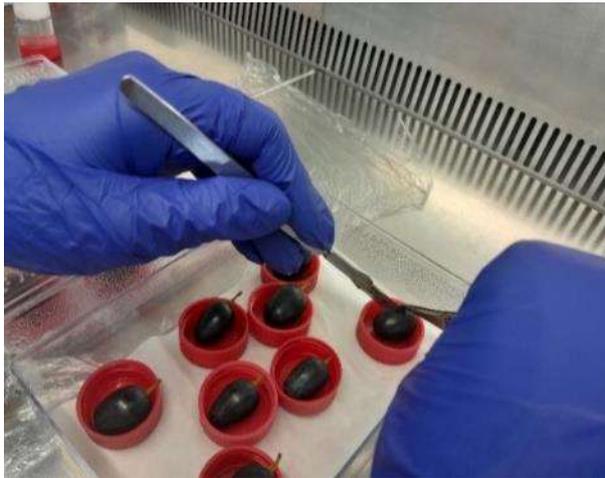
πολλαπλασιασμό τους πριν την εφαρμογή στις ράγες. Την δεύτερη ημέρα, ακολούθησε η προετοιμασία των ραγών. Αφού αποκόπηκαν οι ράγες από τους βότρες, απολυμάνθηκαν επιφανειακά με εμβάπτιση πρώτα σε διάλυμα 10% υποχλωριώδους νατρίου (χλωρίνη) και αναμονή τους 10 min σε αυτό και ύστερα σε διάλυμα αιθανόλης 70%. Τέλος, ξεπλύθηκαν με αποστειρωμένο νερό και τοποθετήθηκαν σε αποστειρωμένα διηθητικά χαρτιά, σε θερμοκρασία δωματίου, μέχρι να στεγνώσουν (**Εικόνα 4.5.7-9**). Σε κάθε εφαρμογή βιολογικού παράγοντα αντιστοιχούσαν 3 επαναλήψεις με 8 ράγες η κάθε επανάληψη, οι οποίες τοποθετήθηκαν ανά εφαρμογή σε αποστειρωμένες κωνικές φιάλες που περιείχαν τις αντίστοιχες υγρές καλλιέργειες των μικροβιακών παραγόντων, ενώ ακολούθησε η ανάδευση με 150 rpm, σε 25°C για 30 min. Αφού έμειναν σε θερμοκρασία δωματίου, σε αποστειρωμένα διηθητικά χαρτιά μέχρι να στεγνώσουν, μοιράστηκαν με αποστειρωμένη λαβίδα στα καπάκια που βρίσκονταν μέσα στα κουτιά (**Εικόνα 4.5.7-10**). Στην βάση του κουτιού, τοποθετήθηκε αποστειρωμένο διηθητικό χαρτί το οποίο ήταν εμποτισμένο με 5 mL αποστειρωμένου νερού, για την διατήρηση της υγρασίας μέσα στο κουτί. Έγινε επώαση των ραγών για 24 ώρες (12h φως- 12h σκοτάδι) στους 25°C.



**Εικόνα 4.5.7-9.** Στέγνωμα σταφυλιών σε διηθητικά χαρτιά

**Εικόνα 4.5.7-10.** Τοποθέτηση ραγών ανά εφαρμογή και επανάληψη σε κουτιά

Την 3η ημέρα έγινε μικρή πληγή σε κάθε ράγα, με την βοήθεια αποστειρωμένου νυστεριού (**Εικόνα 4.5.7-11**), εγχύθηκαν 20  $\mu$ L σταγόνες αιωρήματος κονιδίων ( $10^4$  κονίδια/ml με προσθήκη 0,05% Tween20®) του στελέχους AC29 του μύκητα *A. carbonarius* (**Εικόνα 4.5.7-12**) και τα κουτιά τοποθετήθηκαν σε επωαστικό θάλαμο στους 25°C, με φωτοπερίοδο 12 ώρες για 7 ημέρες. Τα πρώτα συμπτώματα εμφανίστηκαν μετά από 72h και οι ράγες φωτογραφίζονταν κάθε ημέρα για 5 ημέρες. Την 7<sup>η</sup> ημέρα από την στιγμή της μόλυνσης, οι ράγες από κάθε κουτί πολτοποιήθηκαν ξεχωριστά μέσα σε falcon tubes με και μεταφέρθηκε 1 ml μούστου σε φιαλίδια Eppendorf. Με τη βοήθεια αιματοκυτταρομέτρου, πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις για τον υπολογισμό των παραγόμενων κονιδίων.



**Εικόνα 4.5.7-11.** Πληγή σε ράγες με νυστέρι



**Εικόνα 4.5.7-12.** Μόλυνση με το στέλεχος AC29

### **Προσδιορισμός ωχρατοξίνης A μετά την εφαρμογή ωφέλιμων βακτηρίων και ζυμών σε ράγες σταφυλιού**

Ο χυμός από τις πολτοποιημένες ράγες (μούστος) που περιγράφηκε προηγουμένως, αξιολογήθηκε περαιτέρω για τη συγκέντρωση παραγωγής της μυκοτοξίνης ωχρατοξίνης A (OTA) από το μούστο.

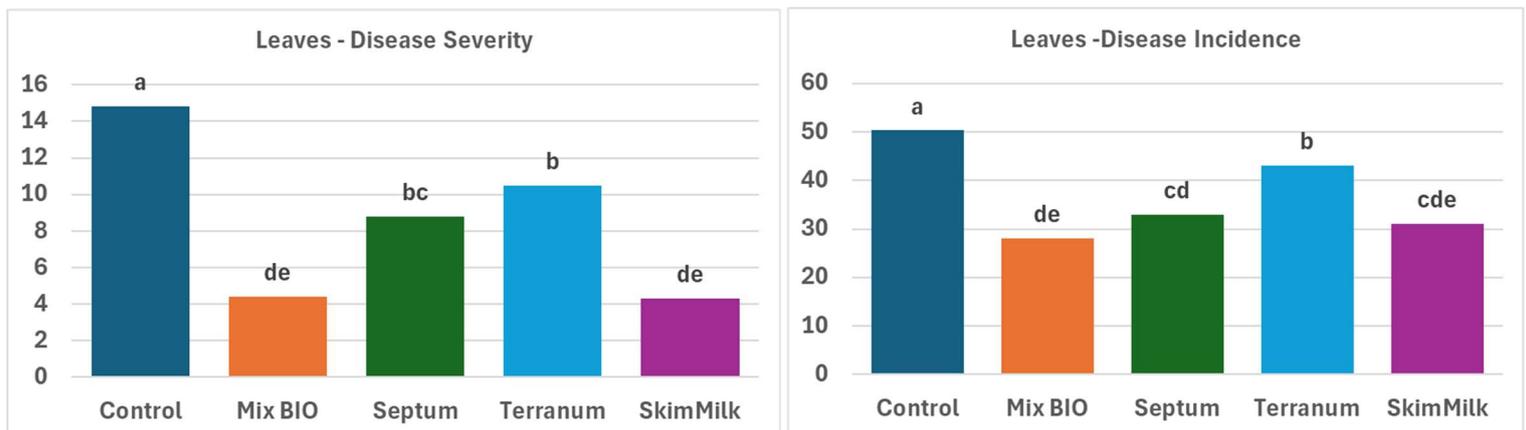
#### **Εκχύλιση ωχρατοξίνης**

1. Σε φιαλίδια falcon προστέθηκαν 3ml μούστου και 5,7ml μεθανόλης 100%. Ανακίνηση για 3min.
2. Το προϊόν εκχύλισης εγχύθηκε σε κωνική φιάλη με χωνί και διηθητικό χαρτί και συλλέχθηκε σε γυάλινο φιαλίδιο.
3. Έγινε η ρύθμιση του pH με προσθήκη NaOH 1M ώστε να είναι περίπου 6-8.
4. Ακολούθησε η διαδικασία για την μέτρηση Ωχρατοξίνης A (OTA) σύμφωνα με το πρωτόκολλο του Ochratoxin A kit (2-40 ppb), Romer Labs

## 2.2 Αποτελέσματα και Συζήτηση

### Πείραμα 1. Αξιολόγηση βιολογικών σκευασμάτων σε εμπορικό αμπελώνα Ωίδιο αμπέλου

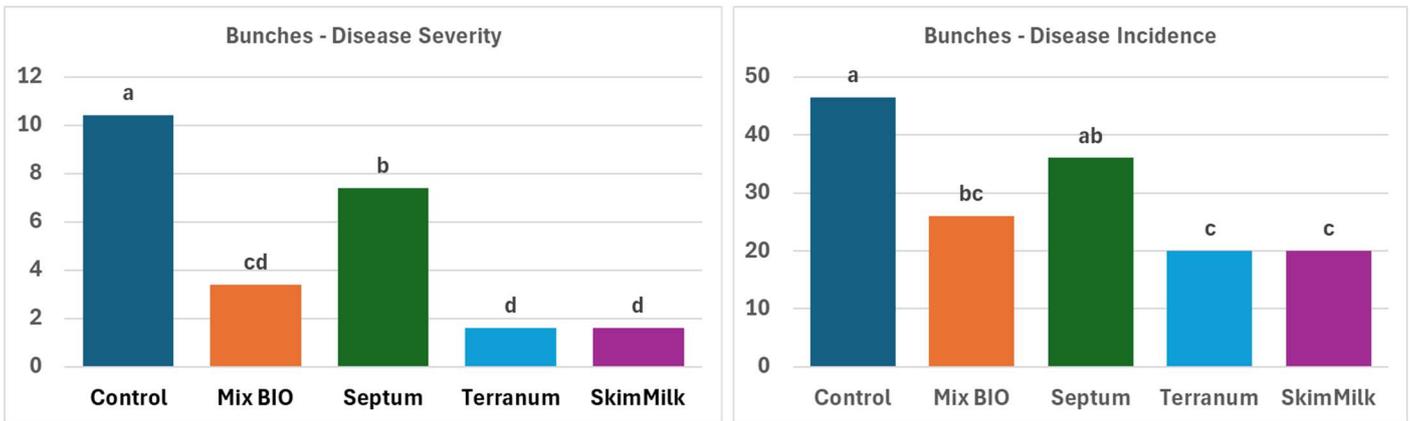
Τα πρώτα συμπτώματα του ωιδίου εμφανίστηκαν στους βότρεις στις 3/7/2024, στο BBCH 75. Η σοβαρότητα της ασθένειας ήταν 6,1% και η ένταση της ασθένειας ήταν 35,5% στους μάρτυρες που δεν εφαρμόστηκε κανένας ψεκασμός. Η μόλυνση συνέχισε να αυξάνεται κατά τη διάρκεια της καλλιεργητικής περιόδου και συμπτώματα παρατηρήθηκαν επίσης στα φύλλα. Η σοβαρότητα στα φύλλα και στους βότρεις έφτασε στο 14,8% και 10,4% αντίστοιχα, ενώ η ένταση της ασθένειας στα φύλλα και στους βότρεις έφτασε το 50,3% και 46,5% αντίστοιχα. Όλες οι εφαρμογές με τα βιολογικά σκευάσματα κατάφεραν να μειώσουν τη σοβαρότητα και την ένταση της ασθένειας σε φύλλα και βότρεις σε σύγκριση με τον μάρτυρα. Ωστόσο, καταγράφηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των σκευασμάτων ως προς το επίπεδο αποτελεσματικότητας κατά του ωιδίου (**Γράφημα 4.5.7-1**).



**Γράφημα 4.5.7-1:** Αξιολόγηση βιολογικών σκευασμάτων ως προς τη σοβαρότητα και ένταση του ωιδίου σε φύλλα αμπέλου ποικιλίας Crimson. Οι στήλες αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο 40 πρέμνων.

Στα **φύλλα**, το Mix BIO και το Skim Milk έδειξαν την υψηλότερη αποτελεσματικότητα μεταξύ των σκευασμάτων τόσο στη σοβαρότητα όσο και στην ένταση της ασθένειας στην τελευταία αξιολόγηση (BBCH 81, αρχή ωρίμανσης). Τα επόμενα πιο αποτελεσματικά σκευάσματα ήταν το Septum και το Terranum τόσο στη σοβαρότητα όσο και στην ένταση της ασθένειας στην τελευταία αξιολόγηση (BBCH 81, αρχή ωρίμανσης).

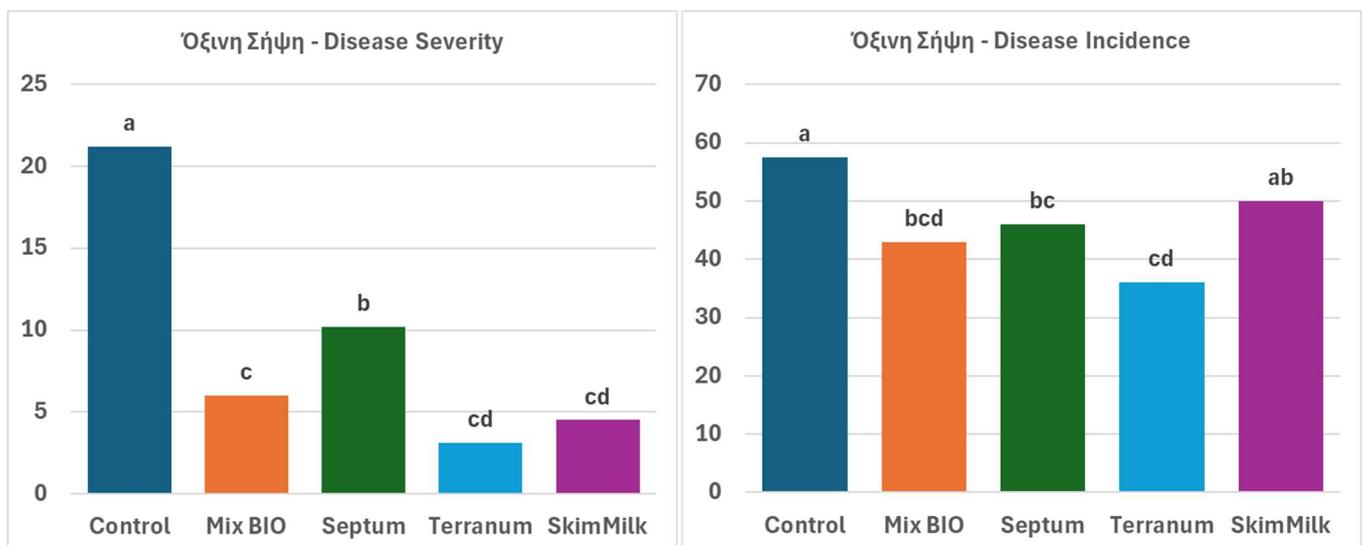
Στους **βότρεις**, το Mix BIO, το Terranum και το Skim Milk έδειξαν την υψηλότερη αποτελεσματικότητα μεταξύ των σκευασμάτων τόσο στη σοβαρότητα όσο και στην ένταση της ασθένειας στην τελευταία αξιολόγηση (BBCH 81, αρχή ωρίμανσης) και ακουλούθησε το Skim Milk (**Γράφημα 4.5.7-2**).



**Γράφημα 4.5.7-2:** Αξιολόγηση βιολογικών σκευασμάτων ως προς τη σοβαρότητα και ένταση του ωιδίου σε βότρες αμπέλου ποικιλίας Crimson. Οι στήλες αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο 40 πρέμνων.

### Μαύρη σήψη

Τα πρώτα συμπτώματα της μαύρης σήψης εμφανίστηκαν στους βότρες στις 26/8/2024, στο BBCH 83 (αλλαγή χρώματος ραγών), με 1,1% σοβαρότητα και 14,0% ένταση της ασθένειας στους μάρτυρες. Η ασθένεια συνέχισε να αυξάνεται κατά τη διάρκεια της καλλιεργητικής περιόδου και έφτασε στο 21,2% ως προς τη σοβαρότητα και στο 57,5% ως προς την ένταση της ασθένειας στην τελευταία αξιολόγηση στις 13/9/2024 (BBCH 85, softening of berries). Όλες οι εφαρμογές με τα βιολογικά σκευάσματα μείωσαν τη σοβαρότητα καθώς και την ένταση της ασθένειας στους βότρες σε σύγκριση με τον μάρτυρα. Ωστόσο, καταγράφηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των σκευασμάτων ως προς το επίπεδο αποτελεσματικότητας κατά της όξινης σήψης (**Γράφημα 4.5.7-3**).



**Γράφημα 4.5.7-3:** Αξιολόγηση βιολογικών σκευασμάτων ως προς τη σοβαρότητα και ένταση της όξινης σήψης σε βότρες αμπέλου ποικιλίας Crimson. Οι στήλες αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο 40 πρέμνων.

Στους βότρες, το Mix BIO, το Terranum και το Skim Milk έδειξαν την υψηλότερη αποτελεσματικότητα στη σοβαρότητα της ασθένειας και ακολουθούσε το Septum. Όλα τα σκευάσματα μείωσαν την ένταση της μαύρης σήψης από 13% (Skim Milk) έως 37% (Terranum).

## **Πείραμα 2. Αξιολόγηση νέων υπό ανάπτυξη βιολογικών σκευασμάτων με βάση βακτήρια και ζύμες έναντι των φυτοπαθογόνων μυκήτων *Botrytis cinerea* και *Aspergillus flavus***

### ***In vitro* αξιολόγηση της ανταγωνιστικής ικανότητας στελεχών ζυμών και βακτηρίων ως προς την ανάπτυξη του μύκητα *Botrytis cinerea***

Αρχικά, τα στελέχη βακτηρίων και ζυμών (**Πίνακας 4.5.7-1**) αξιολογήθηκαν με βάση τη μέτρηση της ακτίνας του μυκηλίου του *B. cinerea* ως προς το αξιολογούμενο κάθε φορά στέλεχος, στο τρυβλίο, στη διπλή καλλιέργεια, μεταξύ της κάθε επέμβασης/στελέχους και του φυτοπαθογόνου μύκητα. Τα τρυβλία ελέγχονταν οπτικά κάθε ημέρα μετά τον ενοφθαλμισμό του κάθε τρυβλίου (petri dish 9 cm.) με το μύκητα και έπειτα από 7 ημέρες, διαπιστωνόταν η ύπαρξη ή μη ζώνης παρεμπόδισης. Επιπλέον, κάθε ημέρα από τη 2<sup>η</sup> έως την 5<sup>η</sup> ημέρα μετά από τον εμβολιασμό του τρυβλίου με τον μύκητα, γινόταν μέτρηση της ακτίνας του μυκηλίου του βοτρυτή, ως προς το αξιολογούμενο στέλεχος βακτηρίου ή ζύμης κάθε φορά.

Στις εικόνες που ακολουθούν, παρουσιάζονται φωτογραφίες από τα τρυβλία με τις αποτελεσματικές καλλιέργειες των υπό αξιολόγηση στελεχών βακτηρίων και ζυμών, ως προς τη βιολογική τους δράση και ενδεχόμενης παρεμπόδισης τους ενάντια στο μύκητα *B. cinerea* (**Εικόνα 4.5.7-13 - Εικόνα 4.5.7-15**).



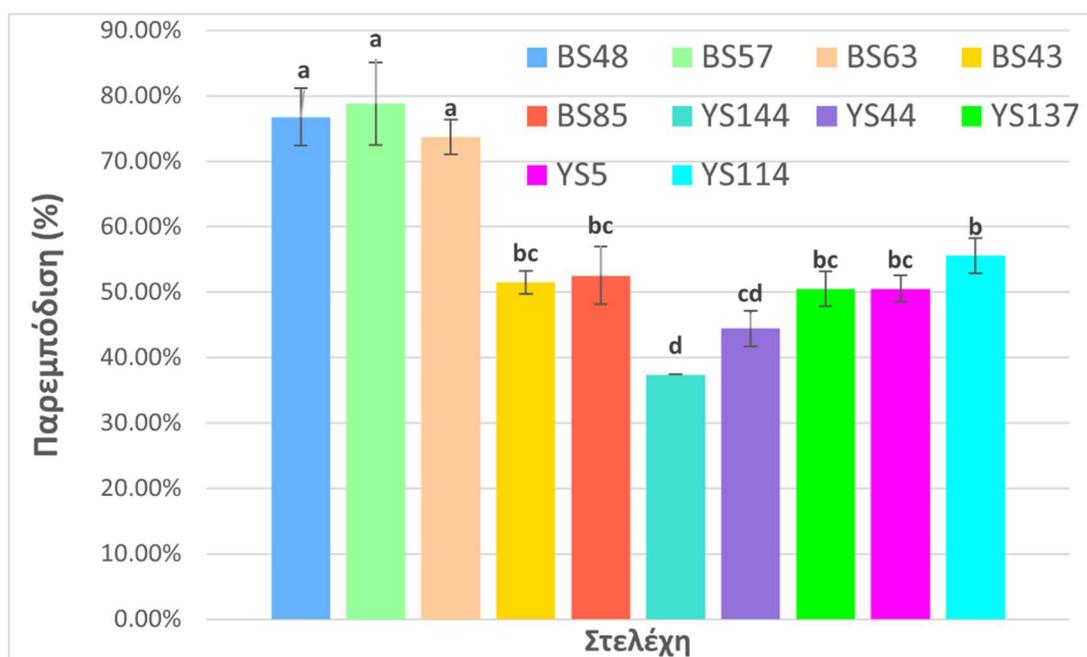
**Εικόνα 4.5.7-13.** Τρυβλία με στελέχη βακτηρίων, τα οποία εμφάνισαν ισχυρή ανταγωνιστική ικανότητα ενάντια στο *Botrytis cinerea*, με δημιουργία ζώνης παρεμπόδισης.



**Εικόνα 4.5.7-14:** Τρυβλία με στελέχη ζυμών, τα οποία εμφάνισαν μικρότερης ισχύος ανταγωνιστική ικανότητα ενάντια στο *Botrytis cinerea*, με πιο περιορισμένη ζώνη παρεμπόδισης (YS144) ή χαρακτηριστικά η ανάπτυξη του μυκηλίου του μύκητα σταματούσε στο σημείο που ερχόταν σε επαφή με τις αποικίες τους (YS44, YS5).



**Εικόνα 4.5.7-15:** Αρνητικός μάρτυρας (mock). Τα τρυβλία έχουν εμβολιαστεί μόνο με το μύκητα *Botrytis cinerea*.

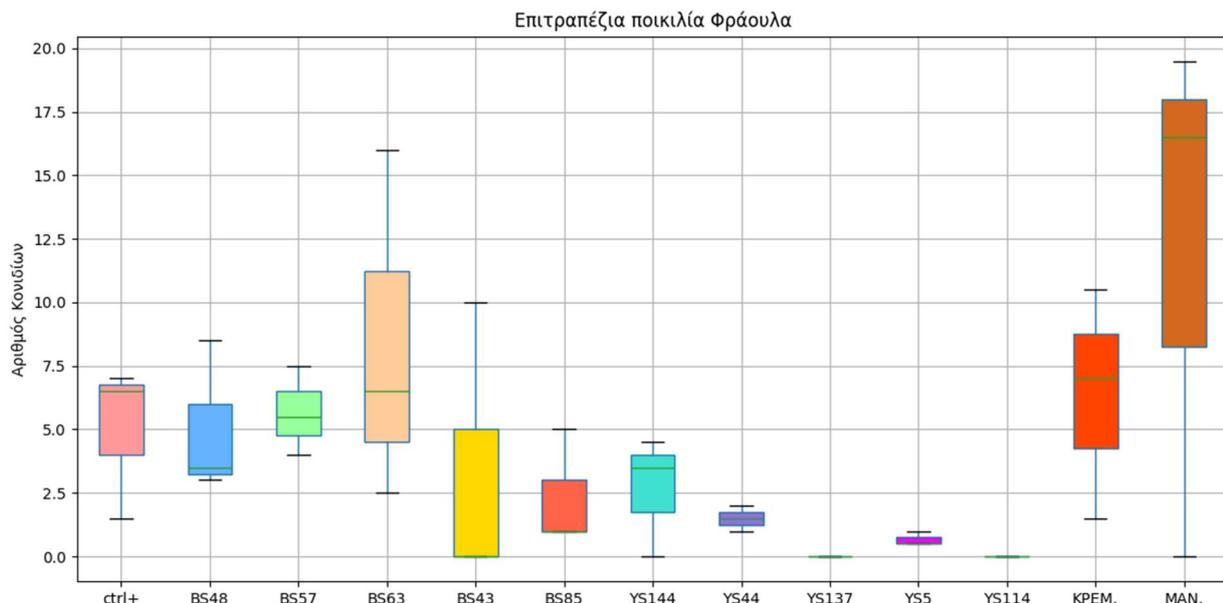


**Γράφημα 4.5.7-4:** Ποσοστά παρεμπόδισης που επέδειξαν όλες οι απομονώσεις βακτηρίων και ζυμών που εξετάστηκαν στο *in vitro* πείραμα ανταγωνισμού σε διπλές καλλιέργειες.

Αρχικά, θα πρέπει να αναφερθεί πως το ποσοστό αναστολής, που επιτυγχάνουν το σύνολο των αξιολογούμενων ωφέλιμων βακτηρίων και ζυμών έναντι του βοτρυτή υπερβαίνει και κυμαίνεται πολύ πιο πάνω από 20%, ποσοστό που θεωρείται ότι ο μύκητας αναστέλλεται δραστικά. Συμπεραίνεται ότι το σύνολο των επεμβάσεων κρίνεται ιδιαίτερα αποτελεσματικό, ως προς την παρεμπόδιση της μυκηλιακής ανάπτυξης του βοτρυτή *in vitro*. Ειδικότερα, στη συγκεκριμένη περίπτωση των διπλών καλλιεργειών, χωρίς την παρεμβολή ενός ξενιστή, με την πιο άμεση αλληλεπίδραση ωφέλιμων μικροοργανισμών-βοτρυτή, παρατηρείται πως τα υψηλότερα ποσοστά παρεμπόδισης καταγράφονται από τα βακτηριακά στελέχη. Έτσι, αποδεικνύεται πως τα βακτηριακά στελέχη επιτυγχάνουν αξιόλογη παρεμπόδιση της μυκηλιακής ανάπτυξης του βοτρυτή επί του τρυβλίου, με ποσοστά που κυμαίνονται από 50-80%, σε σύγκριση με τις ζύμες όπου τα αντίστοιχα ποσοστά παρεμπόδισης κυμαίνονται από 40-55% (**Εικόνα 4.5.7-13, Γράφημα 4.5.7-4**). Αξιοσημείωτο είναι ότι, παρότι τα βακτηριακά στελέχη BS57 και BS63 εμφάνισαν τη μικρότερη αποτελεσματικότητα, στο σύνολο των μελετούμενων χαρακτηριστικών στις δοκιμές σε ράγες των επιτραπέζιων ποικιλιών, παρουσίασαν από τα υψηλότερα ποσοστά αναστολής της μυκηλιακής ανάπτυξης του *Botrytis cinerea* στο *in vitro* πείραμα. Σταθερά ικανοποιητικά ποσοστά παρεμπόδισης από 53-77% επέδειξαν και τα βακτηριακά στελέχη BS85 και BS48, τα οποία αξιολογήθηκαν ως και τα πιο αποτελεσματικά (στο σύνολο των βακτηριακών επεμβάσεων) ως προς τη μείωση της σοβαρότητας της τεφράς σήψης στα *ex vivo* πειράματα στις ράγες.

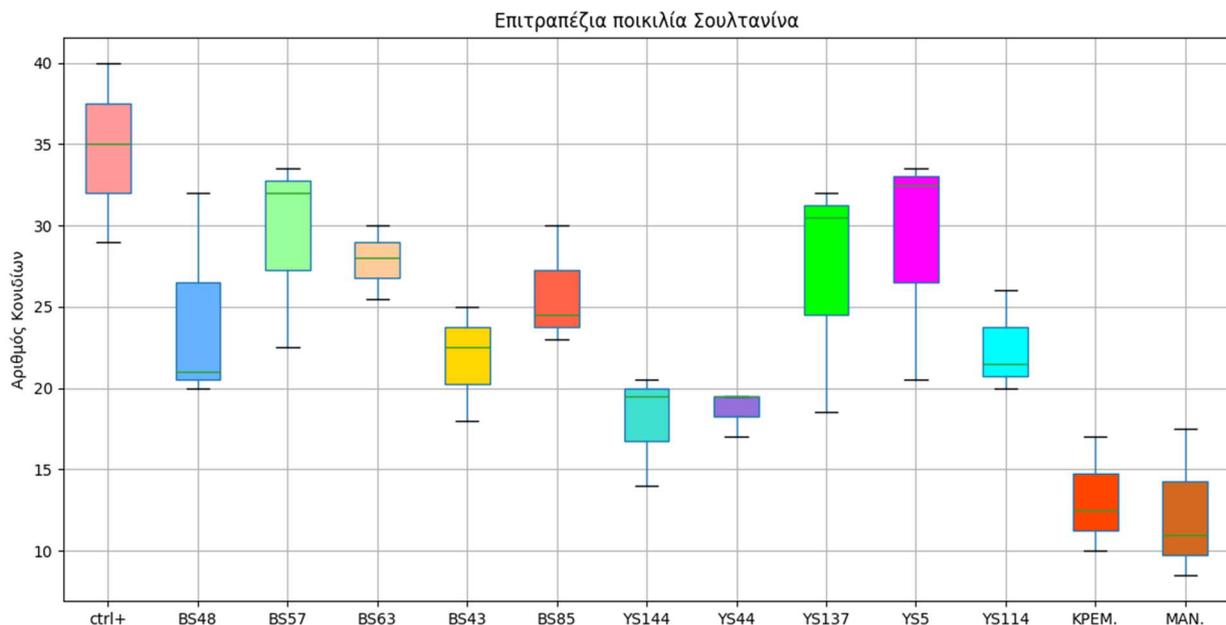
## Αξιολόγηση της επίδρασης των απομονώσεων βακτηρίων, ζυμών και κομποστοποιημένων προϊόντων στην παραγωγή κονιδίων και της σοβαρότητας της τεφράς σήψης

Η παραγωγή κονιδίων ανά καρπό πραγματοποιήθηκε κατά την τελευταία ημέρα μετά τη μόλυνση και ανά ξενιστή του παθογόνου. Οι επεμβάσεις των ζυμών οδήγησαν σε μικρότερο παραγόμενο αριθμό κονιδίων του βοτρυτή ανά καρπό και στους 2 ξενιστές (επιτραπέζιες ποικιλίες αμπέλου, τοματίνι), σε σχέση με τα βακτηριακά στελέχη. Όσον αφορά τη χρήση των κομποστοποιημένων προϊόντων IKORGANIC τα αποτελέσματα στη συγκεκριμένη περίπτωση είναι αμφίσημα, αφού στον ξενιστή της ποικιλίας Σουλτανίνα παρατηρήθηκε η μικρότερη παραγωγή κονιδίων απ' όλες τις επεμβάσεις. Αντιθέτως, στις αντίστοιχες επεμβάσεις στην επιτραπέζια ποικιλία αμπέλου Φράουλα παρατηρήθηκε η μεγαλύτερη παραγωγή κονιδίων, σε βαθμό μάλιστα που υπερέβη τον αντίστοιχο παραγόμενο αριθμό κονιδίων που αντιστοιχούσαν στο μάρτυρα (**Γράφημα 4.5.7-5**). Ενδεχομένως, οι διαφορετικές συνθήκες εκτέλεσης των δύο πειραμάτων, και ειδικότερα ο τρόπος της τεχνητής μόλυνσης να επέδρασαν στο συγκεκριμένο αποτέλεσμα, αφού στο μεν πείραμα της ποικιλίας «Σουλτανίνα», έγινε έγχυση του μολυσματικού διαλύματος επί τεχνητής οπής στη ράγα, ενώ στο αντίστοιχο της ποικιλίας «Φράουλα» έγινε ψεκασμός του διαλύματος χωρίς πρότερη πρόκληση πληγής. Επίσης, στο πείραμα της ποικιλίας Σουλτανίνα μετά το στάδιο της απολύμανσης τους, σε πολλές ράγες προκλήθηκε επιπλέον «φυσικό άνοιγμα», που πιθανόν να ευνόησε την πιο γρήγορη εγκαθίδρυση και κατ' επέκταση αποικισμό των αξιολογούμενων βιολογικών παραγόντων σε βάρος του βοτρυτή (**Γραφήματα 4.5.7-5-4.5.7-7**).

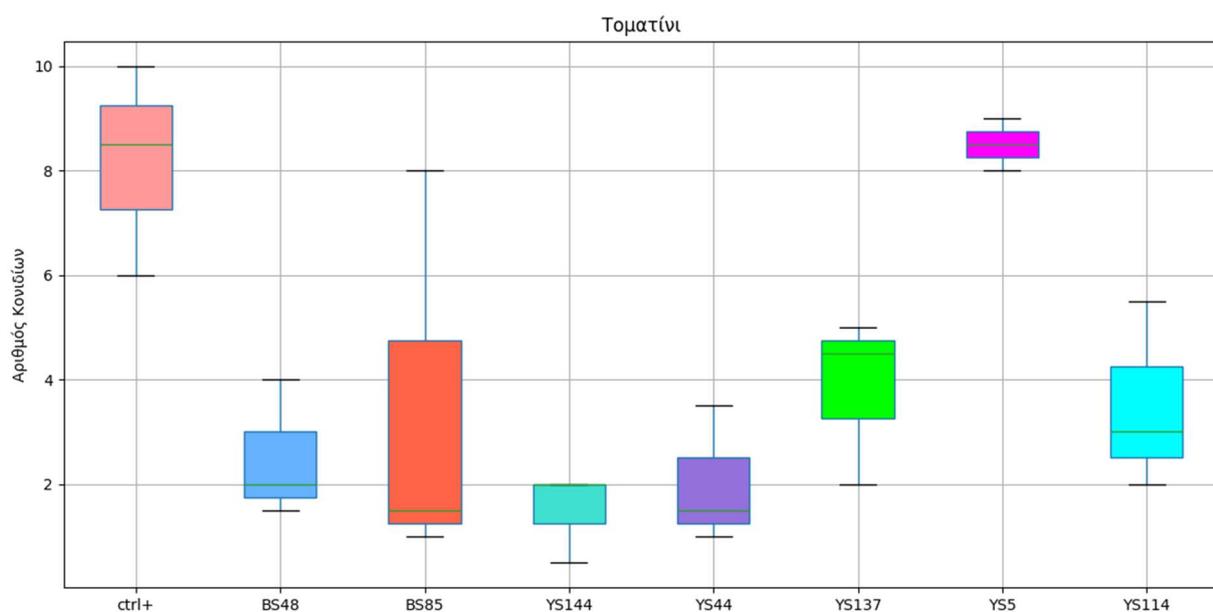


**Γράφημα 4.5.7-5:** Αριθμός κονιδίων/ράγα 11 ημέρες μετά την μόλυνση με τον μύκητα *B. cinerea*. Κάθε θηκόγραμμα αντιπροσωπεύει την κατανομή του μέσου όρου των κονιδίων, 24 ραγών αμπέλου ποικιλίας **Φράουλας**. Εντός του boxplot η κεντρική πράσινη γραμμή αντιπροσωπεύει τη διάμεσο, τα όρια του δείχνουν το 25°

και 75<sup>ο</sup> εκατοστημόριο, και οι γραμμές (whiskers) εκτείνονται μέχρι τις ελάχιστες και μέγιστες τιμές εντός 1,5 φορές του εύρους μεταξύ των τεταρτημορίων (IQR).



**Γράφημα 4.5.7-6:** Αριθμός κονιδίων/καρπό 8 ημέρες μετά την μόλυνση με τον μύκητα *B. cinerea*. Κάθε θηκόγραμμα αντιπροσωπεύει την κατανομή του μέσου όρου των κονιδίων, 24 ραγών Σουλτανίνας. Εντός του boxplot η κεντρική πράσινη γραμμή αντιπροσωπεύει τη διάμεσο, τα όρια του δείχνουν το 25<sup>ο</sup> και 75<sup>ο</sup> εκατοστημόριο, και οι γραμμές (whiskers) εκτείνονται μέχρι τις ελάχιστες και μέγιστες τιμές εντός 1,5 φορές του εύρους μεταξύ των τεταρτημορίων (IQR).

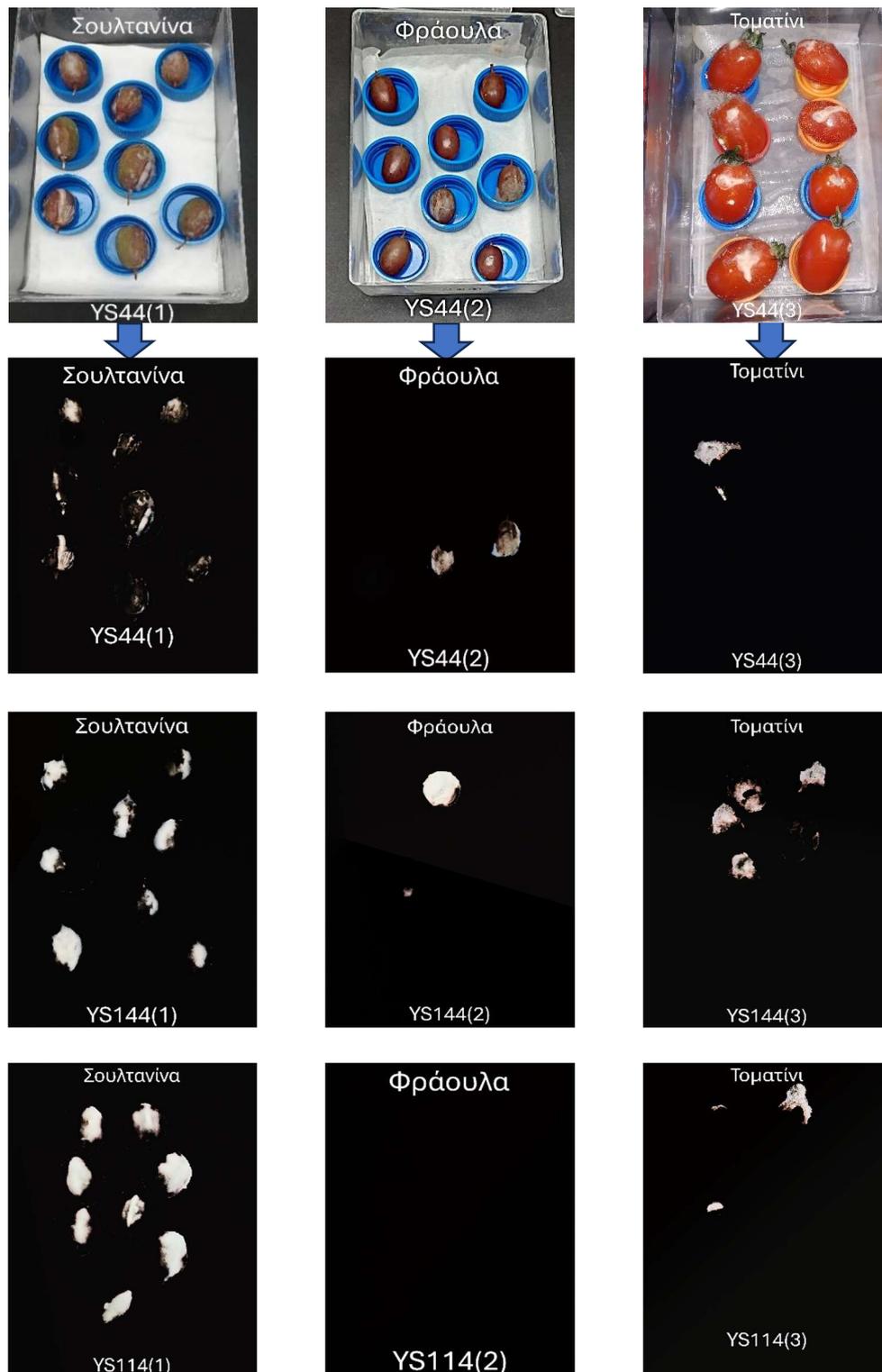


**Γράφημα 4.5.7-7:** Αριθμός κονιδίων/καρπό 14 ημέρες μετά την μόλυνση με τον μύκητα *B. cinerea*. Κάθε θηκόγραμμα αντιπροσωπεύει την κατανομή του μέσου όρου των κονιδίων, από 24 **τοματίνια**. Εντός του boxplot η κεντρική πράσινη

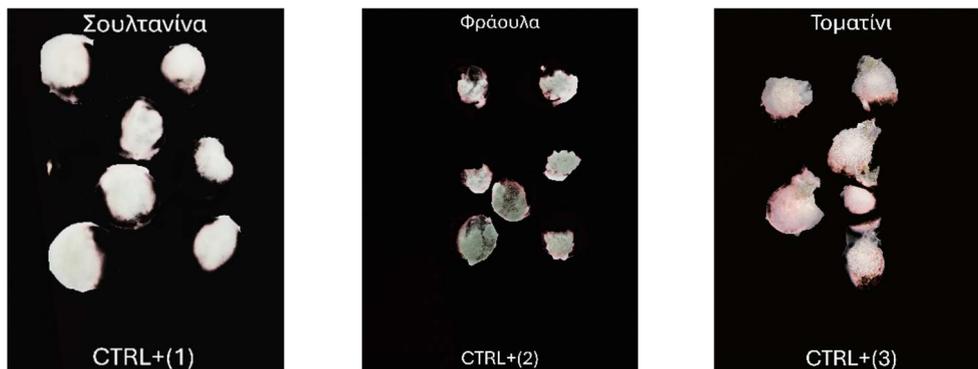
γραμμή αντιπροσωπεύει τη διάμεσο, τα όρια του δε το 25<sup>ο</sup> και 75<sup>ο</sup> εκατοστημόριο, και οι γραμμές (whiskers) εκτείνονται μέχρι τις ελάχιστες και μέγιστες τιμές εντός 1,5 φορές του εύρους μεταξύ των τεταρτημορίων (IQR).

### Εξέλιξη σοβαρότητας ασθένειας

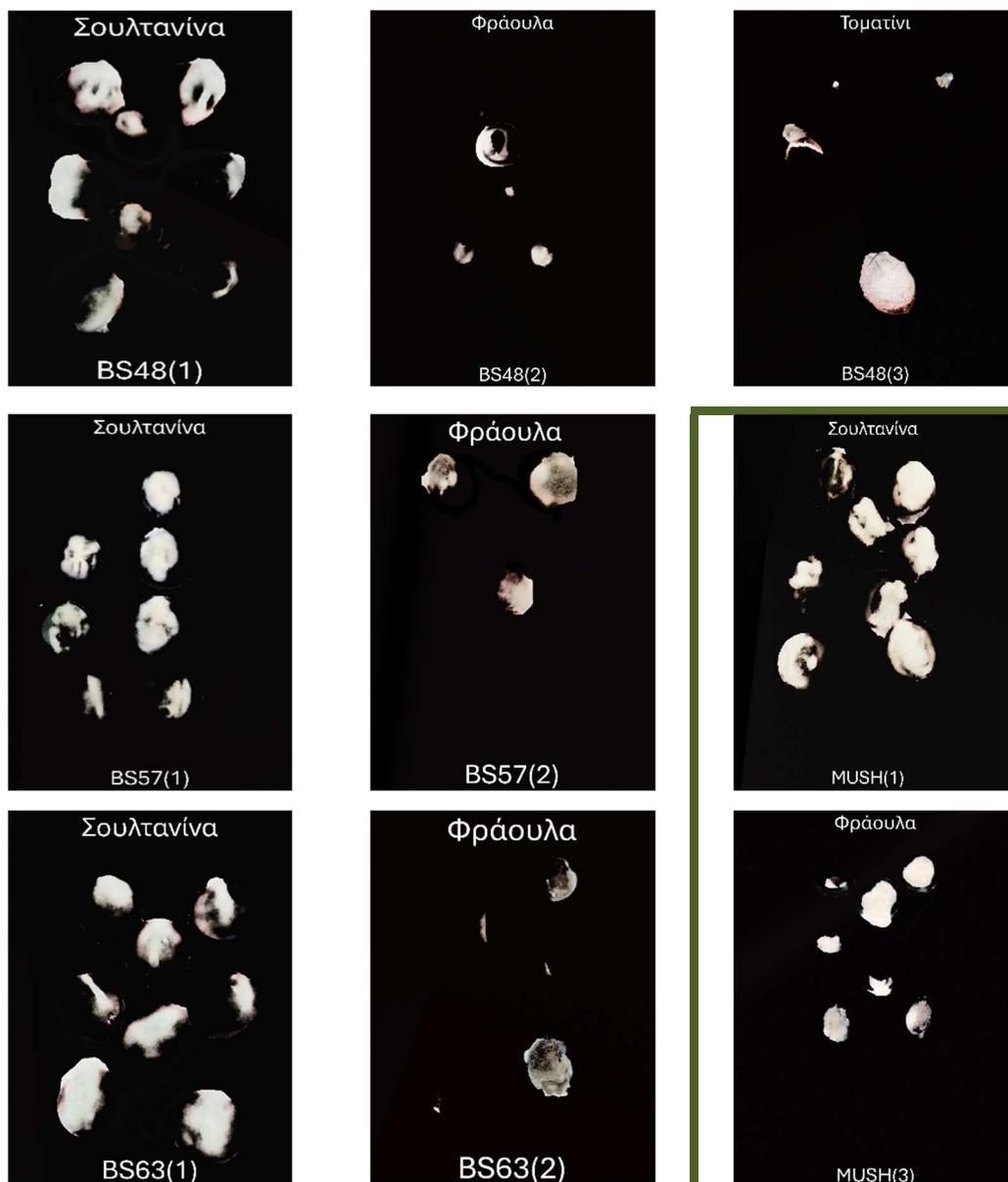
Προκειμένου να αξιολογηθεί η εξέλιξη της σοβαρότητας ασθένειας (Disease Severity) για κάθε βιολογικό παράγοντα, προηγήθηκε μια διαδικασία επεξεργασίας εικόνων, με σκοπό την ποσοτικοποίηση των συμπτωμάτων της ασθένειας. Συγκεκριμένα, μέσω της εφαρμογής binary mask του προγράμματος επεξεργασίας εικόνας Adobe Photoshop<sup>®</sup> απομονώθηκαν μόνο οι ράγες σταφυλιών/τοματίνια αντίστοιχα. Το φόντο αντικαταστάθηκε με μαύρο χρώμα προκειμένου να διευκολυνθεί η αντίθεση των περιοχών μόλυνσης. Στη συνέχεια, εφαρμόστηκαν ρυθμίσεις αντίθεσης και φωτεινότητας ώστε να αναδειχθούν τα σημεία προσβολής από τον μύκητα *Botrytis cinerea*, εκμεταλλευόμενοι τη διαφορά φωτεινότητας μεταξύ υγιούς και μολυσμένου ιστού (τεχνική αντίθεσης φάσης). Τέλος, τα λευκά σημεία του μυκηλίου απομονώθηκαν μέσω thresholding, και με χρήση των εργαλείων ανάλυσης εικόνας (Image Analysis Tools), υπολογίστηκε η συνολική προσβεβλημένη επιφάνεια (σε cm<sup>2</sup>) ανά υγρό θάλαμο. Σε αυτή τη μορφή παρατίθενται παρακάτω αντιπροσωπευτικά τόσο κάποια από τα πιο ανταγωνιστικά στελέχη, όσο και λιγότερο ανταγωνιστικά, ως προς την παρεμπόδιση της μυκηλιακής ανάπτυξης του βοτρώτη *in planta*, μεταξύ των ξενιστών του (**Εικόνες 4.5.7-16 - 4.5.7-18**).



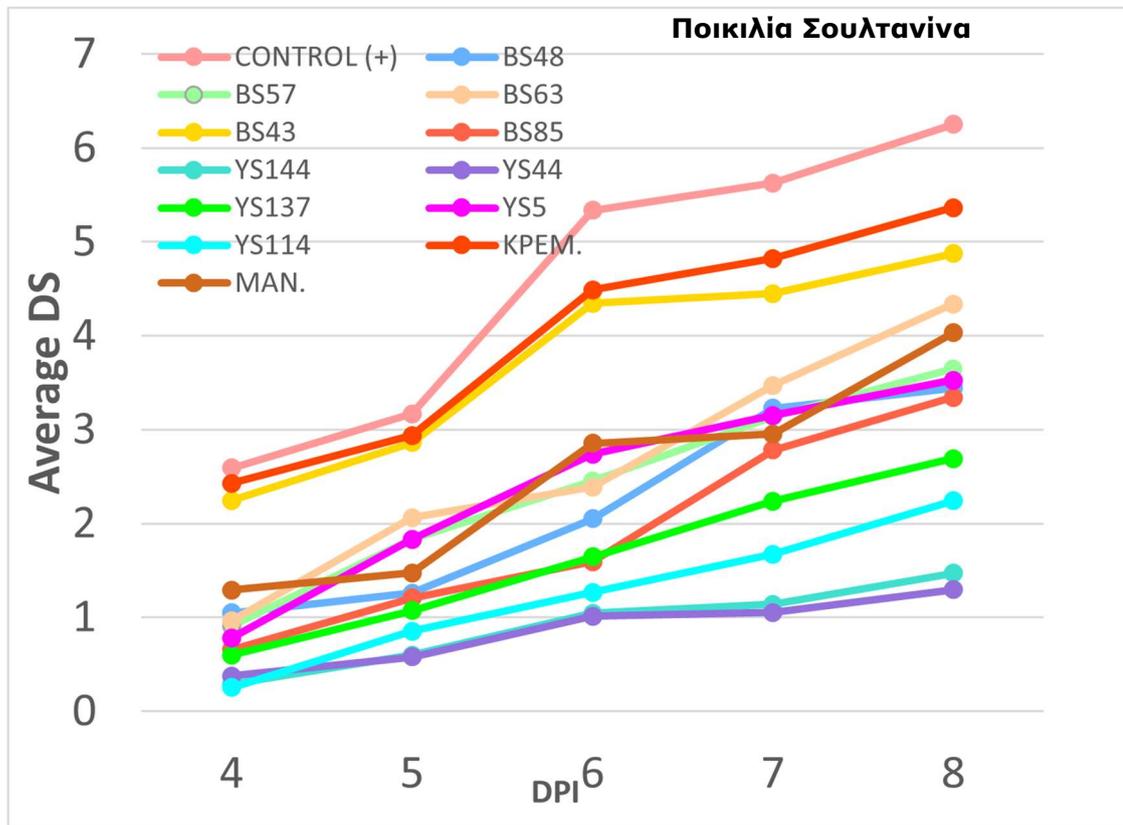
**Εικόνα 4.5.7-16:** Φωτογραφίες *ex vivo* πειράματος. Στελέχη ζυμών που επέδειξαν ανταγωνιστικό πλεονέκτημα έναντι της εκδήλωσης συμπτωμάτων και της ανάπτυξης του μυκηλίου του βοτρυτή επί των καρπών και των 2 ξενιστών. Οι φωτογραφίες έχουν επεξεργαστεί και μετατραπεί σε ασπρόμαυρη κλίμακα, αντίθετης φάσης για ανάδειξη και εντοπισμό της προσβεβλημένης επιφάνειας του καρπού.



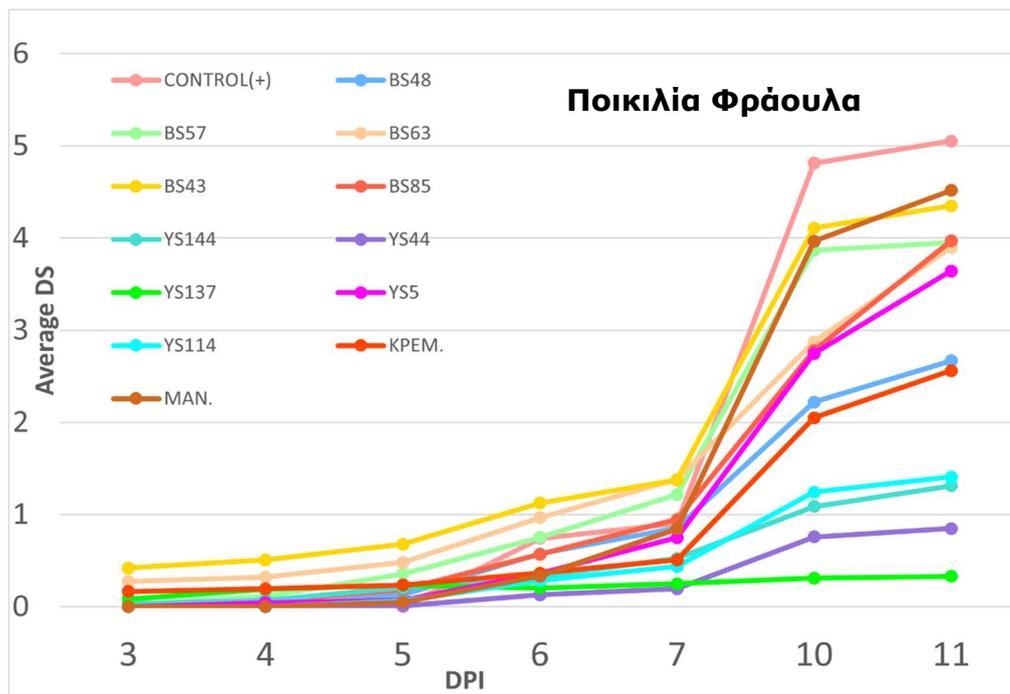
**Εικόνα 4.5.7-17:** Θετικός μάρτυρας - Καρποί μολυσμένοι με το μύκητα *B. cinerea*



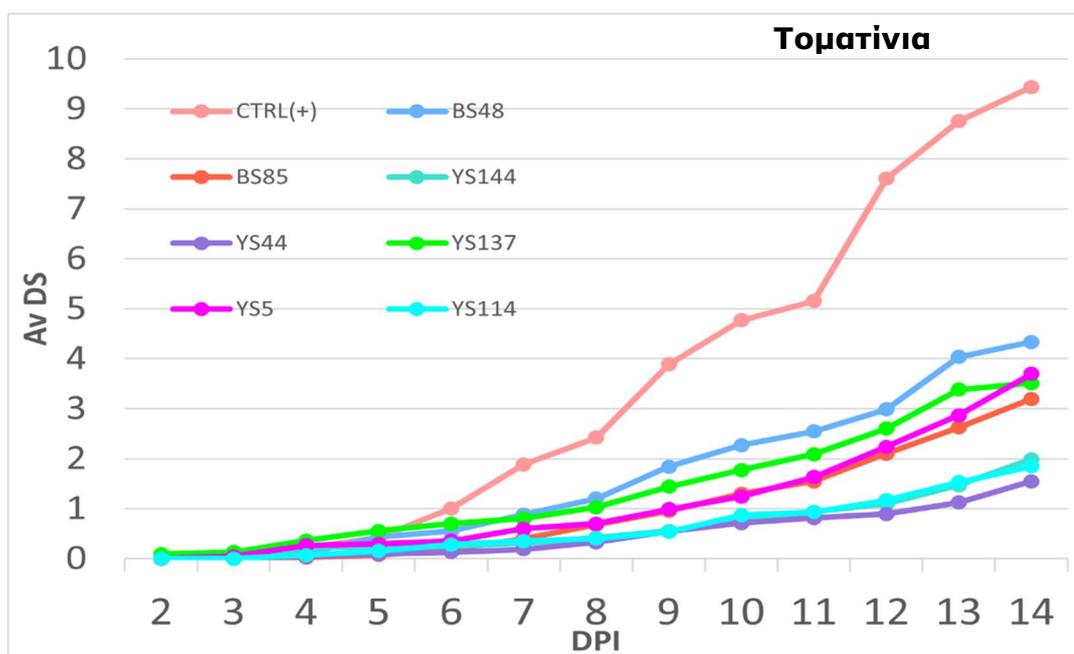
**Εικόνα 4.5.7-18:** Φωτογραφίες ex vivo πειράματος. Στελέχη βακτηρίων και κομπόστ που επέδειξαν ισχύρο ανταγωνιστικό πλεονέκτημα έναντι της ανάπτυξης του μυκηλίου του βοτρυτή επί των καρπών και των 2 ξενιστών.



**Γράφημα 4.5.7-8:** *Ex vivo* αξιολόγηση των στελεχών βακτηρίων και ζυμών και των κομποστοποιημένων προϊόντων που εφαρμόστηκαν ως προς την αντιμετώπιση του μύκητα *B. cinerea*, σε ράγες ποικιλίας **Σουλτανίνας**. Στο γράφημα απεικονίζεται η καμπύλη εξέλιξης της σοβαρότητας της ασθένειας για κάθε μία από τις εφαρμογές, υπολογίζοντας το ποσοστό μόλυνσης ανά καρπό για την αξιολόγηση της προσβεβλημένης επιφάνειας των ραγών. Τα χρονικά σημεία για κάθε εφαρμογή αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο 24 ραγών (τρεις επαναλήψεις με 8 ράγες ανά επανάληψη και εφαρμογή).



**Γράφημα 4.5.7-9:** *Ex vivo* αξιολόγηση επιλεγμένων στελεχών βακτηρίων και ζυμών και των κομποστοποιημένων προϊόντων που εφαρμόστηκαν ως προς την αντιμετώπιση του μύκητα *B. cinerea*, σε ράγες ποικιλίας **Φράουλας**. Στο γράφημα απεικονίζεται η καμπύλη εξέλιξης της σοβαρότητας της ασθένειας για κάθε μία από τις εφαρμογές, υπολογίζοντας το ποσοστό μόλυνσης ανά καρπό για την αξιολόγηση της προσβεβλημένης επιφάνειας των ραγών. Τα χρονικά σημεία για κάθε εφαρμογή αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο 24 ραγών (τρεις επαναλήψεις με 8 ράγες ανά επανάληψη και εφαρμογή).



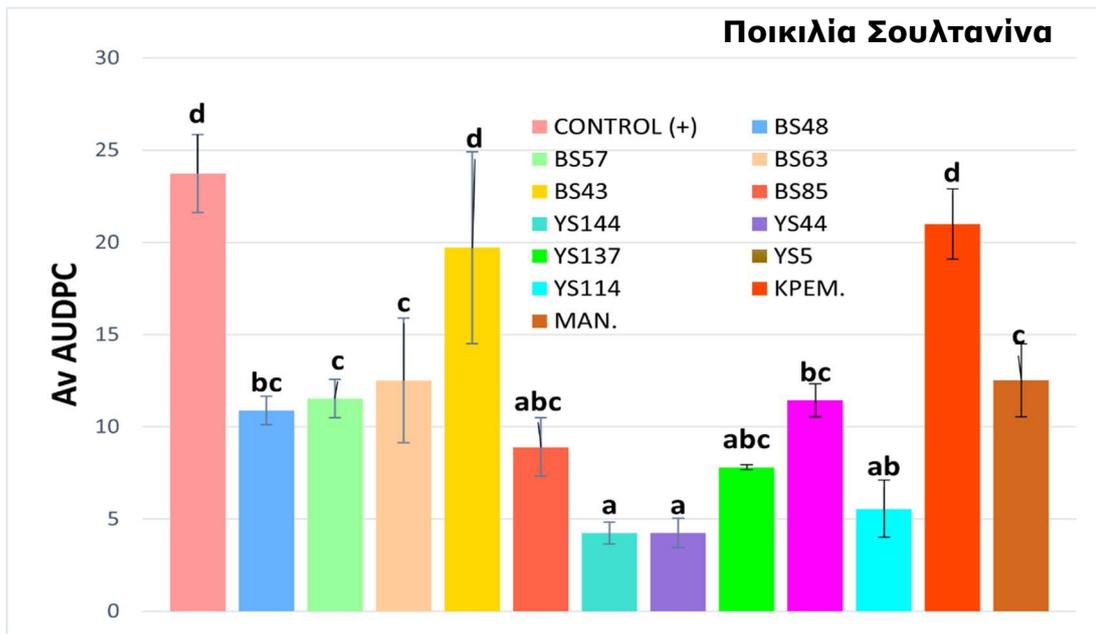
**Γράφημα 4.5.7-10:** *Ex vivo* αξιολόγηση των στελεχών βακτηρίων και ζυμών σε **τοματίνια** ποικιλίας Lobelo για την αντιμετώπιση του μύκητα *B. cinerea*). Στο γράφημα απεικονίζεται η καμπύλη εξέλιξης της σοβαρότητας της ασθένειας για κάθε μία από τις εφαρμογές, υπολογίζοντας το ποσοστό μόλυνσης ανά καρπό για την αξιολόγηση της προσβεβλημένης επιφάνειας στα τοματίνια. Τα χρονικά σημεία για κάθε εφαρμογή αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο 24 καρπών (τρεις επαναλήψεις με 8 τοματίνια ανά επανάληψη και εφαρμογή).

Στο *ex vivo* πείραμα της επιτραπέζιας ποικιλίας «Σουλτανίνα» παρατηρήθηκε πολύ πιο ραγδαία εξέλιξη της σοβαρότητας της ασθένειας (από τις πρώτες κιόλας ημέρες μετά τη μόλυνση), εφόσον όπως έχει αναφερθεί στις ράγες συνυπήρχαν τόσο οπές που προκλήθηκαν από τη διαδικασία της απολύμανσης όσο και τεχνητές που προκλήθηκαν για τη μόλυνση. Αντιθέτως, στο πείραμα της επιτραπέζιας ποικιλίας «Φράουλα» η επί μέρους δράση των βιολογικών παραγόντων έναντι της μυκηλιακής ανάπτυξης του βοτρυτή αναδείχθηκε από την 7<sup>η</sup> ημέρα μετά τη μόλυνση και έπειτα, απόρροια και του τρόπου μόλυνσης με ψεκάσμο του μολύσματος, χωρίς τη δημιουργία τεχνητής οπής όπως στην περίπτωση της Σουλτανίνας. Οι τεχνικές διαφορές που ήδη έχουν τονιστεί μεταξύ των αναφερθέντων πειραμάτων μπορούν να ερμηνεύσουν τις παραπάνω παρατηρήσεις. Με την οπτικοποίηση της σοβαρότητας της εξέλιξης της ασθένειας αποδείχθηκε αυτό που μακροσκοπικά με την οπτική παρατήρηση ήταν έκδηλο, ότι δηλαδή στα στελέχη των ζυμών αποδόθηκαν τα λιγότερα ποσοστά προσβολών ανά καρπό, παρεμποδίζοντας αποτελεσματικά τη μυκηλιακή ανάπτυξη του βοτρυτή και στις 2 επιτραπέζιες ποικιλίες σταφυλιών. Στο ίδιο μήκος κύματος με τα αποτελέσματα του

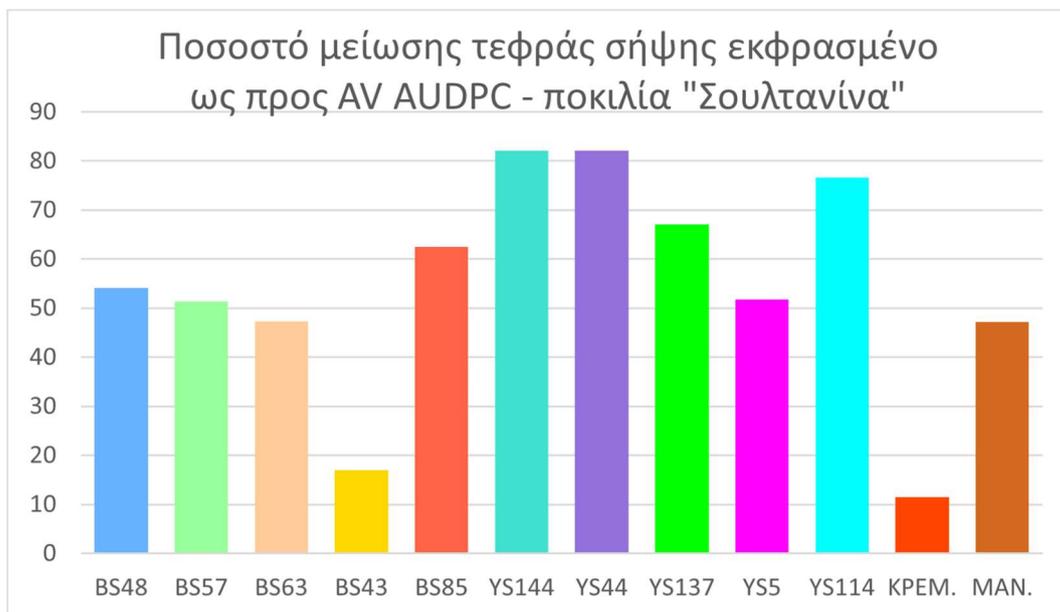
αριθμού κονιδίων ανά καρπό κατά την τελευταία ημέρα μετά τη μόλυνση, η υπόθεση εργασίας πως τα πιο αποτελεσματικά στελέχη ζυμών και βακτηρίων έναντι του βοτρύτη στον ξενιστή σταφύλι θα επιδείξουν παρόμοια αποτελεσματικότητα και σε δεύτερο ξενιστή (τοματίνι) επιβεβαιώνεται πλήρως και ως προς την μελετώμενη παράμετρο της εξέλιξης της σοβαρότητας της ασθένειας της τεφράς σήψης στα τοματίνια (**Γραφήματα 4.5.7-8-4.5.7-10**).

### **Συνολική Σοβαρότητα Ασθένειας (Disease Severity) εκφρασμένη ως AUDPC**

Οι λιγότερο αποτελεσματικές επεμβάσεις στην *ex vivo* παρεμπόδιση της ανάπτυξης του μυκηλίου επί των ραγών της ποικιλίας «Σουλτανίνας» (**Γράφημα 4.5.7-11**) ήταν αυτές των βακτηρίων και του κομποστοποιημένου προϊόντος κρεμμυδιού. Χαρακτηριστικά ο μάρτυρας, οι επεμβάσεις με το βακτήριο BS 43 καθώς και με το κομπόστ κρεμμυδιού δε διέφεραν στατιστικά σημαντικά ( $P < 0,05$ ), με το ποσοστό μείωσης της ασθένειας να αντιστοιχεί σε 17% και 11,5% αντίστοιχα. Την αμέσως λιγότερο αποτελεσματική τριάδα, που δε διέφεραν στατιστικά σημαντικά, συμπληρώνουν τα βακτηριακά στελέχη BS 57, BS 63 και το κομπόστ μανιταριού, με τα αντίστοιχα ποσοστά μείωσης της τεφράς σήψης να είναι 51% και 47% αντίστοιχα. Αντιθέτως, οι πιο αποτελεσματικές επεμβάσεις (που δε διέφεραν και στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους) είναι αυτές των ζυμών και ειδικότερα αυτές των στελεχών **YS 44 και YS 144**, όπου αμφότερες σημείωσαν το ίδιο **υψηλό ποσοστό μείωσης της τεφράς σήψης**, ίσο με **82%**, ενώ την τριάδα των πιο αποτελεσματικών επεμβάσεων συμπλήρωσε η ζύμη YS 114 επιτυγχάνοντας μείωση της ασθένειας κατά 77%. Συνοψίζοντας, όπως γίνεται αντιληπτό τόσο η οπτικοποίηση της συνολικής μείωσης της ασθένειας εκφρασμένης ως προς AUDPC, όσο και η στατιστική ανάλυση επέτρεψε την κατηγοριοποίηση της αποτελεσματικότητας του βιοελέγχου των επεμβάσεων μας σε 3 κατηγορίες: (α) υψηλή (στελέχη ζυμών – YS 44, YS 144, YS 114-), (β) μέτρια (βακτηριακά στελέχη - BS 57, BS 63 και το κομπόστ μανιταριού -) και (γ) χαμηλή (κομπόστ κρεμμυδιού, βακτηριακά στελέχη – BS 43 -) (**Γράφημα 4.5.7-12**).

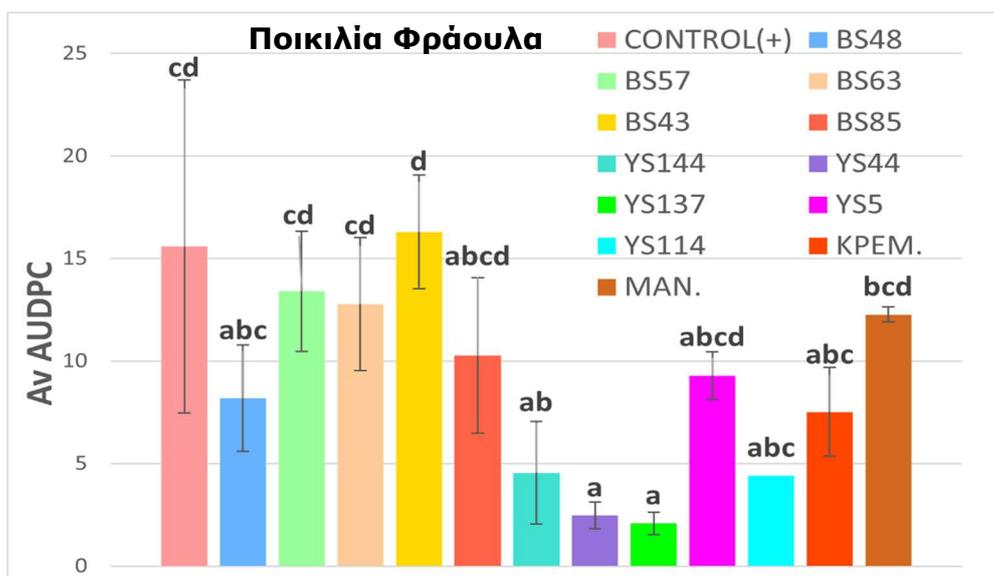


**Γράφημα 4.5.7-11:** *Ex vivo* αξιολόγηση των στελεχών βακτηρίων και ζυμών και των κομποστοποιημένων προϊόντων που εφαρμόστηκαν ως προς την αντιμετώπιση του μύκητα *B. cinerea*, σε ράγες **Σουλτανίνας**. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως η σχετική περιοχή κάτω από την καμπύλη προόδου της ασθένειας (AUDPC). Οι στήλες αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο 24 ραγών (3 επαναλήψεις με 8 ράγες ανά επανάληψη και εφαρμογή) Οι κάθετες γραμμές συμβολίζουν το τυπικό σφάλμα. Οι στήλες με διαφορετικά γράμματα διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους, σύμφωνα με το LSD multiple range test με  $P < 0,05$

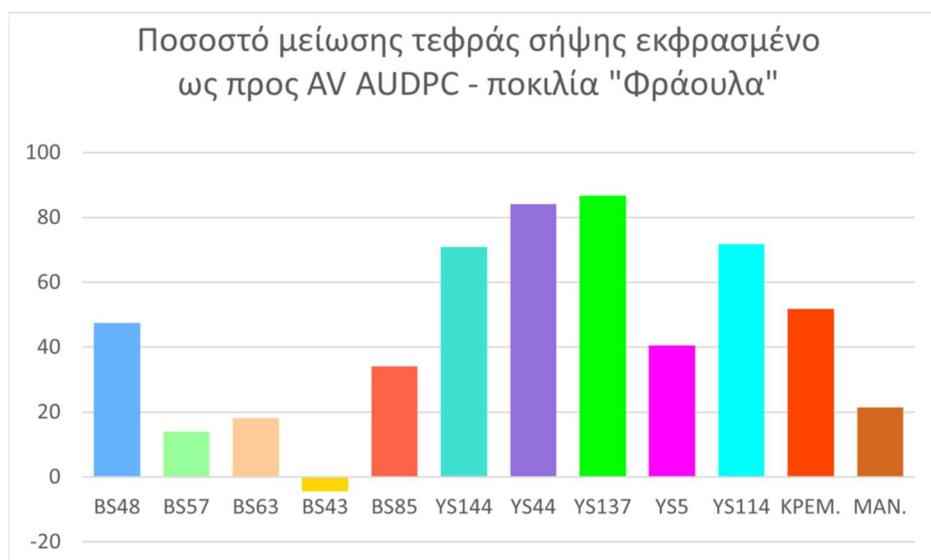


**Γράφημα 4.5.7-12:** Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως η σχετική περιοχή κάτω από την καμπύλη προόδου της ασθένειας (AUDPC) κάθε επέμβασης σε σχέση με την αντίστοιχη του μάρτυρα. Οι στήλες αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο 24 ραγών (3 επαναλήψεις με 8 ράγες ανά επανάληψη και εφαρμογή).

Κατ' αντιστοιχία και στην περίπτωση πειράματος με ξενιστή την επιτραπέζια ποικιλία «Φράουλα», η στατιστική ανάλυση με τη χρήση του κριτηρίου της Ελάχιστης Σημαντικής Διαφοράς (LSD), επέτρεψε την ομαδοποίηση της αποτελεσματικότητας των επεμβάσεων μας σε 3 επίπεδα βιοελέγχου: (α) υψηλής αποτελεσματικότητας - με αντιπροσώπους στελέχη ζυμών - (YS137, YS44), (β) μέτριας (YS5, BS48, BS85, κομποστ κρεμμύδι, YS114) και (γ) χαμηλής (με αντιπροσώπους τα βακτηριακά στελέχη) (**Γράφημα 4.5.7-13**). Οι πιο αποτελεσματικές επεμβάσεις (στο σύνολο των βακτηριακών εφαρμογών), αντιστοιχούν στα στελέχη **BS48 και BS85**, αφού ως προς το μετριασμό της συνολικής σοβαρότητας της τεφράς σήψης, κατέγραψαν συνολική μείωση της ασθένειας κατά **47% και 34%** αντίστοιχα. Ποσοστά που θα μπορούσαν να συγκριθούν με το αντίστοιχο της λιγότερο αποτελεσματικής επέμβασης στο σύνολο των ζυμών και ειδικότερα της YS5, όπου το αντίστοιχο ποσοστό μείωσης έφθασε το 40%. Έτσι, η επέμβαση του BS48 δε διέφερε στατιστικώς σημαντικά με τις αντίστοιχες της ζύμης YS114 και του κομποστοποιημένου προϊόντος κρεμμυδιού, ενώ η επέμβαση του BS85 με αυτήν της YS5. Τέλος, οι πιο αποτελεσματικές εφαρμογές στο σύνολο των επεμβάσεων αναδείχθηκαν αυτές των ζυμών YS137 και YS44 που δε διέφεραν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους, με τα αξιόλογα ποσοστά μείωσης της ασθένειας να προσεγγίζουν το 87% και 84% αντίστοιχα (**Γράφημα 4.5.7-14**).

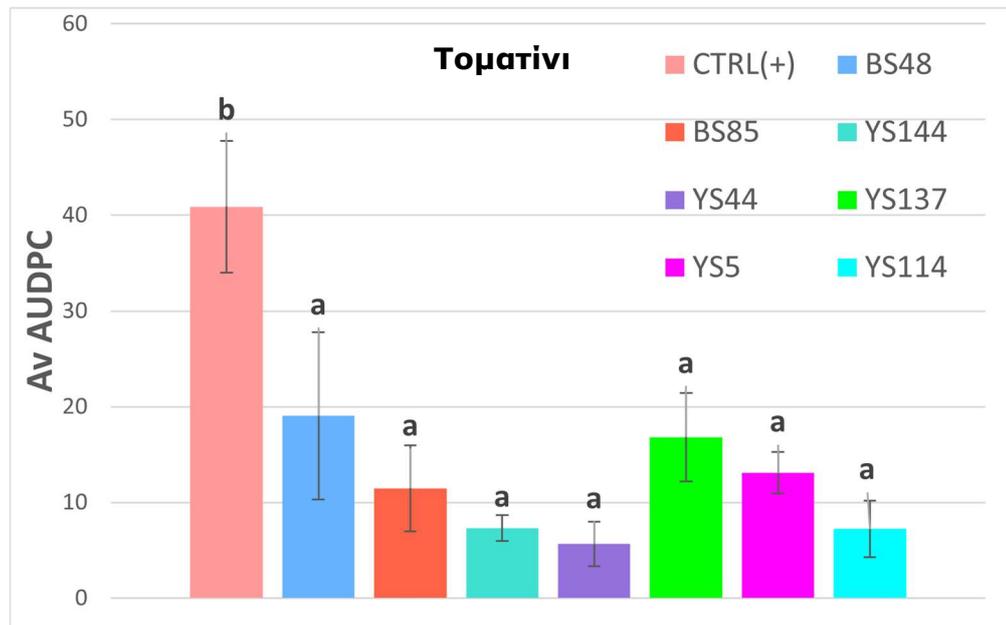


**Γράφημα 4.5.7-13:** *Ex vivo* αξιολόγηση των στελεχών βακτηρίων και ζυμών καθώς και των κομποστοποιημένων προϊόντων που εφαρμόστηκαν ως προς την αντιμετώπιση του μύκητα *B. cinerea*, σε ράγες φράουλας. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως η σχετική περιοχή κάτω από την καμπύλη προόδου της ασθένειας (AUDPC). Οι στήλες αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο 24 ραγών (3 επαναλήψεις με 8 ράγες ανά επανάληψη και εφαρμογή) Οι κάθετες γραμμές συμβολίζουν το τυπικό σφάλμα. Οι στήλες με διαφορετικά γράμματα διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους, σύμφωνα με το LSD multiple range test με  $P < 0,05$ .

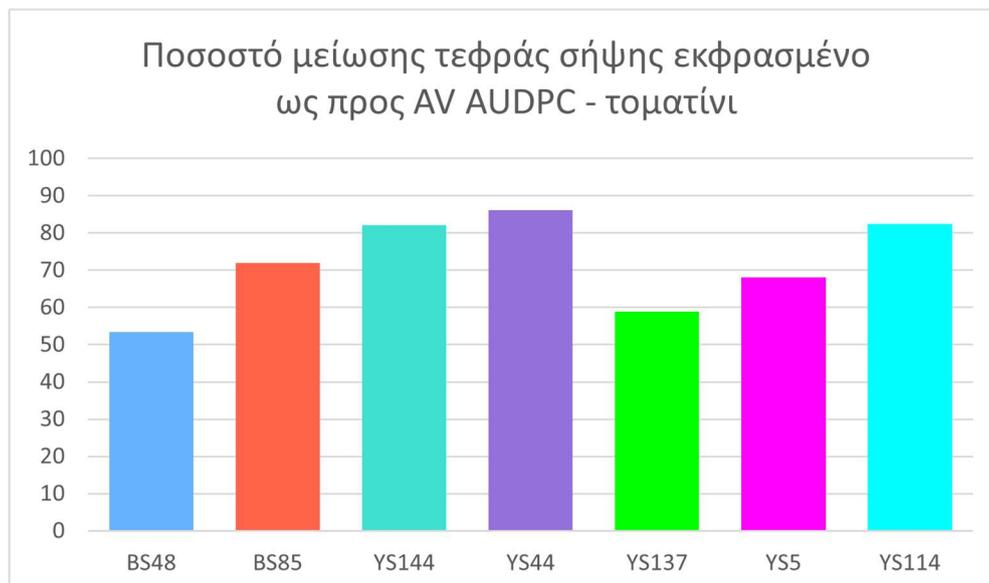


**Γράφημα 4.5.7-14:** Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως η σχετική περιοχή κάτω από την καμπύλη προόδου της ασθένειας (AUDPC) κάθε επέμβασης σε σχέση με την αντίστοιχη του μάρτυρα. Οι στήλες αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο 24 ραγών (3 επαναλήψεις με 8 ράγες ανά επανάληψη και εφαρμογή).

Τέλος, στην περίπτωση μελέτης της συνολικής σοβαρότητας ασθένειας στον ξενιστή **τοματίνι** αξιολογήθηκαν τα πιο αποτελεσματικά στελέχη μικροοργανισμών (ζυμών και βακτηρίων) που επέδειξαν τα καλύτερα αποτελέσματα, στον υπό μελέτη ξενιστή των επιτραπέζιων ποικιλιών σταφυλιών, τόσο ως προς το συνολικό παραγόμενο αριθμό κονιδίων του μύκητα ανά προσβεβλημένη ράγα αλλά και ως προς τη σοβαρότητα της ασθένειας (εκφρασμένης σε ποσοστό μόλυνσης ανά ράγα), όσο και ως προς τη συνολική σοβαρότητα ασθένειας εκφρασμένη ως AUDPC. Έτσι, παρατηρήθηκε πως οι επεμβάσεις BS48, BS85, YS144, YS44, YS137, YS5, YS114 επέφεραν εξίσου αξιόλογη μείωση της σοβαρότητας της τεφράς σήψης και σε δεύτερο ξενιστή (τοματίνι), καθώς δε διέφεραν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους, ως προς τη συνολική μείωση της σοβαρότητας της ασθένειας της τεφράς σήψης. Στη συγκεκριμένη περίπτωση μπορεί να αναφερθεί το οριακό συγκριτικό πλεονέκτημα των ζυμών, συγκρίνοντας και τα αντίστοιχα ποσοστά μείωσης της ασθένειας και συγκεκριμένα των **YS144, YS44, YS114**, όπου τα ποσοστά κυμάνθηκαν από 82% έως 86%. Τη στιγμή που τα αντίστοιχα ποσοστά έναντι των δύο υπό εξέταση βακτηριακών στελεχών BS 48 και BS 85, ήταν 53% και 72% αντίστοιχα (**Γράφημα 4.5.7-15, Γράφημα 4.5.7-16**).



**Γράφημα 4.5.7-15:** *In situ* αξιολόγηση των στελεχών βακτηρίων και ζυμών που εφαρμόστηκαν σε τοματίνια ως προς την αντιμετώπιση του μύκητα *B. cinerea*. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως η σχετική περιοχή κάτω από την καμπύλη προόδου της ασθένειας (AUDPC). Στο γράφημα απεικονίζεται η συνολική Σοβαρότητα Ασθένειας, εκφρασμένη ως AV AUDPC. Οι στήλες αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο 24 τοματινίων (3 επαναλήψεις με 8 τοματίνια ανά επανάληψη και εφαρμογή). Οι κάθετες γραμμές συμβολίζουν το τυπικό σφάλμα. Οι στήλες με διαφορετικά γράμματα διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους, σύμφωνα με το LSD multiple range test με  $P < 0,05$ .



**Γράφημα 4.5.7-16:** Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως η σχετική περιοχή κάτω από την καμπύλη προόδου της ασθένειας (AUDPC) κάθε επέμβασης σε σχέση με την αντίστοιχη του μάρτυρα. Οι στήλες αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο 24 τοματινίων (3 επαναλήψεις με 8 τοματίνια ανά επανάληψη και εφαρμογή).

Αξίζει να σημειωθεί πως κατά τη διάρκεια λήψης φωτογραφιών για την ημερήσια συνοπτική απεικόνιση της *in planta* εξέλιξης της μόλυνσης στο μάρτυρα και παρεμπόδισης της αντίστοιχα στις επεμβάσεις με τους βιολογικούς παράγοντες παρατηρήθηκε αρχικά και ειδικότερα κατά τις πρώτες ημέρες μετά τη μόλυνση η έκλυση χαρακτηριστικού χυμώδους υγρού στο σημείο της τεχνητής τομής, όπου έγινε η έγχυση και των κονιδίων του βοτρύτη (τεχνητή μόλυνση). Όσο περνούσαν οι ημέρες μετά τη μόλυνση το χαρακτηριστικό υγρό γινόταν όλο και πιο παχύρρευστο με τάση στερεοποίησης του επί της επιφάνειας του τοματινιού και κατάληψης όλης της θέσης αρχικά της τεχνητής οπής μόλυνσης και στη συνέχεια οποιουδήποτε φυσικού ανοίγματος προέκυπτε επί των καρπών. Έτσι, έγινε η υπόθεση εργασίας πως δεδομένης της παρεμπόδισης της μυκηλιακής ανάπτυξης του βοτρύτη (ειδικά στην επέμβαση YS 137 - **Εικόνα 4.5.7-19**) ειδικά τα εν λόγω σημεία θα μπορούσαν να αποτελούν σημεία επιτυχημένης εγκατάστασης και αποικισμού των αξιολογούμενων εν δυνάμει βιολογικών παραγόντων. Κατά την 10<sup>η</sup> ημέρα μετά τη μόλυνση έγινε δειγματοληπτική λήψη επί τυχαίου εκκρίματος συγκεκριμένων επεμβάσεων με τη βοήθεια βακτηριακού κρίκου. Ακολούθησε γραμμική διασπορά σε petri dish με υπόστρωμα PDA, και μετά την παρέλευση 2 ημερών έγινε οπτική μορφολογική σύγκριση των αποκλειθισμών καλλιέργειών, με τις αντίστοιχες αρχικές καλλιέργειες των αξιολογούμενων βιολογικών παραγόντων στην παρούσα εργασία, μετά την αρχική ενεργοποίησή τους.



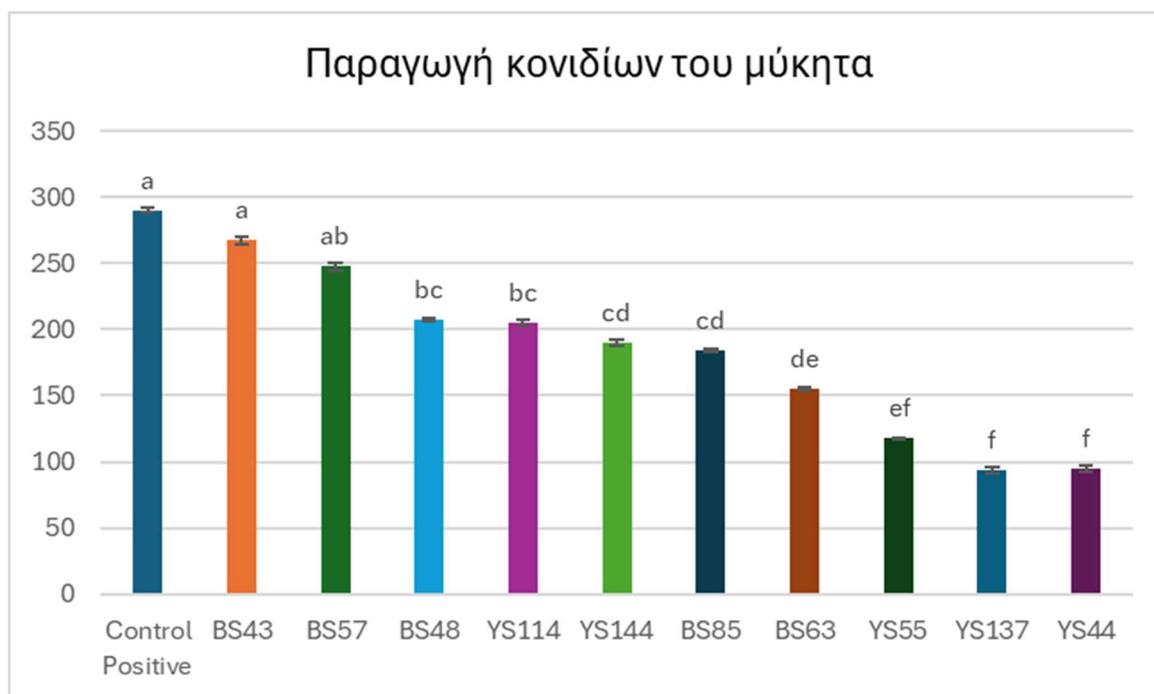
**Εικόνα 4.5.7-19:** Παρουσία χυμώδους εκκρίματος στα σημεία εφαρμογής του ανταγωνιστικού οργανισμού YS 137.

## **Αξιολόγηση της επίδρασης των απομονώσεων βακτηρίων και ζυμών στην παραγωγή κονιδίων, της σοβαρότητας της μαύρης σήψης και της επιμόλυνσης με ωχρατοξίνες σε ράγες αμπέλου**

Στα σταφύλια που μολύνθηκαν με το παθογόνο στέλεχος *Aspergillus carbonarius* (AC29) παρατηρήθηκε εκτεταμένη σήψη, έντονη ανάπτυξη μυκηλίου και αποσύνθεση των ραγών. Από τα βακτήρια, στις βιοδοκιμές BS43 και BS48 η ανάπτυξη του μύκητα ήταν περιορισμένη και η σήψη μικρότερης έκτασης, ενώ οι ράγες διατήρησαν καλύτερα τη δομή και τη σφριγηλότητά τους. Ο παράγοντας BS85 παρουσίασε επίσης ανασταλτική δράση, με αισθητά μειωμένη ένταση συμπτωμάτων, και στα δείγματα με το βακτήριο BS63 καταγράφηκε περαιτέρω περιορισμός της ανάπτυξης του παθογόνου και μικρότερη καταστροφή του ιστού. Στον BS57 δεν καταγράφηκε αξιοσημείωτη διαφοροποίηση, καθώς η ένταση των συμπτωμάτων παρέμεινε παρόμοια με εκείνη της ομάδας μάρτυρα. Αντίστοιχα, οι ζύμες YS144, YS44 και YS55 μείωσαν την ένταση της προσβολής σε διαφορετικό βαθμό, παρουσιάζοντας περιορισμένη ανάπτυξη εξάνθισης και ηπιότερη σήψη των ραγών. Στα δείγματα με τη ζύμη YS114 παρατηρήθηκε μικρότερη έκταση μυκηλιακή ανάπτυξης και διατήρηση της συνεκτικότητας των καρπών, ενώ με τη ζύμη YS137 τα συμπτώματα ήταν τα ηπιότερα, με περιορισμένη σήψη και παρουσία υγιών ραγών. Συνολικά, **οι περισσότεροι βιολογικοί παράγοντες παρουσίασαν ανασταλτική ή ανταγωνιστική δράση έναντι του *Aspergillus carbonarius*, συμβάλλοντας στη μείωση της έντασης της μόλυνσης και στη διατήρηση της ποιότητας των σταφυλιών.**

### Αποτελέσματα παραγωγής κονιδίων του μύκητα *Aspergillus carbonarius* μετά την εφαρμογή ωφέλιμων βακτηρίων και ζυμών

Σε κάθε εφαρμογή, υπήρχαν 2 επαναλήψεις με 8 ράγες η κάθε επανάληψη. Μετά το πέρας των 7 ημερών επώασης, έγινε η μέτρηση των κονιδίων της κάθε εφαρμογής, για την αξιολόγηση της μολυσματικότητας του στελέχους AC29 (**Γράφημα 4.5.7-17**).

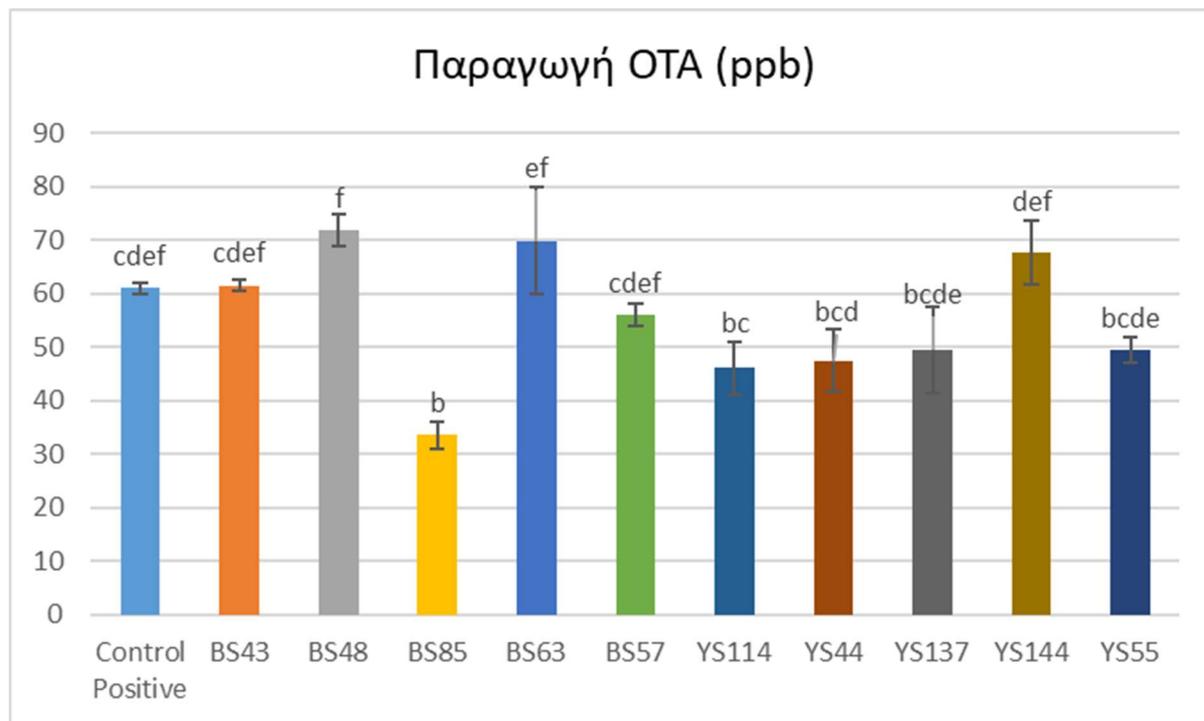


**Γράφημα 4.5.7-17:** Διάγραμμα παραγωγής κονιδίων *A. carbonarius* σε ράγες σταφυλιού, έπειτα από την εφαρμογή ζυμών και βακτηρίων ως βιολογικών παραγόντων.

Ο βιολογικός παράγοντας BS43 παρεμπόδισε την παραγωγή των κονιδίων σε χαμηλό ποσοστό, συγκεκριμένα μόλις 6%, καθιστώντας τον, τον πιο αδύναμο ανασταλτικό παράγοντα σε αυτή την μελέτη. Ακολουθεί ο βιολογικός παράγοντας BS57, ο οποίος επίσης έχει χαμηλό ποσοστό παρεμπόδισης, ανερχόμενο στο 13% και παρουσίασε παρόμοια αποτελέσματα με τον BS48 με 16% μείωση και ακολουθεί η ζύμη YS114 με μείωση 26%. Οι βιολογικοί παράγοντες YS144, BS85 και BS63 συνέβαλλαν σε μείωση των κονιδίων με ποσοστά 30%, 33% και 40% αντίστοιχα δείχνοντας πως αυτοί οι παράγοντες έχουν μετρίως ισχυρή ανασταλτική δράση. Τέλος, οι παράγοντες που εμφάνισαν την ισχυρότερη ανασταλτική δράση ήταν οι ζύμες YS55 με παρεμπόδιση παραγωγής κονιδίων 56%, YS137 με 66% και YS44 με 70%. Αυτά τα αποτελέσματα καταδεικνύουν την αποτελεσματικότητα των YS55, YS137, YS55 ως βιολογικοί ανασταλτικοί παράγοντες καθώς μείωσαν την παραγωγή κονιδίων περισσότερο από 50% συγκριτικά με τον θετικό μάρτυρα.

## Αποτελέσματα παραγωγής ωχρατοξίνης A μετά την εφαρμογή ωφέλιμων βακτηρίων και ζυμών σε ράγες σταφυλιού

Παρακάτω παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της ανάλυσης της ΟΤΑ (Γράφημα 4.5.7-18) με τη μέθοδο της ELISA:



**Γράφημα 4.5.7-18:** Διάγραμμα παραγωγής ωχρατοξίνης A σε ράγες σταφυλιού έπειτα από την εφαρμογή ζυμών και βακτηρίων ως βιολογικών παραγόντων. Η στατιστική ανάλυση έγινε σύμφωνα με το LSD multiple range test με  $P < 0,05$ .

Μόνο ο παράγοντας BS85 παρουσιάζει την πιο αποτελεσματική μείωση της παραγωγής ωχρατοξίνης A με ποσοστό 45% σε σύγκριση με τον θετικό μάρτυρα. Ο παράγοντας BS57 παρουσιάζει με μείωση 10%. Τέλος, οι ζύμες YS44, YS114, YS55 και YS137 μείωσαν την ωχρατοξίνη A, εμφανίζοντας τιμές 25%, 26%, 20%, 20% αντίστοιχα χωρίς όμως να υπάρχει στατιστική διαφορά συγκριτικά με τον θετικό μάρτυρα. Συνοψίζοντας, τα αποτελέσματα αυτά αναδεικνύουν την αποτελεσματικότητα του βιολογικού παραγόντα **BS85** στη μείωση της ωχρατοξίνης A και τη σημασία της επιλογής του κατάλληλου βιολογικού παραγόντα για περαιτέρω μελέτη σε πειράματα αγρού.

## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η αγορά των βιολογικών φυτοπροστατευτικών προϊόντων αναπτύσσεται ταχύτητα και καταβάλλεται ιδιαίτερη προσπάθεια στην εύρεση αποτελεσματικών μικροβιακών βιολογικών παραγόντων προσαρμοσμένων στο ιδιαίτερο μικροκλίμα κάθε περιοχής-ενδιαφέροντος. Στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκε η αποτελεσματικότητα βιολογικών σκευασμάτων (εμπορικών και υπό ανάπτυξη) για την αντιμετώπιση του ωιδίου (*Erysiphe necator*), της τεφράς σήψης (*Botrytis cinerea*) και της μαύρης

σήψης (*Aspergillus carbonarius*).

Σε εμπορικό αμπελώνα στην Αλεξάνδρεια Ημαθίας αξιολογήθηκαν βιολογικά σκευάσματα για την αντιμετώπιση του ωιδίου και μαύρης σήψης. Όλα τα βιολογικά σκευάσματα που αξιολογήθηκαν μείωσαν τη σοβαρότητα και την ένταση του ωιδίου σε φύλλα και βότρες σε σχέση με τον μάρτυρα, αλλά υπήρχαν διαφορές μεταξύ σκευασμάτων. Στα φύλλα, τα Mix BIO και Skim Milk ήταν τα πιο αποτελεσματικά στην τελευταία αξιολόγηση (BBCH 81). Ακολουθούσαν τα Septum και Terranum. Στους βότρες, τα Mix BIO, Terranum και Skim Milk είχαν την υψηλότερη αποτελεσματικότητα στην τελευταία αξιολόγηση. Επίσης, όλα τα βιολογικά σκευάσματα μείωσαν τη σοβαρότητα και την ένταση της μαύρης σήψης σε σχέση με τον μάρτυρα, αλλά σημειώθηκαν διαφορές μεταξύ τους ως προς την αποτελεσματικότητα. Στους βότρες, τα Mix BIO, Terranum και Skim Milk ήταν τα πιο αποτελεσματικά στη σοβαρότητα, με το Septum να ακολουθεί. Όλα τα σκευάσματα μείωσαν την ένταση της ασθένειας από 13% (Skim Milk) έως 37% (Terranum). Συνολικά, τα βιολογικά σκευάσματα λειτούργησαν θετικά έναντι και των δύο ασθενειών, με μικρές διαφορές στην απόδοση ανά σκεύασμα και καλλιεργητικό στάδιο.

Νέα υπό ανάπτυξη βιολογικά σκευάσματα και συγκεκριμένα δύο κομποστοποιημένα προϊόντα καθώς και πέντε στελέχη βακτηρίων και πέντε ζυμών, που απομονώθηκαν από το Θηραϊκό αμπελώνα, αξιολογήθηκαν ως προς την παρεμπόδιση του μύκητα *B. cinerea* και του *A. carbonarius* σε πειράματα εργαστηρίου. Οι μικροβιακοί παράγοντες αξιολογήθηκαν αρχικά *in-vitro* σε «διπλές καλλιέργειες» και στη συνέχεια *in planta*, σε ράγες δύο επιτραπέζιων ποικιλιών σταφυλιού παρουσία του μύκητα και σε καρπούς μικρόκαρπης τομάτας (cherry) με σκοπό τη διερεύνηση της αποτελεσματικότητάς τους αλλά και των διαφορετικών κατηγοριών μηχανισμών δράσεων των υπό εξέταση βιολογικών παραγόντων, που απορρέουν από τις τριτροφικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ ξενιστή, παθογόνου και βιολογικών παραγόντων. Στα *in vitro* πειράματα, συγκεκριμένα στελέχη βακτηρίων επέδειξαν ικανοποιητικά ποσοστά παρεμπόδισης, υποδεικνύοντας άμεσους τρόπους δράσεων, όπως είναι η παραγωγή αντιβιοτικών ενώσεων. Στα *in planta* πειράματα, μόνο τα υπό εξέταση στελέχη ζυμών, μικροοργανισμοί που εκμεταλλεύονται τον ανταγωνισμό θέσης και θρεπτικών στοιχείων, παρεμπόδισαν αποτελεσματικά το μύκητα, με μειωμένη παραγωγή τόσο κονιδίων, όσο και μειωμένη ανάπτυξη μυκηλίου του *B. cinerea* στην τομάτα και στο σταφύλι. Τα παραπάνω 10 μικροβιακά στελέχη αποτελούν ενδημικά, επιφυτικά στελέχη βακτηρίων και ζυμών, που απομονώθηκαν από αμπελώνες της Σαντορίνης προσφέροντας ένα συγκριτικό πλεονέκτημα, αυτό της ενδημικότητας. Τα ενδημικά στελέχη μικροοργανισμών είναι προσαρμοσμένα στις κλιματικές συνθήκες ενός τόπου, δίνοντας τους ένα σημαντικό πλεονέκτημα κατά την εφαρμογή τους, στο πλαίσιο της βελτίωσης της αποτελεσματικότητας και της βιωσιμότητας της βιολογικής καταπολέμησης και αξιοποίησης της λειτουργικής βιοποικιλότητας.

Από τη σύγκριση των *in vitro* και *ex vivo* αποτελεσμάτων συμπεραίνουμε ότι τα βακτηριακά στελέχη (π.χ. BS 57, BS 63, BS 48) ήταν πιο αποτελεσματικά στην

άμεση παρεμπόδιση του *Botrytis cinerea in vitro*, πιθανότατα λόγω της παραγωγής αντιμικροβιακών ενώσεων ή ενζύμων που στοχεύουν άμεσα τον μύκητα, απ' ότι στις αντίστοιχες *ex vivo* συνθήκες, με την «παρεμβολή» του καρπού – ξενιστή του μύκητα. Αντιθέτως, τα στελέχη ζυμών ήταν πιο αποτελεσματικά στις *ex vivo* συνθήκες, όπου πιθανώς ανταγωνίζονταν τον μύκητα για χώρο και θρεπτικά συστατικά, μειώνοντας την εξάπλωση του μυκηλίου του βοτρυτή στην επιφάνεια του καρπού αλλά και την κονιδιογένεση. Η παραπάνω διαπίστωση ενισχύθηκε από τα ευρήματα του *in vitro* πειράματος, όπου η ανάπτυξη της μυκηλιακής υφής του βοτρυτή σταμάτησε όταν ήρθε σε επαφή με την αποικία της ζύμης (YS 5 και YS 44). Η απουσία ξεκάθαρης ζώνης παρεμπόδισης στις συγκεκριμένες περιπτώσεις των «διπλών καλλιεργειών» των εν λόγω ζυμών με το βοτρυτή μπορεί να αποδοθεί σε ασθενέστερη παρεμπόδιση ή ανταγωνισμό για θρεπτικά συστατικά (Sipiczki, 2016). Αντιθέτως, στις αντίστοιχες «διπλές καλλιέργειες» αποτελεσματικών βακτηριακών στελεχών με το βοτρυτή, παρατηρήθηκε η δημιουργία ισχυρής ζώνης παρεμπόδισης, μεταξύ της αποικίας και του μυκηλίου του μύκητα (χαρακτηριστικά BS 57, BS 63, BS 48). Διάφοροι μηχανισμοί μπορεί να ευθύνονται για την παρουσία ισχυρής ζώνης παρεμπόδισης, με ισχυρή πιθανότητα την έκκριση τοξικού παράγοντα στο μέσο ανάπτυξης της συγκαλλιέργειας βοτρυτή – βακτηριακών στελεχών. Άλλωστε, τα βακτήρια παράγουν αποδεδειγμένα αρκετά περισσότερους δευτερογενείς μεταβολίτες σε σύγκριση με τις ζύμες (Roca-Couso et al., 2021). Ακόμη, όπως έχει ήδη αναφερθεί και διαπιστωθεί από τη βιβλιογραφία, τα εν λόγω αποτελεσματικά στελέχη *in vitro* ανήκουν στο γένος *Bacillus spp.* παράγοντας αντιμικροβιακές ενώσεις όπως τα λιποπεπίδια, τις VOCs κ.ά. Ειδικότερα, στελέχη του είδους *B. subtilis* επιδεικνύουν ισχυρή αντιμυκητιασική δράση σε *in vitro* συνθήκες, μέσω της παραγωγής βιο-επιφανειοδραστικών ουσιών (surfactin) τα οποία αναστέλλουν άμεσα τις μυκηλιακές υφές του *B. cinerea*. Η αποτελεσματικότητα όμως αυτού του μηχανισμού της αντιβίωσης μπορεί να περιοριστεί *ex vivo* από τις φυσικοχημικές, μηχανικές ιδιότητες των επιδερμικών κυττάρων του ξενιστή, το pH ή τον μικροβιακό ανταγωνισμό της μικροχλωρίδας στην καρπόσφαιρα του ξενιστή (Ongena & Jacques, 2008, Lindow & Brandl, 2003), από ενώσεις προερχόμενες από τον ξενιστή (φαινολικές, ενεργές μορφές οξυγόνου – ROS) ή φυσικά εμπόδια (πάχος επιδερμικών κυττάρων) (Cawoy et al., 2015). Όσον αφορά τις φυσικοχημικές ιδιότητες που απορρέουν από τον ξενιστή, τα επιδερμικά κύτταρα των καρπών τομάτας και σταφυλιών, καθώς και υδρόφοβες ενώσεις των εν λόγω ιστών μπορούν να μειώσουν τη βιοδιαθεσιμότητα των βακτηριακών μεταβολιτών (Lindow & Brandl, 2003) *ex vivo* ή *in planta*. Οι ίδιοι ρυθμιστικοί παράγοντες μπορεί να προκαλούν μείωση της αποτελεσματικότητας των αντιμικροβιακών ενώσεων, αλλά να ευνοούν τις ζύμες είτε μέσω της προσκόλλησής τους στις οικολογικές θέσεις της φυλλόσφαιρας και του καρπού ή μέσω του ανταγωνισμού θρεπτικών ουσιών. Έτσι, η «παρεμβολή» του καρπού, στις τριτροφικές αλληλεπιδράσεις (παθογόνο – ξενιστής – ανταγωνιστής μικροβιακός παράγοντας) στις *ex vivo* συνθήκες αποτελεί και ρυθμιστή της αποτελεσματικότητας των μικροβιακών βιοπαραγόντων.

Επίσης, από τα αποτελέσματα της μελέτης, διαπιστώνεται πως σχεδόν όλοι οι βιολογικοί παράγοντες μειώνουν σε κάποιο ποσοστό την παραγωγή OTA με μεγαλύτερο ποσοστό μείωσης να παρουσιάζει ο βιολογικός παράγοντας BS85 με το ποσοστό αυτό να ανέρχεται στα 45%. Εξαιρεση ήταν οι παράγοντες BS48, BS63 και YS144 που αύξησαν την παραγωγή ωχρατοξίνης ενώ μείωσαν την κονιδιογένεση. Αυτή η αύξηση μπορεί να οφείλεται σε περιβαλλοντικούς παράγοντες όπως η διαθεσιμότητα νερού ( $a_w$ ), η θερμοκρασία του περιβάλλοντος, η τροποποιημένη ατμόσφαιρα αυξημένου CO<sub>2</sub> που μπορούν να οδηγήσουν σε συνθήκες αβιοτικού στρες και να μειώσουν την παραγωγή κονιδίων του μύκητα αυξάνοντας ταυτόχρονα την παραγωγή (OTA). Οι YS114 και YS44 παρουσίασαν μετρίως ικανοποιητική μείωση κοντά στο 25% και ακολουθούν BS57 (10%), YS137 (20%), YS55 (20%), BS43 (0%) με μικρή έως καθόλου μείωση της OTA. Όσον αφορά την παραγωγή κονιδίων, τα αποτελέσματα έδειξαν πως όλοι οι βιολογικοί παράγοντες κατάφεραν να την παρεμποδίσουν σε κάποιο ποσοστό. Οι πιο αποτελεσματικοί παράγοντες φαίνεται πως ήταν οι ζύμες YS55, YS137, YS44 με μείωση των παραγόμενων κονιδίων σε 40%, 55%, 65% αντίστοιχα και ακολούθησαν οι YS144 (30%), YS114 (25%), BS48 (15%), BS57 (13%), BS43 (6%). Συμπερασματικά, η χρήση βιολογικών παραγόντων για την αντιμετώπιση τόσο της κονιδιογένεσης όσο και της παραγωγής της ωχρατοξίνης-A του ωχρατοξικογόνου μύκητα *Aspergillus carbonarius* φαίνεται να αποτελεί μια αποτελεσματική λύση και μπορεί να συμβάλει στην προώθηση ασφαλών και φιλικών προς το περιβάλλον πρακτικών στη γεωργία, μειώνοντας την ανάγκη για χημικά σκευάσματα και προσφέροντας μια βιώσιμη λύση για την παραγωγή σταφυλιών. Ενδέχεται να αξίζει να διερευνηθεί περαιτέρω η αλληλεπίδραση αυτών των βιολογικών παραγόντων με διαφορετικές ποικιλίες σταφυλιών και σε διάφορες κλιματικές συνθήκες, με διαφοροποιήσεις στην θερμοκρασία και την υγρασία, καθώς είναι παράγοντες που επηρεάζουν την αποτελεσματικότητα. Έρευνες έχουν δείξει ότι μικροοργανισμοί όπως ο *Paenibacillus alvei*, *Arthrobacter* sp. και *Blastobotrys* sp. έχουν τη δυνατότητα να μειώσουν την ανάπτυξη του *Aspergillus carbonarius*, με ορισμένα στελέχη να είναι πιο αποτελεσματικά από άλλα λόγω διαφορετικών μηχανισμών δράσης, όπως ο ανταγωνισμός για θρεπτικά συστατικά.

Οι ζύμες, γενικά, έχουν υψηλή αντοχή στις δυσμενείς περιβαλλοντικές συνθήκες που επικρατούν πριν και μετά τη συγκομιδή (χαμηλές και υψηλές θερμοκρασίες, άνυδρες συνθήκες στη φυλλόσφαιρα/καρπόσφαιρα, ευρύ φάσμα σχετικής υγρασίας, χαμηλά επίπεδα οξυγόνου, διακυμάνσεις του pH, υπεριώδης ακτινοβολία) και είναι μοναδικά προσαρμοσμένες στο μικροπεριβάλλον του τραυματισμένου ιστού ενός καρπού (υψηλή συγκέντρωση σακχάρων, υψηλή ωσμωτική πίεση και χαμηλό pH). Επιπλέον, σε αντίθεση με πολλούς μύκητες, δεν παράγουν αλλεργιογόνα σπόρια ή μυκοτοξίνες και έχουν απλές διατροφικές απαιτήσεις που τους επιτρέπουν να αποικίζουν ξηρές επιφάνειες για μεγάλα χρονικά διαστήματα (Droby et al., 2016). Εύκολα, λοιπόν γίνεται αντιληπτό, γιατί η υιοθέτηση εκ μέρους τους έμμεσων μορφών ανταγωνισμού (ανταγωνισμός χώρου και θρεπτικών) τους προσφέρει στρατηγικό και συγκριτικό πλεονέκτημα σε *ex vivo* ή *in planta* συνθήκες.

Στις συγκεκριμένες ωστόσο *ex vivo* πειραματικές συνθήκες της εν λόγω εργασίας, συνέτρεξαν και άλλες ειδικές συνθήκες που ευνόησαν στα πολύ επιτυχημένα ποσοστά παρεμπόδισης των ζυμών εναντίον της ασθένειας της τεφράς σήψης επί των ραγών στις επιτραπέζιες ποικιλίες σταφυλιού και στο τοματίνι, που αποτυπώνονται στα αποτελέσματα μέσω της συνολικής σοβαρότητας (Disease severity) της ασθένειας, εκφρασμένης ως προς AUDPC. Οι ειδικές συνθήκες δεν έχουν παρά να κάνουν με τον τρόπο δράσης του νεκροτροφικού παθογόνου *B. cinerea*, στον οποίο βασίζεται και η επιτυχημένη εκδήλωση του ανταγωνιστικού πλεονεκτήματος των ζυμών εναντίον του βοτρύτη, μέσω του ανταγωνισμού για θρεπτικά στοιχεία. Χαρακτηριστικά, η βιολογική αντιμετώπιση του βοτρύτη μέσω του ανταγωνισμού φαίνεται να είναι αποτελεσματική, δεδομένου ότι η βλάστηση των κονιδίων, η περαιτέρω ανάπτυξη των βλαστικών σωλήνων και η πλήρης μόλυνση δεν μπορούν να ολοκληρωθούν χωρίς επαρκή ποσότητα θρεπτικών ουσιών (Hamdache et al., 2018). Ο ανταγωνισμός φαίνεται να είναι μια αποτελεσματική μέθοδος και για τις μετασυλλεκτικές μολύνσεις από το *B. cinerea* (Haidar et al., 2016). Όσον αφορά τον ανταγωνισμό του χώρου εξ' ορισμού δεν είναι πολύ συγκεκριμένος, καθώς περιλαμβάνει την παρεμπόδιση της ανάπτυξης των μυκήτων γενικά και όχι την παρεμπόδιση της ανάπτυξης συγκεκριμένων ειδών (Hilber-Bodmer et al., 2017). Χαρακτηριστικά, οι (Wang et al., 2018) αξιολόγησαν *in vitro* και *ex vivo*, την ανταγωνιστική δράση που ασκείται από 10 στελέχη ζυμών που δεν ανήκουν στο γένος *Saccharomyces*, και απομονώθηκαν από αμπελώνες, κατά του *B. cinerea* σε επιτραπέζια σταφύλια ποικιλίας «Thompson seedless». Μεταξύ των απομονώσεων βρέθηκαν το γένος *Candida spp.* που χρησιμοποιήθηκε και στη συγκεκριμένη εργασία (YS 44, YS 144), και πιο συγκεκριμένα το είδος *Candida saitoana* καθώς και το είδος *A. pullulans* (YS 137, YS 114). Όλες οι εξεταζόμενες ζύμες αποίκισαν γρήγορα τις ράγες των σταφυλιών, με τα αποτελέσματα να συνηγορούν στο ότι ο μηχανισμός δράσης αυτών των ζυμών ήταν ο ανταγωνισμός θέσης. Στον ανταγωνισμό θέσης μπορούμε να αποδώσουμε και τη χαρακτηριστική αποίκιση των ζυμών στην παρούσα εργασία που εμφανίστηκε επί των τεχνητών τομών που έγιναν στα τοματίνια, με σκοπό την τεχνητή μόλυνση τους από το βοτρύτη. Όπως φάνηκε χαρακτηριστικά και στις φωτογραφίες (Εικόνα 4.5.7-19) που ελήφθησαν κατά την 5<sup>η</sup> ημέρα μετά τη μόλυνση, στο σημείο της τεχνητής τομής για τη μόλυνση με το βοτρύτη παρατηρήθηκε η έκκριση χυμώδους υγρού σε μορφή σταγόνας ακριβώς στο σημείο της τομής επί του καρπού. Με την έκκριση της εν λόγω «σταγόνας» τις πρώτες ημέρες μετά τη μόλυνση, παρατηρήθηκε πως όσο περνούσαν οι ημέρες μετά τη μόλυνση, το ρευστό έκκριμα σταδιακά στερεοποιούταν, λαμβάνοντας μια χαρακτηριστική μορφολογική δομή, που θα μπορούσε να αποδοθεί σε αναπτυσσόμενη αποικία μικροοργανισμού επί του καρπού, που ομοίαζε αρκετά με τις αποικίες των ζυμών, κρίνοντας από το χρώμα και τη μορφή της δομής στην περίπτωση της ζύμης YS 5, ενώ είχε και την τάση να επεκτείνεται και να καταλαμβάνει επί των καρπών τα σημεία όπου παρατηρήθηκε διάρρηξη του ιστού της επιδερμίδας (επιφανειακά τραύματα, σχισίματα). Προφανώς η αναδυόμενη σταγόνα στο σημείο τομής, ειδικά τις πρώτες ημέρες μετά τη μόλυνση, αποτέλεσε πλούσια πηγή ελεύθερων θρεπτικών συστατικών (σάκχαρα,

αμινοξέα κ.ά), συστατικά απαραίτητα για την εκβλάστηση των κονιδίων που εγχύθηκαν εντός της τομής. Τα συγκεκριμένα θρεπτικά συστατικά άλλωστε αποτέλεσαν και το πεδίο ανταγωνισμού μεταξύ των ζυμών και των κονιδίων του βοτρώτη, επιτυγχάνοντας σε πρώτη φάση αποτελεσματική παρεμπόδιση εκβλάστησης τους (ανταγωνισμός για θρεπτικά συστατικά), και σε δεύτερη φάση την παρεμπόδιση ανάπτυξης του μυκηλίου του μύκητα στις συγκεκριμένες περιοχές, καταλαμβάνοντας επιτυχώς τις συγκεκριμένες θέσεις (ανταγωνισμός θέσης). Στη συνέχεια και όσο περνούσαν οι ημέρες μετά τη μόλυνση, η σύσταση και σύνθεση του συγκεκριμένου εκκρίματος εμπλουτίστηκε και από Εξωκυτταρικές Πολυμερείς Ουσίες (Extracellular Polymeric Substances – EPS), δεδομένου ότι αυτή η μήτρα αποτελεί κρίσιμο παράγοντα αποικισμού των μικροοργανισμών, ως κύριο συστατικό του βιοϋμενίου (Amellal et al., 1999; Sun et al., 2022), για τη μετέπειτα επιτυχή εγκατάσταση και μελλοντική εκδήλωση του ανταγωνισμού θέσης κατά του βοτρώτη. Κατά τη διάρκεια της πρώτης απόκρισης του καρπού στο μηχανικό ερέθισμα της τεχνητής πληγής, θα μπορούσε να θεωρηθεί ότι ένας ενδογενής διεγέρτης (endogenous elicitor) τύπου DAMP: (Damage-associated molecular pattern), θα μπορούσε να προκαλέσει την επαγόμενη αντοχή από τραύμα (Resistance Induced by Wounding). Αυτού του είδους η επαγόμενη αντοχή (WIR) περιλαμβάνει την άμεση ενεργοποίηση πολλών γονιδίων, συμπεριλαμβανομένων εκείνων που κωδικοποιούν αναστολές πρωτεασών. Αυτές οι πρωτεΐνες μπορούν να αδρανοποιήσουν ένζυμα με σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη των συμπτωμάτων της ασθένειας (Koiwa et al., 1997). Η συστεμίνη (systemin), το πρώτο φυτικό πεπτιδίο για το οποίο έχει αποδειχθεί μια σηματοδοτική λειτουργία, εμπλέκεται στην WIR ενεργοποίηση των γονιδίων αναστολέων πρωτεάσης (PIN) στην τομάτα (Pearce et al., 1991; Ryan, 1992). Ακόμη, η πρόκληση τραυματισμών στα φύλλα του φυτού *Arabidopsis thaliana* προκαλεί την ανοσοποίηση ενάντια στο βοτρώτη. Η WIR δεν σχετίζεται με τις εξαρτώμενες αμυντικές αποκρίσεις του σαλικυλικού οξέος, του ιασμονικού οξέος ή του αιθυλενίου, αντιθέτως η φυτοαλεξίνη καμαλεξίνη (camalexin) βρέθηκε να εμπλέκεται σε αυτή την αμυντική απόκριση (Chassot et al., 2008). Άλλωστε, η ενεργοποίηση των εξαρτώμενων αμυντικών αποκρίσεων από το JA και το αιθυλένιο μπορούν να αποδοθούν στο νεκροτροφικό τρόπο δράσης του βοτρώτη (Glazebrook, 2005; Spoel et al., 2007). Επομένως, έχοντας υπόψιν όλα τα παραπάνω, μπορεί να γίνει η παραδοχή, ότι στις επεμβάσεις των *ex vivo* πειραμάτων της εν λόγω εργασίας «υποβόσκει» και η ενεργοποίηση λανθανόντων μηχανισμών άμυνας, «ανοσοποιώντας» το φυτό/καρπό ως έμμεση μορφή ανταγωνισμού, χωρίς όμως να μπορεί να αξιολογηθεί ποσοτικά η ενδεχόμενη ενίσχυση των παραπάνω μηχανισμών άμυνας από τη δράση των μικροβιακών βιολογικών παραγόντων που εξετάστηκαν στην παρούσα εργασία, καθώς ξεφεύγει από τους σκοπούς και στόχους της.

Έτσι, συνάγεται το συμπέρασμα πως τα αποτελέσματα των *ex vivo* πειραματικών συνθηκών είναι περισσότερο αντιπροσωπευτικά της αθροιστικής επίδρασης μερικών ή όλων των μηχανισμών δράσης που αναλύονται παραπάνω. Εκτός όμως από την αθροιστική δράση, μπορεί να εκφραστεί και η συνεργιστική ευνοώντας παραπάνω

κάποιον από τους μηχανισμούς δράσης. Έτσι, στην περίπτωση μας ο ανταγωνισμός για θρεπτικά (έμμεση μορφή ανταγωνισμού) μπορεί να ενισχυθεί συνεργιστικά από μια άμεση μορφή, όπως η παραγωγή χητινολυτικών ενζύμων ή η παρουσία των συγκεκριμένων ενζύμων να αποτελέσει την ικανή συνθήκη για ενεργοποίηση λανθανόντων μηχανισμών άμυνας του φυτού. Χαρακτηριστικά στο στέλεχος *Aureobasidium pullulans* PI1, τα ένζυμα 1,3-γλυκανάση και πρωτεάση (μηχανισμός παρασιτισμού) δρουν απευθείας στο κυτταρικό τοίχωμα του βοτρυτή, ενώ η πηκτινάση έχει την ικανότητα να διεισδύει και να αποικίζει τα φυτικά κυτταρικά τοιχώματα, ενισχύοντας έτσι την ικανότητά της ζύμης να ανταγωνίζεται τα παθογόνα για θρεπτικά συστατικά (Parafati et al., 2016). Ακόμη, το συγκεκριμένο είδος παρουσιάζει αξιοσημείωτη σταθερότητα άνω του 70% στα ποσοστά παρεμπόδισης του μύκητα βοτρυτή *in vitro*, σε μεταβαλλόμενα περιβάλλοντα pH επιδεικνύοντας σημαντικό συγκριτικό πλεονέκτημα προσαρμοστικότητας έναντι άλλων ζυμών (Di Canito et al., 2021). Ανάλογα αποτελέσματα υπήρξαν και με τη χρήση του αντίστοιχου στελέχους *A. pullulans* της συλλογής του εργαστηρίου Φυτοπαθολογίας που χρησιμοποιήθηκε στην εν λόγω εργασία και πιο συγκεκριμένα επί της επιτραπέζιας ποικιλίας Φράουλας *ex vivo*, και σε συγκεκριμένες επαναλήψεις - YS 114(2) - όπου τόσο η ένταση της ασθένειας, όσο και ο αριθμός κονιδίων ήταν 0 (YS 114, YS 137).

Σχετικά με την αξιολόγηση των κομποστοποιημένων προϊόντων μανιταριού και κρεμμυδιού, στο πείραμα με ξενιστή την επιτραπέζια ποικιλία Σουλτανίνα και όσον αφορά τον αριθμό των παραγόμενων κονιδίων, αμφότερες οι επεμβάσεις των κομπόστ παρουσίασαν το μικρότερο αριθμό κονιδίων από το σύνολο των επεμβάσεων, την ίδια στιγμή που η επέμβαση του κομπόστ κρεμμυδιού δε διέφερε στατιστικά σημαντικά ως προς το συνολικό εμβαδόν της ασθένειας (AUDPC), σε σχέση με τον αντίστοιχο δείκτη του θετικού μάρτυρα. Άρα παρατηρήθηκε μια δυσανάλογη και αντιφατικά μειωμένη παραγωγή κονιδίων, από μια φαινομενικά ελάχιστα ή και καθόλου παρεμποδισμένη άρα εύρωστη μυκηλιακή ανάπτυξη του βοτρυτή επί των ραγών της συγκεκριμένης επέμβασης. Από την άλλη μεριά φάνηκε μια σχεδόν αντεστραμμένη κατάσταση στο πείραμα με ξενιστή την επιτραπέζια ποικιλία Φράουλα, όπου οι επεμβάσεις των κομπόστ παρουσίασαν το μεγαλύτερο αριθμό παραγόμενων κονιδίων, ακόμη μεγαλύτερο και από τον αντίστοιχο του θετικού μάρτυρα. Την ίδια στιγμή που οι ίδιες επεμβάσεις επέδειξαν μείωση στη σοβαρότητα της ασθένειας (η επέμβαση του κομπόστ κρεμμυδιού πέτυχε μεγαλύτερη μείωση στη σοβαρότητα της τεφράς σήψης από το σύνολο των βακτηριακών επεμβάσεων). Όπως έχει ήδη αναφερθεί, δεν είναι σαφές, σε *ex vivo* πειράματα πότε η παρεμπόδιση της ασθένειας που σχετίζεται με εφαρμογές κομποστοποιημένων προϊόντων είναι αποτέλεσμα των δευτερογενών μεταβολιτών που παράγονται κατά τη διάρκεια της ζύμωσης ή τον αποικισμό και των επακόλουθων αλληλεπιδράσεων στην επιφάνεια των καρπών από τους μικροοργανισμούς που αναπαράγονται κατά τη ζύμωση. Ωστόσο, κρίνοντας από τις επιδόσεις τους ως προς τη μείωση της σοβαρότητας της τεφράς σήψης στην παρούσα εργασία ούτε αποικισμός μπορεί να υπαινιχθεί, εφόσον θα πρέπει να είχε

εκφραστεί ο αντίστοιχος επιτυχής ανταγωνισμός για θρεπτικά και χώρο, όπως συνέβη με τις ζύμες, αλλά ούτε και η απρόσκοπτη δράση του ανταγωνισμού της αντιβίωσης, μέσω της παραγωγής αντιμικροβιακών ουσιών, των οποίων επίσης η δράση θα μπορούσε να υποβαθμιστεί από τους παρεμποδιστικούς παράγοντες που έχουν ήδη αναλυθεί στην περίπτωση των αντίστοιχων βακτηριακών ουσιών. Μια πιθανή εξήγηση του αντιφατικού γεγονότος της υψηλής κονιδιογένεσης του βοτρύτη επί της επιτραπέζιας ποικιλίας Φράουλα στις επεμβάσεις των κομποστοποιημένων προϊόντων παρά τη μικρότερη εύρωστη ανάπτυξη των μυκηλιακών υφών του, λόγω της εμφάνισης του παρεμποδιστικού φαινομένου στην ανάπτυξη της μυκηλιακής υφής, είναι ότι ορισμένες εκλυόμενες αντιμικροβιακές ουσίες του κομποστοποιημένου προϊόντος θα μπορούσαν να διεγείρουν την ωρίμανση των σταφυλιών, τροποποιώντας τη χημική σύνθεση των καρπών και διεγείροντας τη σποροποίηση του παθογόνου. Στην πραγματικότητα, καθώς ωριμάζουν τα φρούτα, οι φυτοπαθογόνοι μύκητες που χαρακτηρίζονται για τη μετασυλλεκτική τους δράση γίνονται πιο επιθετικοί και αποικίζουν γρήγορα τους ιστούς των καρπών (Alkan & Fortes, 2015). Αντιθέτως, η εκ διαμέτρου αντίθετη συμπεριφορά των επεμβάσεων των κομποστ επί της επιτραπέζιας ποικιλίας Σουλτανίνα, όπου επέδειξαν τη μεγαλύτερη παρεμπόδιση κονιδιογένεσης από το σύνολο των επεμβάσεων μπορεί να αποδοθεί ενδεχομένως στα διαφορετικά επίπεδα ωρίμανσης μεταξύ των ραγών, όπου οι δε ράγες Σουλτανίνας ήταν ήδη σε πιο όψιμο στάδιο ωρίμανσης, από τις αντίστοιχες της Φράουλας. Επομένως, στην τελευταία περίπτωση να μην υπήρχε αρκετό «πρόσφορο έδαφος» για την περαιτέρω διέγερση της ωρίμανσης των σταφυλιών από τις αντιμικροβιακές ουσίες, άρα και της σποροποίησης του βοτρύτη. Άλλωστε, η αποτελεσματικότητα των κομποστοποιημένων προϊόντων παρουσιάζει συχνά διακυμάνσεις καθώς επηρεάζεται σημαντικά από διάφορους παράγοντες. Υπάρχουν αναφορές στη βιβλιογραφία που αφορούν τόσο την ουδέτερη αλλά ακόμη και την αρνητική επίδραση που μπορεί να έχουν τα κομποστοποιημένα προϊόντα σε ορισμένες περιπτώσεις. Σύμφωνα με ανασκόπηση βιβλιογραφίας που πραγματοποιήθηκε από τον Noble (2011), από ένα σύνολο 79 πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν σε ελεγχόμενο περιβάλλον (θερμκήπιο ή θάλαμοι ανάπτυξης), στο 7,6% παρατηρήθηκε αρνητικό αποτέλεσμα, δηλαδή αύξηση των συμπτωμάτων των ασθενειών, μετά την εφαρμογή διαφόρων τύπων κομποστοποιημένων προϊόντων. κομποστοποιημένων προϊόντων.

Όπως γίνεται αντιληπτό οι δεσμεύσεις που απορρέουν από τη στρατηγική «Από το Αγρόκτημα στο Πιάτο» ("From Farm to Folk") στο πλαίσιο μιας πιο αειφορικής και βιώσιμης Κοινής Αγροτικής Πολιτικής, επιβάλλουν την ευρεία αποδοχή και συλλογική υιοθέτηση των βιοπροστατευτικών προϊόντων στη γεωργική πρακτική και στον τομέα της φυτοπροστασίας. Έτσι, μέχρι το 2030, ο στόχος προβλέπει τη μείωση κατά 50 % της χρήσης των πιο επικίνδυνων φυτοφαρμάκων. Το «κενό» της αγοράς που θα δημιουργηθεί θα κληθούν να καλύψουν και τα βιολογικά σκευάσματα. Για την επίτευξη του συγκεκριμένου στόχου φυσικά ο τομέας της έρευνας και της ανάπτυξης πρέπει και οφείλει να προσφέρει τα μέγιστα, μέσω

εκτεταμένων επισκοπήσεων που στόχο θα έχουν την εξερεύνηση, την αξιοποίηση και την αξιολόγηση της ωφέλιμης ενδημικής μικροβιακής δεξαμενής (reservoir), ως προς τη δυνατότητα να παρεμποδίζουν *in vitro*, *ex vivo* και στη συνέχεια στο πεδίο μεγάλης οικονομικής σημασίας φυτοπαθογόνους μικροοργανισμούς, υπό το πρίσμα της λειτουργικής βιοποικιλότητας στην εποχή της βιοφυτοπροστασίας. Κρίσιμης σημασίας θεωρείται η ανεύρεση εκείνων ή εκείνου του στελέχους εντός των επιτυχημένων ειδών βιολογικών παραγόντων που είναι το πιο αποτελεσματικό στο σύνολο των απομονωθείσων στελεχών, ως προς την παρεμπόδιση του φυτοπαθογόνου, στο παθοσύστημα μελέτης κάθε φορά. Σε όλα αυτά θα πρέπει σαφώς να προστεθεί, πως η γνώση των μηχανισμών δράσης με τους οποίους κάθε μικροοργανισμός αλληλεπιδρά με τα παθογόνα αποτελεί βασικό παράγοντα για την ανάπτυξη νέων βιολογικών σκευασμάτων στη φυτοπροστασία. Είναι σημαντικό να γνωρίζουμε τους ακριβείς τρόπους δράσης για έναν μικροβιακό βιολογικό παράγοντα για την ανάπτυξη και εφαρμογή μιας προσαρμοσμένης βιολογικής στρατηγικής αντιμετώπισης στο πεδίο. Τέλος, η συστράτευση με τις επιταγές της βιοηθικής καθώς και η αξιοποίηση των ομικών τεχνολογιών, στην υπηρεσία πάντα των βιοφυτοπροστατευτικών προϊόντων προοιωνίζουν και διασφαλίζουν ένα αισιόδοξο και βιώσιμο μέλλον για το συγκεκριμένο τομέα.

Με γνώμονα τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής, θα μπορούσε να γίνει περαιτέρω έρευνα για την αξιοποίηση τόσο των κομποστοποιημένων προϊόντων όσο και των βιολογικών παραγόντων με τα καλύτερα αποτελέσματα σε σχήματα ολοκληρωμένης αντιμετώπισης της τεφράς σήψης σε αμπέλι και οπωροκηπευτικά. Ειδικότερα, αρχικά θα πρέπει να επεκταθεί η αξιολόγηση σε πειράματα στο θερμοκήπιο και στον αγρό. Στη συνέχεια θα μπορούσε να αξιολογηθεί η δράση του υπερκείμενου διαλύματος, ειδικά των βακτηριακών επεμβάσεων, ως προς την πιθανή μείωση της σοβαρότητας της ασθένειας της τεφράς σήψης, αλλά και η πειραματική διαπίστωση της ενεργοποίησης των μηχανισμών ανοσοποίησης (ISR).

### 3 ΣΥΝΟΨΗ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η μελέτη εξέτασε την αποτελεσματικότητα εμπορικών και υπό ανάπτυξη βιολογικών σκευασμάτων κατά του ωιδίου (*Erysiphe necator*), της τεφράς σήψης (*Botrytis cinerea*) και της μαύρης σήψης (*Aspergillus carbonarius*) σε αμπέλια.

Σε αμπελώνα της Αλεξάνδρειας Ημαθίας, όλα τα βιολογικά σκευάσματα που αξιολογήθηκαν (Mix BIO, Skim Milk, Septum, Terranum) μείωσαν τη σοβαρότητα και την ένταση του ωιδίου σε φύλλα και βότρες. Στα φύλλα, τα Mix BIO και Skim Milk ήταν πιο αποτελεσματικά, ενώ στους βότρες το Mix BIO, Terranum και Skim Milk. Παρόμοια, στη μαύρη σήψη, όλα τα σκευάσματα επέδειξαν θετική δράση, με τα Mix BIO, Terranum και Skim Milk να είναι πιο αποτελεσματικά στη σοβαρότητα, μειώνοντας την ένταση της ασθένειας κατά 13–37%. Η εφαρμογή MIX BIO περιελάμβανε μικροβιακά φυτοπροστατευτικά προϊόντα (*Amylo X - Bacillus amyloliquefaciens*, *Serenade - Bacillus amyloliquefaciens*, *Polyversum- Pythium oligandrum*) και βιοδιεγέρτες (*Fytosave - cos-oga*, *Romeo-cerevisane*, *Limocide-orange oil*). Εφαρμόστηκαν επίσης τα σκευάσματα Septum (φυτικό εκχύλισμα *Equisetum* sp.), Terranum (βιολογικό μυκητοκτόνο, με βάση τη λεκιθίνη) και αποβουτυρωμένο γάλα (skim milk).

Πέντε στελέχη βακτηρίων και πέντε ζυμών από αμπελώνες της Σαντορίνης, καθώς και κομποστοποιημένα προϊόντα, αξιολογήθηκαν σε *in vitro* και *in planta* πειράματα. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα βακτηριακά στελέχη BS57, BS63, BS48 ήταν πιο αποτελεσματικά *in vitro*, μέσω πιθανών παραγωγής αντιμικροβιακών ενώσεων και αντιβιοτικών, ενώ τα στελέχη ζυμών YS55, YS137, YS44 επέδειξαν ανώτερη δράση σε ράγες αμπέλου, ανταγωνίζοντας το παθογόνο *B. cinerea* για χώρο και θρεπτικά συστατικά. Τα στελέχη ζυμών μείωσαν την κονιδιογένεση κατά 30–65% και ανέστειλαν αποτελεσματικά τον *B. cinerea*. Σχετικά με τον *A. carbonarius*, σχεδόν όλοι οι βιολογικοί παράγοντες μείωσαν την παραγωγή ωχρατοξίνης A (με μέγιστο 45%), ενώ όλοι ανέστειλαν την κονιδιογένεση.

## 4 ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι

### Βιβλιογραφικές Αναφορές

- Alkan, N., & Fortes, A. M. (2015). Insights into molecular and metabolic events associated with fruit response to post-harvest fungal pathogens. *Frontiers in Plant Science*, 6. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00889>
- Amellal, N., Bartoli, F., Villemin, G., Talouizte, A., & Heulin, T. (1999). Effects of inoculation of EPS-producing *Pantoea agglomerans* on wheat rhizosphere aggregation. *Plant and Soil*, 211(1), 93–101. <https://doi.org/10.1023/A:1004403009353>
- Cawoy, H., Debois, D., Franzil, L., De Pauw, E., Thonart, P., & Ongena, M. (2015). Lipopeptides as main ingredients for inhibition of fungal phytopathogens by *Bacillus subtilis/amyloliquefaciens*. *Microbial Biotechnology*, 8(2), 281–295. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12238>
- Chang, W.-T., Chen, Y.-C., & Jao, C.-L. (2007). Antifungal activity and enhancement of plant growth by *Bacillus cereus* grown on shellfish chitin wastes. *Bioresource Technology*, 98(6), 1224–1230. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.05.005>
- Chassot, C., Buchala, A., Schoonbeek, H., Métraux, J., & Lamotte, O. (2008). Wounding of Arabidopsis leaves causes a powerful but transient protection against *Botrytis* infection. *The Plant Journal*, 55(4), 555–567. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03540.x>
- Di Canito, A., Mateo-Vargas, M. A., Mazzieri, M., Cantoral, J., Foschino, R., Cordero-Bueso, G., & Vigentini, I. (2021). Di Canito, A.; Mateo-Vargas, M.A.; Mazzieri, M. The Role of Yeasts as Biocontrol Agents for Pathogenic Fungi on Postharvest Grapes: A Review. *Foods* 2021, 10, 1650. *Foods*, 10(7), 1650. <https://doi.org/10.3390/foods10071650>
- Droby, S., Wisniewski, M., Teixidó, N., Spadaro, D., & Jijakli, M. H. (2016). The science, development, and commercialization of postharvest biocontrol products. *Postharvest Biology and Technology*, 122, 22–29. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2016.04.006>
- Glazebrook, J. (2005). Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 43(1), 205–227. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.43.040204.135923>
- Haidar, R., Fermaud, M., Calvo-Garrido, C., Roudet, J., & Deschamps, A. (2016). Modes of action for biological control of *Botrytis cinerea* by antagonistic bacteria. *Phytopathologia Mediterranea, Preprint Articles*. [https://doi.org/10.14601/Phytopathol\\_Mediterr-18079](https://doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-18079)
- Hamdache, A., Ezziyyani, M., & Lamarti, A. (2018). Effect of preventive and simultaneous inoculations of *Bacillus amyloliquefaciens* (Fukumoto) strains on

conidial germination of *Botrytis cinerea* Pers.:Fr. *Anales de Biología*, 40, 65–72.  
<https://doi.org/10.6018/analesbio.40.08>

Hilber-Bodmer, M., Schmid, M., Ahrens, C. H., & Freimoser, F. M. (2017). Competition assays and physiological experiments of soil and phyllosphere yeasts identify *Candida subhashii* as a novel antagonist of filamentous fungi. *BMC Microbiology*, 17(1), 4. <https://doi.org/10.1186/s12866-016-0908-z>

Koiwa, H., Bressan, R. A., & Hasegawa, P. M. (1997). Regulation of protease inhibitors and plant defense. *Trends in Plant Science*, 2(10), 379–384. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(97\)90052-2](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(97)90052-2)

Lindow, S. E., & Brandl, M. T. (2003). Microbiology of the Phyllosphere. *Applied and Environmental Microbiology*, 69 (4), 1875–1883. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.4.1875-1883.2003>

Ongena, M., & Jacques, P. (2008). Bacillus lipopeptides: Versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends in Microbiology*, 16(3), 115–125. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2007.12.009>

Parafati, L., Vitale, A., Polizzi, G., Restuccia, C., & Cirvilleri, G. (2016). Understanding the mechanism of biological control of postharvest phytopathogenic moulds promoted by food isolated yeasts. *Acta Horticulturae*, 1144, 93–100. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2016.1144.13>

Pearce, G., Strydom, D., Johnson, S., & Ryan, C. A. (1991). A Polypeptide from Tomato Leaves Induces Wound-Inducible Proteinase Inhibitor Proteins. *Science*, 253(5022), 895–897. <https://doi.org/10.1126/science.253.5022.895>

Roca-Couso, R., Flores-Félix, J. D., & Rivas, R. (2021). Mechanisms of Action of Microbial Biocontrol Agents against *Botrytis cinerea*. *Journal of Fungi*, 7(12), 1045. <https://doi.org/10.3390/jof7121045>

Ryan, C. A. (1992). The search for the proteinase inhibitor-inducing factor, PIIF. *Plant Molecular Biology*, 19(1), 123–133. <https://doi.org/10.1007/BF00015610>

Sipiczki, M. (2016). Overwintering of Vineyard Yeasts: Survival of Interacting Yeast Communities in Grapes Mummified on Vines. *Frontiers in Microbiology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00212>

Spoel, S. H., Johnson, J. S., & Dong, X. (2007). Regulation of tradeoffs between plant defenses against pathogens with different lifestyles. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(47), 18842–18847. <https://doi.org/10.1073/pnas.0708139104>

Sun, L., Cheng, L., Ma, Y., Lei, P., Wang, R., Gu, Y., Li, S., Zhang, F., & Xu, H. (2022). Exopolysaccharides from *Pantoea alhagi* NX-11 specifically improve its root colonization and rice salt resistance. *International Journal of Biological Macromolecules*, 209, 396–404. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.04.015>

Tiru, M., Muleta, D., Berecha, G., & Adugna, G. (2013). Antagonistic Effects of Rhizobacteria Against Coffee Wilt Disease Caused by *Gibberella xylarioides*. *Asian Journal of Plant Pathology*, 7(3), 109–122. <https://doi.org/10.3923/ajppaj.2013.109.122>

Περιβολάρης Δημήτρης, 2024. Βιολογική αντιμετώπιση του ωχρατοξικογόνου μύκητα *Aspergillus carbonarius* με τη χρήση επιφυτικών βακτηρίων και ζυμών σε σταφύλια. Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία, Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.