



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

Παραδοτέο Π.4.6.1: Έκθεση αξιολόγησης της αποτελεσματικότητας των μεταβολιτών και των κυττάρων των υπό δοκιμή βακτηρίων στους κομβοηματοώδεις

Πληροφορίες για το έγγραφο

Αριθμός παραδοτέου: **Π.4.6.1**

Ενότητα εργασίας: **ΕΕ4**

Επικεφαλής δικαιούχος: **[ΓΠΑ]**

Συγγραφείς: **[Γιαννακού Ιωάννης]**

Έκδοση: **1**

Είδος Παραδοτέου: **[Έκθεση]**

Ημερομηνία παράδοσης: **[15/05/2025]**

Στοιχεία Πράξης

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

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

Κωδικός πράξης: ΤΑΕΔΡ-0535675

Ακρωνύμιο έργου: InnoPP

Ημερομηνία έναρξης: 15 Μαΐου 2023

Διάρκεια: 28 Μήνες

Συντονιστής Φορέας: Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Συντονιστής/ Επιστημονικός Υπεύθυνος: Ιωάννης Βόντας

Πίνακας Περιεχομένων

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

Περίληψη του Έργου

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

Σύνοψη της ΕΕ4

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

Συνοπτική παρουσίαση του παραδοτέου Π4.6.1

Σκοπός του παραδοτέου Π4.6.1 είναι να γίνει μία έκθεση στην οποία θα αναφέρονται τα αποτελέσματα της αξιολόγησης της αποτελεσματικότητας των μεταβολιτών και των κυττάρων μιας σειράς βακτηρίων εναντίον των κομβονηματωδών. Για την επίτευξη αυτού του στόχου έχουν επιλεγθεί συγκεκριμένα είδη βακτηρίων με βάση τη βιβλιογραφική έρευνα που έχει πραγματοποιηθεί και την ερευνητική εμπειρία της ομάδας εργασίας. Συγκεκριμένα η έρευνα αφορά στα είδη *Bacillus firmus*, *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis*, *B. cereus*, *B. licheniformis*, *B. velezensis*, *B. pumilus*, *B. flexus*, *B. mojavensis*, *B. methyltrophicus*, *Pseudomonas fluorescens*, *P. polymyxa*, *P. aeuruginosa* τα οποία θα δοκιμαστούν εναντίον διαφορετικών βιολογικών σταδίων των κομβονηματωδών.

Η πρόοδος των εργασιών στο πλαίσιο του ΠΕ 4.6 κρίνεται ικανοποιητική και είναι εντός του αρχικού στόχου που έχει τεθεί.

Συνοπτικά, τα σημαντικότερα αποτελέσματα στο πλαίσιο του Π4.6.1 είναι τα εξής:

- Από το σύνολο των ειδών βακτηρίων και των στελεχών που δοκιμάστηκαν τα

καλύτερα αποτελέσματα ελήφθησαν με τη χρήση των βακτηρίων και των μεταβολιτών τους από ορισμένα στελέχη του *Bacillus halotolerans*.

- Τα εμπορικά σκευάσματα που δοκιμάστηκαν σε πείραμα σε γλάστρες έδωσαν σημαντική μείωση του πληθυσμού των κομβονηματοδών.
- Σε παραγωγικά θερμοκήπια η χρήση σκευασμάτων που περιείχαν PGPR δεν έδωσε ικανοποιητικό επίπεδο αντιμετώπισης των κομβονηματοδών σε έδαφος με φυσικό πληθυσμό. Ενδεχομένως η θερμοκρασία του εδάφους δεν ήταν η ενδεδειγμένη για τη δράση των μικροοργανισμών που περιέχονται σε αυτά.

1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΣΤΟΧΟΙ

-Εισαγωγή

Οι κομβοηματοδεις αποτελούν σημαντικά παράσιτα των λαχανοκομικών φυτών ιδιαίτερος αυτών που αναπτύσσονται εντός θερμοκηπίων. Η μείωση των διαθέσιμων εμπορικών σκευασμάτων έχει οδηγήσει τους ερευνητές στη χρήση νέων μεθόδων αντιμετώπισης των επιζήμιων νηματωδών. Βακτήρια τα οποία παράγουν μεταβολίτες οι οποίοι προκαλούν ανάσχεση του βιολογικού κύκλου των κομβοηματοδών έχουν δείξει σημαντικά αποτελέσματα σε συνθήκες εργαστηρίου. Για την επίτευξη του στόχου του ΠΕ 4.6.1 έχουν επιλεγθεί συγκεκριμένα βακτήρια με βάση τη βιβλιογραφική έρευνα που έχει πραγματοποιηθεί και την ερευνητική εμπειρία της ομάδας εργασίας. Συγκεκριμένα η έρευνα αφορά είτε σε απομονώσεις βακτηρίων τα οποία αποτελούν τη βάση για εμπορικά σκευάσματα όπως είναι το *Bacillus firmus*, *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis*, *B. cereus*, *B. licheniformis*, *B. velezensis*, *B. pumilus*, *Pseudomonas fluorescens*, *P. aeruginosa* είτε απομονώσεις από τις προσωπικές συλλογές του Καθ. Π. Σαρρή και της Δρ Α. Βενιεράκη, τα οποία θα δοκιμαστούν εναντίον διαφορετικών βιολογικών σταδίων των κομβοηματοδών. Επίσης χρησιμοποιήθηκαν έτοιμα εμπορικά σκευάσματα τα οποία περιέχουν συνδυασμό των προαναφερθέντων βακτηρίων μαζί με άλλους βιολογικούς παράγοντες σε πειράματα με τομάτες σε γλάστρες και σε παραγωγικά θερμοκήπια.

-Σκοπός του παρόντος εγγράφου

Σκοπός του παρόντος εγγράφου είναι η λεπτομερής περιγραφή των στόχων του συγκεκριμένου ΠΕ 4.6.1, των υλικών και μεθόδων που χρησιμοποιήθηκαν ώστε να επιτευχθούν οι στόχοι που έχουν τεθεί εξ αρχής, η λεπτομερής παρουσίαση των αποτελεσμάτων που έχουν προκύψει και εν κατακλείδι η παρουσίαση των συμπερασμάτων.

- Δομή του παρόντος εγγράφου

Περιγράφονται αναλυτικά τα υλικά και οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν για το κάθε πείραμα. Στη συνέχεια παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που έχουν προκύψει ενώ οι πίνακες των αποτελεσμάτων παρουσιάζονται στο Παράρτημα του αρχείου. Στο τέλος του κειμένου παρουσιάζονται επιγραμματικά τα σημαντικότερα συμπεράσματα που έχουν προκύψει.

2 ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΩΝ ΕΡΓΑΣΙΩΝ

2.1 Υλικά και Μέθοδοι

Διατήρηση πληθυσμών νηματωδών

Ο πληθυσμός του *M. javanica*, αρχικά παραλήφθηκε υπό τη μορφή μολυσμένων ριζών καλλιέργειας τομάτας και στη συνέχεια αναπτύχθηκε σε φυτά τομάτας (*Solanum lycopersicum* L.) ποικιλίας Belladonna (Εικ. 2.1), η οποία θεωρείται ιδιαίτερα ευαίσθητη στην προσβολή από κομβονηματώδεις, στο θερμοκήπιο του Εργαστηρίου Γεωργικής Ζωολογίας και Εντομολογίας καθόλη τη διάρκεια των πειραμάτων. Τα φυτά που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη του πληθυσμού των κομβονηματωδών, τοποθετήθηκαν σε θερμοκήπιο στους $25 \pm 2^\circ\text{C}$ και 16 ώρες φωτοπερίοδο σε πλαστικά φυτοδοχεία (ύψους 9 cm και διαμέτρου 8 cm) που περιείχαν κόμποστ με βάση την τύρφη. Η μόλυνση των φυτών με προνύμφες (J2) έγινε έξι εβδομάδες μετά τη μεταφύτευση, και όταν τα σπορόφυτα βρίσκονταν στο στάδιο των 6-8 πραγματικών φύλλων. Αυτό το στάδιο ανάπτυξης αντιστοιχούσε σε καλά ανεπτυγμένο ριζικό σύστημα των φυτών ικανό να φιλοξενήσει τους νηματώδεις καθώς ενδείκνυται για την καλύτερη ανάπτυξη και αναπαραγωγή τους. Οι συνθήκες αυτές διατηρήθηκαν σε αυτά τα επίπεδα για όλη τη διάρκεια των πειραμάτων. Μετά την πάροδο σαράντα ημερών, οι ρίζες των φυτών πλύθηκαν για να απομακρυνθούν τα υπολείμματα του εδάφους και τεμαχίστηκαν σε κομμάτια των 2 cm. Ακολούθησε τοποθέτηση των ριζών σε διάλυμα 1 % NaOCl και το αιώρημα ανακινήθηκε για πέντε λεπτά. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε πλύση σε τρεχούμενο νερό μέσα από κόσκινο διατομής 250 και 38 μm (Hussey and Barker, 1973), παραλαβή των ωών των νηματωδών και τέλος μεταφορά σε τροποποιημένα δοχεία Baermann στους $27 \pm 1^\circ\text{C}$. Συγκεκριμένα, το υδατικό εκχύλισμα, το οποίο περιείχε τα ωά των νηματωδών, τοποθετήθηκε σε διηθητικό χαρτί μέσα σε κόσκινο (μεγέθους οπών 2mm) που στερεώθηκε σε πλαστικό δίσκο γεμάτο με απεσταγμένο νερό ώστε η ελεύθερη επιφάνεια του νερού να εφάπτεται με την κάτω επιφάνεια του κόσκινου. Ο πλαστικός δίσκος ο οποίος περιείχε το κόσκινο καλύφθηκε με δίσκο ίδιων διαστάσεων ώστε να αποφευχθεί η εξάτμιση του νερού. Ο όγκος του νερού ελεγχόταν και συμπληρωνόταν ώστε το διηθητικό χαρτί με τα ωά των νηματωδών να βρίσκεται συνεχώς σε άμεση επαφή με το νερό. Όλες οι προνύμφες που εκκολάφθηκαν τις δύο πρώτες ημέρες απορρίφθηκαν, λόγω της μεταξύ τους διαφοράς ως προς την ηλικία, ενώ εκείνες που συλλέχθηκαν μετά από 24 ώρες χρησιμοποιήθηκαν στις βιολογικές δοκιμές. Από αυτό το σημείο και έπειτα αναφορά σε J2 στο κείμενο σημαίνει προνύμφες δευτέρου σταδίου ανάπτυξης και ηλικίας μικρότερης των δυο ημερών.

Ανάπτυξη μεταβολιτών από βακτηριακά στελέχη

Τα βακτηριακά στελέχη που συμμετείχαν στην μελέτη δράσης έναντι νηματωδών των φυτών, διατηρούνται σε καθαρές καλλιέργειες σε τράπεζα στο εργαστήριο Γεωργικής Ζωολογίας και Εντομολογίας και στο Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, και αντίστοιχα στις εγκαταστάσεις του ΕΛΜΕΠΑ στο εργαστήριο του Καθ. Π. Σαρρή, ενώ οι μονές αποικίες αυτών βρίσκονται σε stock (υδατικό διάλυμα 30% γλυκερόλης) σε βαθιά κατάψυξη (-80 °C). Τα βακτήρια αναπτύσσονταν σε στερεά θρεπτικά μέσα (Nutrient Agar) μετά από επώαση στους 30 °C για 24 ώρες. Μονήριες αποικίες αυτών, επιλέχθηκαν για τον εμβολιασμό υγρού μέσου ανάπτυξης που περιείχε σε αναλογία 1:1 Nutrient Broth και R2A αντίστοιχα. Ύστερα από επώαση 24 ωρών σε 180 στροφές το λεπτό (rpm), ακολουθούσε φυγοκέντρηση της καλλιέργειας για 10 λεπτά στις 7000 στροφές το λεπτό. Στη συνέχεια, το υπερκείμενο φυλάχθηκε στους 4°C, ώστε να ακολουθήσει η αξιολόγηση ενώ τα κύτταρα απομακρύνθηκαν με τη βοήθεια φυγοκέντρου ή με τη χρήση μικροφίλτρων.

Βιοδοκιμές με χρήση προνυμφών

Τα διαλύματα αρχικά παρασκευάστηκαν σε συγκεντρώσεις διπλάσιες των συγκεντρώσεων ελέγχου και στη συνέχεια αναμίχθηκαν με το αιώρημα νηματωδών, στα πηγάδια της πλάκας πολυστυρενίου σε αναλογία 1:1 (v/v), δηλαδή προστέθηκαν 0,5 ml διαλύματος του κάθε μεταβολίτη και 0,5 ml διαλύματος νηματωδών σε κάθε πηγάδι. Οι τελικές συγκεντρώσεις της στρεπτομυκίνης και του captan δεν υπερέβησαν ποτέ τα 125 ppm και τα 12 ppm αντίστοιχα, αφού αυτά τα επίπεδα συγκεντρώσεων και με βάση τα προκαταρκτικά πειράματα, είναι κατάλληλα ώστε να μην προκαλούν θνησιμότητα στις προνύμφες των νηματωδών αλλά παράλληλα μειώνουν (τουλάχιστον τις πρώτες 48 ώρες) την ανάπτυξη ανεπιθύμητων μυκήτων και βακτηρίων στα πηγάδια ελέγχου. Ως μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν είτε καθαρό νερό είτε διάλυμα του Nutrient Broth που χρησιμοποιήθηκε για την ανάπτυξη των βακτηρίων. Σε κάθε πηγάδι της πλάκας πολυστυρενίου των 24 πηγαδιών προστέθηκαν περίπου 40 J2 και έπειτα έγινε η εισαγωγή του διαλύματος του μεταβολίτη.

Στην πειραματική διαδικασία που εφαρμόστηκε χρησιμοποιήθηκαν πλάκες πολυστυρενίου Cellstar® 24-πηγαδιών. Οι πλάκες καλύφθηκαν με καπάκι για να αποφευχθεί η εξάτμιση των διαλυμάτων ελέγχου, κάτι που θα είχε ως αποτέλεσμα την διαφοροποίηση των τελικών συγκεντρώσεων των διαλυμάτων ελέγχου, καθώς επίσης και για να αποφευχθούν οι επιμολύνσεις μεταξύ των μεταχειρίσεων. Οι πλάκες τοποθετήθηκαν σε δωμάτιο σταθερών συνθηκών (23 ± 1 °C).

Οι μετρήσεις για την κινητικότητα των προνυμφών έγιναν με παρατήρηση σε ανάστροφο μικροσκόπιο σε μεγέθυνση 100x, κάθε 12, 24 και 48 ώρες από την έναρξη του πειράματος. Οι J2 ταξινομήθηκαν σε δύο κατηγορίες κινητικότητας: κινητές και παράλυτες. Οι προνύμφες παρατηρήθηκαν για 10 δευτερόλεπτα και η απουσία κίνησης γι' αυτό το διάστημα αποτέλεσε ισχυρή ένδειξη της θνησιμότητας των προνυμφών. Οι μεταχειρίσεις επαναλήφθηκαν έξι φορές και το πείραμα πραγματοποιήθηκε στο χρόνο τουλάχιστον δύο φορές. Οποτεδήποτε υπήρχε ανάπτυξη ανεπιθύμητων βακτηρίων στα πηγάδια παρατήρησης τότε το εν λόγω πηγάδι δεν συμμετείχε στην αξιολόγηση του πειράματος διότι αρκετές φορές παρατηρήθηκε ότι η παρουσία επιμολύνσεων από βακτήρια επηρέαζε δυσμενώς την κινητικότητα των προνυμφών.

Πείραμα σε γλάστρες εντός θερμοκηπίου

Στο πείραμα με γλάστρες εντός θερμοκηπίου χρησιμοποιήθηκαν φυτά τομάτας ποικιλίας Belladonna ευαίσθητης στους κομβονηματώδεις. Χρησιμοποιήθηκε σκεύασμα το οποίο περιείχε PGPR και η εφαρμογή πραγματοποιήθηκε σε γλάστρες του 1 λίτρου μετά από 40 ημέρες από τη μεταφύτευση των νεαρών σποροφύτων (4 πραγματικά φύλλα). Η εφαρμογή του σκευάσματος πραγματοποιήθηκε 15 ή 1 ημέρα πριν τη μόλυνση της ριζόσφαιρας με προνύμφες δευτέρου σταδίου. Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε ένα εμπορικό βιολογικό σκεύασμα που περιέχει το μύκητα *P. lilacinum* και ως χημικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε το εμπορικό σκεύασμα που περιέχει τη δραστική ουσία fluopyram. Το πείραμα περατώθηκε μετά από 35 ημέρες παραμονής των φυτών σε θερμοκήπιο σε θερμοκρασία 25°C ± 3 και 16h φωτοπερίοδος. Στις ρίζες των φυτών πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις του αριθμού των θηλυκών νηματωδών ανά γραμμάριο ρίζας και του βαθμού κομβολογιάσματος αυτών.

2.2 Αποτελέσματα και Συζήτηση

Έχουν πραγματοποιηθεί βιοδοκιμές με προνύμφες δευτέρου σταδίου *Meloidogyne javanica* και *M. incognita* και μεταβολίτες από τα βακτήρια *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*, , *Pseudomonas fluorescens*, *B. halotolerans*, *B. thuringiensis* και *Pseudomonas citronellolis*. Επίσης έχουν πραγματοποιηθεί βιοδοκιμές με βακτήρια από τη συλλογή του Καθηγητή Παναγιώτη Σαρρή (τα στελέχη που παρουσιάζονται με κωδικό αριθμό) καθώς και από τη συλλογή της Δρ Αν. Βενιεράκη (όλα τα στελέχη του *B. halotolerans* και οι κωδικοί A4 έως A9). Ορισμένοι από τους μεταβολίτες που δοκιμάστηκαν έχουν δώσει άκρως ενθαρρυντικά αποτελέσματα. Ωστόσο πρέπει να τονιστεί ότι τα αποτελέσματα μετά από βιοδοκιμές με μεταβολίτες από τα ίδια στελέχη

μερικές φορές δίνουν αντικρουόμενα αποτελέσματα. Γίνεται προσπάθεια να περιοριστούν όλοι οι παράγοντες οι οποίοι μπορεί να επηρεάζουν τη παραγωγή των μεταβολιτών ώστε στο τέλος να υπάρξει ένα συγκεκριμένο πρωτόκολλο αναφοράς για πειραματισμό με βακτηριακά στελέχη όσον αφορά την παραγωγή μεταβολιτών για χρήση εναντίον φυτοπαρασιτικών νηματωδών. Ορισμένα αποτελέσματα των παραπάνω βιοδοκιμών παρουσιάζονται στο **πίνακα 1**, ενώ οι δοκιμές με προνύμφες 2^{ου} σταδίου συνεχίζονται. Στο **πίνακα 2** παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από την εφαρμογή του σκευάσματος (1) που περιείχε PGPR (*Pochonia chlamydosporia* + *Arthrobotrys irregularis* + *Glomus* sp). Η χρήση του σκευάσματος με PGPR είχε σημαντική μείωση του αριθμού των θηλυκών νηματωδών στις ρίζες της τομάτας ιδιαίτερα όταν το μόλυσμα ήταν προνύμφες δευτέρου σταδίου και όταν εφαρμόστηκε 15 ημέρες πριν τη μόλυνση του εδάφους με νηματώδεις (15 DBI). Ενδεχομένως αυτό οφείλεται στην αύξηση της ρίζας αφού τα βακτήρια αυτά έχει αποδειχθεί ότι ενεργούν ως PGPR. Επομένως ενώ ο απόλυτος αριθμός των νηματωδών παραμένει παραπλήσιος, όταν γίνεται αναγωγή ανά γραμμάριο ρίζας τότε προκύπτει μείωση του αριθμού των νηματωδών. Ωστόσο μεγαλύτερη μείωση του αριθμού των νηματωδών επετεύχθη με τη χρήση του χημικού σκευάσματος που περιείχε fluorygram είτε όταν ως μόλυσμα χρησιμοποιήθηκαν προνύμφες είτε όταν χρησιμοποιήθηκαν ωά των κομβονηματωδών. Έχουν ήδη πραγματοποιηθεί (είναι σε εξέλιξη) επιπλέον δύο πειράματα με εμπορικά σκευάσματα τα οποία περιέχουν συνδυασμό PGPR με μυκόριζες. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν τα εξής σκευάσματα:

Σκεύασμα 1: *Pochonia chlamydosporia* + *Arthrobotrys irregularis* + *Glomus* sp

Σκεύασμα 2: *Bacillus subtilis* + *Bacillus licheniformis* + *Glomus* sp

Σκεύασμα 3: *Streptomyces avermitilis* + *Pseudomonas* + *Glomus* sp

Οι μικροοργανισμοί που περιέχονται (είτε τα κύτταρά τους είτε οι μεταβολίτες) έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία ότι είναι αποτελεσματικοί όσον αφορά τη μείωση νηματωδολογικών πληθυσμών. Ως χημικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε το σκεύασμα Velum Prime το οποίο περιέχει τη δραστική ουσία fluorygram. Το πείραμα του θερμοκηπίου (παραγωγικό θερμοκήπιο στα Μποντέικα Αχαΐας) έχει ολοκληρωθεί όπως και το πείραμα θερμοκηπίου σε γλάστρες. Και τα δύο πειράματα θα επαναληφθούν κατά την Καλοκαιρινή περίοδο.



Εικόνα 1. Θερμοκήπιο με κάλυψη πλαστικού στη περιοχή Μποντέικα όπου πραγματοποιήθηκε το πείραμα



Εικόνα 2. Φυτά τομάτας με εμφανή συμπτώματα εξαιτίας του παρασιτισμού των ριζών από κομβονηματώδεις.

Από τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στους πίνακες 1 & 2 προκύπτει ότι οι μεταβολίτες από ορισμένα βακτηριακά στελέχη έχουν σημαντική δράση εναντίον των προνυμφών δευτέρου σταδίου των κομβονηματωδών. Ωστόσο από τη σύγκριση συνολικά όλων των αποτελεσμάτων (1^ο και 2^ο έτος πειραματισμού) προκύπτει ότι υπάρχει σημαντική παραλλακτικότητα στη δράση των μεταβολιτών από τα ίδια στελέχη η οποία χρήζει περαιτέρω διερεύνησης. Τα εμπορικά σκευάσματα που δοκιμάστηκαν σε πειράματα σε γλάστρες έδωσαν ικανοποιητικά αποτελέσματα όσον αφορά τη μείωση της προσβολής από κομβονηματώδεις. Ωστόσο η χρήση των ίδιων σκευασμάτων σε παραγωγικό θερμοκήπιο δεν έδωσε αντίστοιχα αποτελέσματα. Αυτό μπορεί να οφείλεται στη χαμηλή θερμοκρασία εδάφους που επικρατεί κατά τους χειμερινούς μήνες στο θερμοκήπιο. Θα πρέπει το πείραμα να επαναληφθεί κατά την Καλοκαιρινή περίοδο όταν οι συνθήκες είναι καλύτερες για την εγκατάσταση και ανάπτυξη των βιολογικών παραγόντων.

3 ΣΥΝΟΨΗ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Έχουν πραγματοποιηθεί βιοδοκιμές με προνύμφες δευτέρου σταδίου κομβονηματοδών με αρκετά διαλύματα μεταβολιτών από μια σειρά βακτηριακών στελεχών. Έχουν χρησιμοποιηθεί βακτηριακά στελέχη τα οποία απομονώθηκαν από εμπορικά σκευάσματα και υπήρχαν στις βιβλιοθήκες του Γ.Π.Α. καθώς επίσης και βακτηριακά στελέχη τα οποία απομονώθηκαν από φυσικά περιβάλλοντα και υπάρχουν στις συλλογές των συναδέλφων Καθ. Παναγιώτη Σαρρή και Δρ Αναστασία Βενιεράκη. Οι μεταβολίτες από τις απομονώσεις του Καθ. Σαρρή δεν έδωσαν σημαντικά αποτελέσματα όσον αφορά τη δράση τους εναντίον των κομβονηματοδών. Ορισμένες απομονώσεις από εμπορικά σκευάσματα έδειξαν ικανοποιητική δράση εναντίον των προνυμφών των κομβονηματοδών. Ωστόσο τα καλύτερα αποτελέσματα ελήφθησαν όταν χρησιμοποιήθηκαν μεταβολίτες από ορισμένα στελέχη του *Bacillus halotolerans* τα οποία έχουν απομονωθεί και αναπτύσσονται από τη Δρ Βενιεράκη. Έγινε προσπάθεια να ελεγχθούν πλήρως οι συνθήκες ανάπτυξης των βακτηρίων και κατ' επέκταση των μεταβολιτών που λαμβάνονταν ώστε να επιτευχθεί επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων. Ωστόσο ορισμένες φορές παρατηρήθηκε υψηλή παραλλακτικότητα στα αποτελέσματα που λαμβάνονταν η οποία δεν μπορούσε να εξηγηθεί και χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση. Ενθαρρυντικά αποτελέσματα ελήφθησαν από τη χρήση εμπορικών σκευασμάτων που περιείχαν PGPR. Η αποτελεσματικότητα αυτών των σκευασμάτων ήταν περισσότερο εμφανής σε πειράματα σε γλάστρες συγκριτικά με αυτά που πραγματοποιήθηκαν σε παραγωγικό θερμοκήπιο. Το σκεύασμα που περιείχε συνδυασμό του *Bacillus subtilis* με το *Bacillus licheniformis* (sublic) έδωσε τα καλύτερα αποτελέσματα μεταξύ των βιολογικών σκευασμάτων.

Συμπεράσματα

- Σημαντική μείωση της κινητικότητας των προνυμφών δευτέρου σταδίου και αύξηση θανάτωσής τους προϊόντος του χρόνου καταγράφηκε με τη χρήση μεταβολιτών του *B. halotolerans* η οποία ήταν εφάμιλλη ή ακόμη και καλύτερη συγκριτικά με εμπορικά σκευάσματα.
- Η αύξηση της περιεκτικότητας των μεταβολιτών και του χρόνου έκθεσης σε αυτούς έχουν αναλογική αύξηση του ποσοστού θανάτωσης των προνυμφών.
- Καλύτερα αποτελέσματα καταγράφηκαν όταν χρησιμοποιήθηκαν εμπορικά βιολογικά σκευάσματα σε γλάστρες σε σύγκριση με πείραμα σε παραγωγικό θερμοκήπιο.

4 ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι

species	Incubation time							
	24h				48h			
	50%	25%	10%	1%	50%	25%	10%	1%
<i>Bacillus licheniformis</i>	27,45%	0%	NA	NA	63,85%	40,67%	NA	NA
	0%	0,16%	NA	NA	3%	14,26%	NA	NA
<i>Bacillus thuringiensis</i>	52,45%	23,67%	NA	NA	92,77%	35,27%	NA	NA
835	5,88%	2,54%	NA	NA	29,57%	14,93%	NA	NA
810	0,87%	2,45%	NA	NA	43,15%	32,45%	NA	NA
769	4,46%	0,81%	NA	NA	14,15%	9,31%	NA	NA
764	0,40%	0,37%	NA	NA	10,40%	5,36%	NA	NA
689	0,40%	1%	NA	NA	6,49%	5,07%	NA	NA
987	0%	0%	NA	NA	100%	100%	NA	NA
1126	0,82%	0,65%	NA	NA	100%	100%	NA	NA
969	6,17%	0,32%	NA	NA	100%	100%	NA	NA
973	0%	0,40%	NA	NA	96,92%	91%	NA	NA
<i>B. halotolerans</i> Hil 4	7,64%	2,60%	NA	NA	34,13%	19,60%	NA	NA
<i>B. halotolerans</i> Cal + 4	1,90%	0,21%	NA	NA	17%	9,37%	NA	NA
<i>B. halotolerans</i> Cal 30 (A1)	51,09%	26,08%	16,24%	4,94%	70,38%	46,95%	47,55	12,35
<i>B. halotolerans</i> Cal 30 (A1)	99,28%	100%	13,88%	2,00%	100%	99,58%	28,06%	6,09%
<i>B. halotolerans</i> Cal 30 (A1)	97,11%	90,12%	85,69%	52,36%	100%	92,64%	97,36%	77,22%
<i>P. fluorescens</i>	0,50%	0,41%	NA	NA	26,03%	2,11%	NA	NA
<i>P. fluorescens</i>	2,63%	0,52%	NA	NA	50%	0,74%	NA	NA
<i>B. amyloliquefaciens</i>	0%	32%	NA	NA	0,33%	1,98%	NA	NA
<i>B. amyloliquefaciens</i>	0,50%	1,45%	NA	NA	100%	100%	NA	NA
<i>B. halotolerans</i> A4	62,38%	43,70%	NA	NA	100%	94%	NA	NA
<i>B. halotolerans</i> A4	84,97%	91,64%	77,20%	23,36%	100%	98,75%	95,24%	52,12%
<i>B. halotolerans</i> A2	58,31%	41,28%	NA	NA	95,50%	99,59%	NA	NA
<i>B. halotolerans</i> A2	99,53%	75,77%	NA	NA	100%	98,72%	NA	NA
<i>B. halotolerans</i> A6	99,52%	100%	11,76%	1,67%	100%	100%	48,86	1,57
<i>B. halotolerans</i> A6	98,24%	95,90%	NA	NA	100%	95,44%	NA	NA
<i>B. halotolerans</i> A8	95,74%	99,63%	NA	NA	100%	100%	NA	NA
<i>B. halotolerans</i> A8	88,55%	98,59%	NA	NA	91,17%	100%	NA	NA
<i>B. halotolerans</i> A5	93,23%	85,46%	NA	NA	100%	99,53%	NA	NA
<i>B. halotolerans</i> A5	100%	100%	NA	NA	100%	100%	NA	NA
<i>B. halotolerans</i> A9	96,96%	82,33%	12,80%	0,95%	100%	85,48%	25,08%	7,94%
689 50%	11,11%	16,66%	NA	NA	18,51%	48,71%	NA	NA
R2A 50%	99,14%	67,57%	NA	NA	99,18%	88,96%	NA	NA
810 25%	6,42%	3,20%	NA	NA	24,06%	22,51%	NA	NA
764 25%	20,17%	7,91%	NA	NA	27,33%	21,33%	NA	NA
<i>P. citronellolis</i>	0,33%	2,03%	NA	NA	8,20%	16,73%	NA	NA

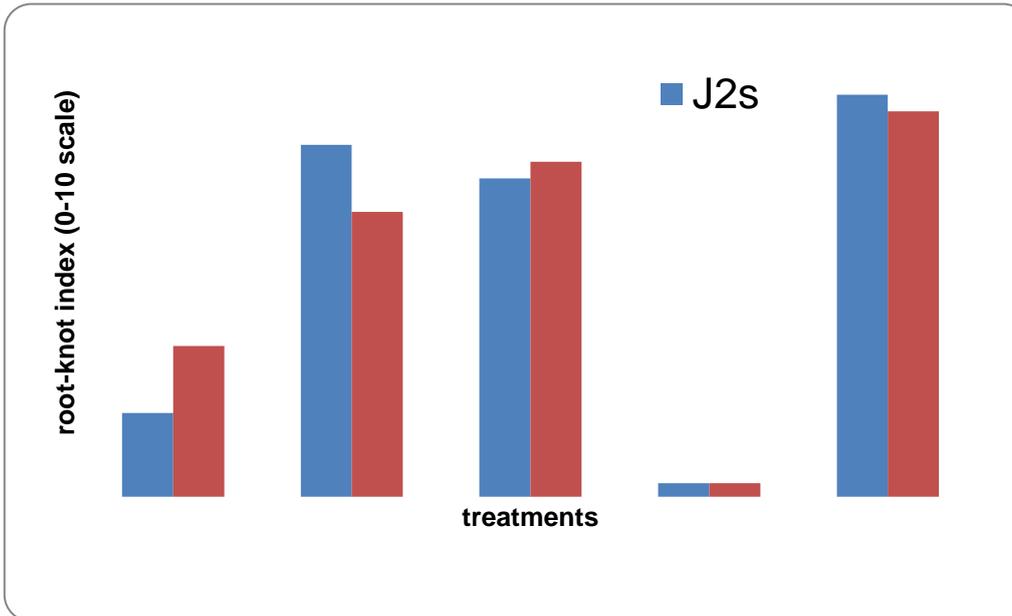
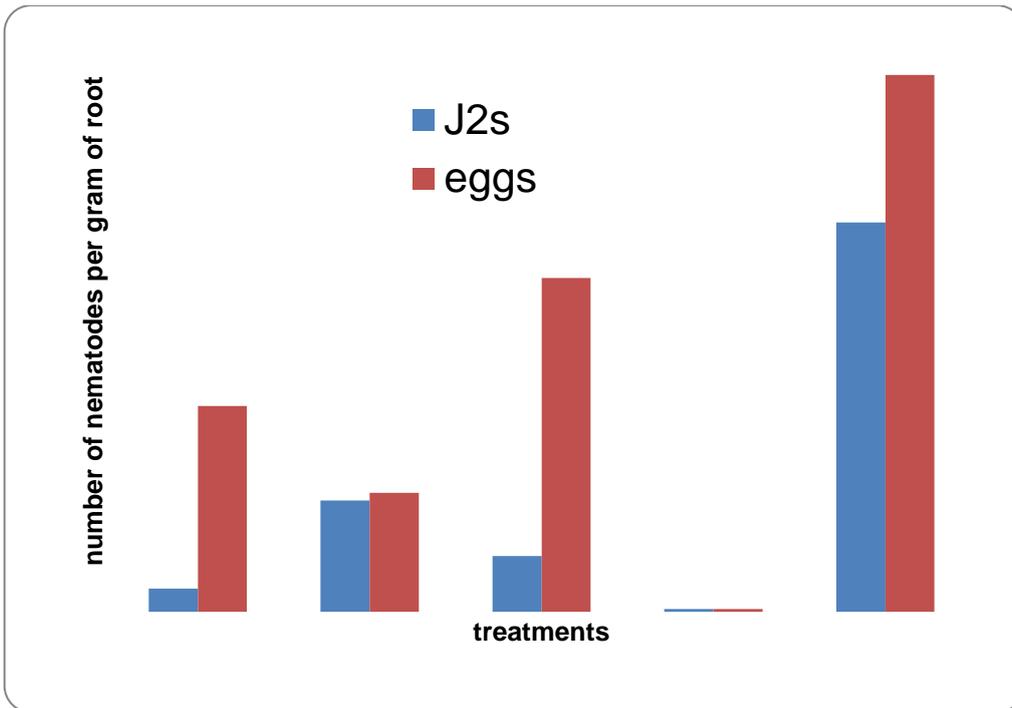
Πίνακας 1. Ποσοστό θανάτωσης των J2s του *M. javanica* μετά από επώαση για διαφορετικούς χρόνους και διαφορετικής περιεκτικότητας μεταβολίτες από διαφορετικά βακτηριακά στελέχη.

species	metabolites			
	12h			
	50%	25%	10%	1%
<i>B. amyloliquefaciens</i>	100%	1,50%	1,59%	1,50%
<i>B. Pumilus</i>	100%	97%	15%	5%
<i>B. firmus</i>	100%	1,5%	1,6%	1,52%
<i>B. licheniformis</i>	100%	79,14%	16,33%	2,86%
<i>B. thurigiensis</i>	99,67%	85,05%	40,98%	7,36%
<i>B. subtilis</i>	100,00%	100,00%	50,00%	61,84%
<i>P. fluorescens</i>	100,00%	100,00%	42,11%	85,92%
<i>Delftia spp.</i>	100,00%	43,40%	57,18%	70,94%
A88	76,35%	18,36%	6,35%	2,02%
A14	78,55%	18,52%	4,78%	0,00%
AA1	4,31%	1,52%	0,00%	0,00%
AA2	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
AB1	2,85%	0,00%	0,00%	0,00%
AA1	12,90%	1,20%	0,00%	0,00%
AA2	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
AB1	0,20%	0,00%	0,00%	0,00%
<i>hil 4</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Cal + 4</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
<i>C 30</i>	10,36%	0,00%	0,00%	0,00%
A5	17,54%	4,68%	0,00%	0,00%
A8	13,12%	0,00%	0,00%	0,00%
A9	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%

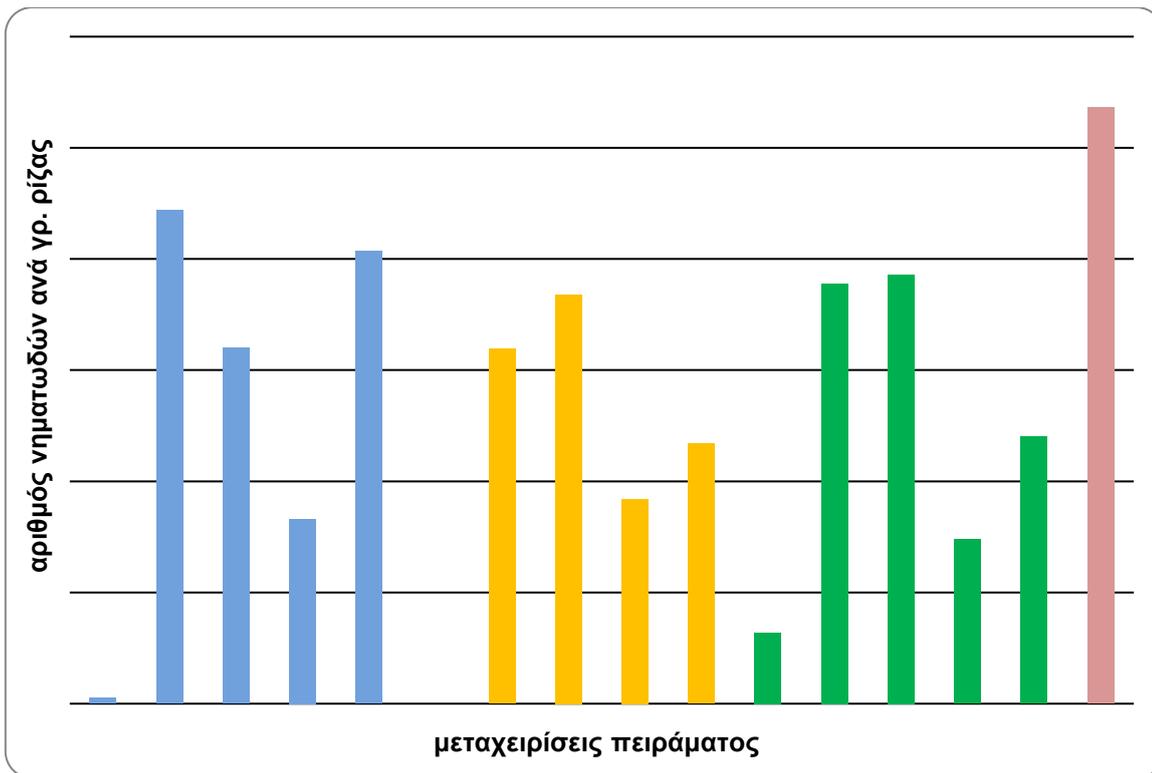
species	metabolites			
	24h			
	50%	25%	10%	1%
<i>B. amyloliquefaciens</i>	100,00%	5,77%	2,95%	1,43%
<i>B. Pumilus</i>	100,00%	97,97%	64,39%	18,30%
<i>B. firmus</i>	100,00%	100,00%	29,63%	17,16%
<i>B. licheniformis</i>	100,00%	100,00%	58,97%	15,15%
<i>B. thurigiensis</i>	100,00%	100,00%	79,23%	35,46%
<i>B. subtilis</i>	100,00%	100,00%	85,74%	74,68%
<i>P. fluorescens</i>	100,00%	100,00%	91,33%	89,37%
<i>Delftia spp.</i>	100,00%	86,90%	67,31%	76,47%
A88	90,00%	51,03%	25,20%	2,74%
A14	85,50%	55,20%	26,30%	3,56%
AA1	4,65%	1,85%	0,00%	0,00%
AA2	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
AB1	10,10%	0,00%	0,00%	0,00%
AA1	49,25%	20,50%	8,60%	0,00%
AA2	46,31%	19,42%	3,92%	0,00%
AB1	28,50%	12,56%	2,05%	0,00%
<i>hil 4</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Cal + 4</i>	7,69%	0,00%	0,00%	0,00%
<i>C 30</i>	95,00%	15,00%	0,00%	0,00%
A5	90,50%	36,85%	1,56%	0,00%
A8	35,25%	0,00%	0,00%	0,00%
A9	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%

species	metabolites			
	48h			
	50%	25%	10%	1%
<i>B. amyloliquefaciens</i>	100,00%	4,20%	1,53%	3,40%
<i>B. Pumilus</i>	100,00%	100,00%	93,90%	73,50%
<i>B. firmus</i>	100,00%	100,00%	76,37%	70,53%
<i>B. licheniformis</i>	100,00%	100,00%	100,00%	26,50%
<i>B. thurigiensis</i>	100,00%	100,00%	84,90%	36,00%
<i>B. subtilis</i>	100,00%	100,00%	100,00%	97,21%
<i>P. fluorescens</i>	100,00%	100,00%	99,20%	97,01%
<i>Delftia spp.</i>	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%
A88	100,00%	100,00%	86,54%	94,78%
A14	100,00%	98,65%	85,00%	3,22%
AA1	36,70%	14,35%	0,00%	0,00%
AA2	31,25%	12,45%	0,78%	0,00%
AB1	36,80%	12,52%	5,23%	2,10%
AA1	90,10%	80,10%	14,85%	8,40%
AA2	91,03%	70,64%	15,76%	4,95%
AB1	81,21%	26,19%	10,89%	4,80%
<i>hil 4</i>	8,52%	5,44%	2,52%	4,44%
<i>Cal + 4</i>	60,50%	20,00%	6,15%	4,62%
<i>C 30</i>	100,00%	100,00%	81,00%	29,25%
A5	95,50%	100,00%	100,00%	92,15%
A8	65,75%	15,68%	3,52%	1,56%
A9	79,85%	24,50%	4,23%	0,72%

Πίνακας 2. Ποσοστό θανάτωσης των J2s του *M. javanica* μετά από επώαση για 12, 24 και 46h σε μεταβολίτες διαφορετικής περιεκτικότητας οι οποίοι προήλθαν από διαφορετικά στελέχη βακτηρίων.



Γράφημα 1. Επίδραση του βιολογικού σκευάσματος που περιέχει PGPR στους κομβοηματώδεις *M. javanica* σε πείραμα σε γλάστρες εντός θερμοκηπίου.



Γράφημα 2. Αριθμός νηματωδών ανά γραμμάριο ρίζας μετά από εφαρμογή σκευασμάτων περιέχοντα PGPR. Οι εφαρμογές των σκευασμάτων πραγματοποιήθηκαν ως εξής:

- 1: μία ημέρα πριν τη μόλυνση με προνύμφες δευτέρου σταδίου
- 2: δεκαπέντε ημέρες και επανάληψη μία ημέρα πριν τη μόλυνση
- 3: δεκαπέντε ημέρες πριν τη μόλυνση