



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

Παραδοτέο Π.4.6.3: Αναφορά της διασυστηματικής δράσης και της επαγωγής ανθεκτικότητας των βακτηρίων σε φυτά τομάτας

Πληροφορίες για το έγγραφο

Αριθμός παραδοτέου: **Π.4.6.3**

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	9
4	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι- Βιβλιογραφικές Αναφορές	10

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 Π4.6.3

Σκοπός του παραδοτέου Π4.6.3 είναι να γίνει μία έκθεση για τη διασυστηματική δράση των μεταβολιτών στις ρίζες των φυτών καθώς επίσης και η ανάπτυξη του φαινομένου της επαγωγικής διασυστηματικής ανθεκτικότητας εξαιτίας της παρουσίας των βακτηρίων στη ριζόσφαιρα. Συγκεκριμένα θα διερευνηθεί εάν το ερέθισμα από την παρουσία των βακτηρίων σε ένα τμήμα της ρίζας μπορεί να «ταξιδέψει» εντός του φυτού και να επηρεάσει τη συμπεριφορά της ρίζας, όσον αφορά τη προσβολή από κομβονηματώδεις, σε άλλο τμήμα αυτής.

Η πρόοδος των εργασιών στο πλαίσιο του ΠΕ 4.6.3 κρίνεται ικανοποιητική και είναι εντός του αρχικού στόχου που έχει τεθεί.

Συνοπτικά, τα σημαντικότερα αποτελέσματα στο πλαίσιο του Π4.6.3 είναι τα εξής:

- Με τα μέχρι τώρα αποτελέσματα δεν διαπιστώνεται η δημιουργία ισχυρού ερεθίσματος από την παρουσία βακτηρίων στο ριζικό σύστημα των φυτών

τομάτας.

- Δεν παρατηρήθηκε καμία απολύτως διασυστηματική δράση των βακτηριακών διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν.

1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΣΤΟΧΟΙ

-Εισαγωγή

Οι κομβοηματοδεις αποτελούν σημαντικά παράσιτα των λαχανοκομικών φυτών ιδιαιτέρως αυτών που αναπτύσσονται εντός θερμοκηπίων. Βακτήρια τα οποία παράγουν μεταβολίτες οι οποίοι προκαλούν ανάσχεση του βιολογικού κύκλου των κομβοηματοδών έχουν δείξει σημαντικά αποτελέσματα σε συνθήκες εργαστηρίου. Ορισμένα από αυτά τα βακτήρια έχουν δείξει επαγωγική δράση όταν εφαρμόζονται στο υπέργειο τμήμα του φυτού. Αυτό το χαρακτηριστικό θα ήταν πολύ χρήσιμο εάν λειτουργούσε κατά τον ίδιο τρόπο στο υπόγειο μέρος των φυτών. Για την επίτευξη του στόχου του ΠΕ 4.6.3 έχουν επιλεγεί συγκεκριμένα βακτήρια με βάση την έρευνα που έχει πραγματοποιηθεί και τα αποτελέσματα που έχουν προκύψει στο ΠΕ 4.6.1 του παρόντος ερευνητικού προγράμματος. Παράλληλα με τα εργαστηριακά διαλύματα βακτηρίων χρησιμοποιήθηκαν εμπορικά σκευάσματα περιέχοντα PGPR με σκοπό τη διερεύνηση του φαινομένου της επαγωγής.

-Σκοπός του παρόντος εγγράφου

Σκοπός του παρόντος εγγράφου είναι η λεπτομερής περιγραφή των στόχων του συγκεκριμένου ΠΕ 4.6.3, 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 και οι επεξηγηματικές εικόνες παρουσιάζονται στο Παράρτημα του παρόντος 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, 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.

Πειραματική διαδικασία

Χρησιμοποιήθηκαν φυτά τομάτας ευαίσθητης στους κομβονηματώδεις των οποίων το ριζικό σύστημα του κάθε φυτού διαχωρίστηκε σε δύο τμήματα (**εικόνες 1 & 2**), και αναπτύχθηκε ταυτόχρονα σε δύο μικρά πλαστικά δοχεία (split root system). Όταν δημιουργήθηκε ικανοποιητικό ριζικό σύστημα πραγματοποιήθηκε μόλυνση με βακτηριακό διάλυμα συγκέντρωσης 10⁸ cfu/ml μόνον στο έδαφος του ενός δοχείου. Χρησιμοποιήθηκαν τα βακτήρια *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus licheniformis* και *B. amyloliquefaciens*. Ως μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν ένα βιολογικό σκεύασμα το οποίο περιέχει PGPR και το Velum prime ως χημικός μάρτυρας. Μετά την πάροδο 7 ημερών ακολούθησε και δεύτερη μόλυνση με το ίδιο βακτηριακό διάλυμα στις ρίζες που είχε προηγηθεί μόλυνση με σκοπό τον εμπλουτισμό του εδάφους με πληθυσμό βακτηρίων και την εγκατάσταση και ανάπτυξη των βακτηρίων στο έδαφος. Μετά την πάροδο 2 ημερών από τη δεύτερη μόλυνση πραγματοποιήθηκε ενσωμάτωση στο έδαφος προνυμφών δευτέρου σταδίου κομβονηματωδών και στις δύο γλάστρες στις οποίες αναπτύσσεται η ρίζα του κάθε φυτού (μολυσμένη με βακτήρια και καθαρή). Μετά την πάροδο 40 ημερών από την ενσωμάτωση στο έδαφος των νηματωδών πραγματοποιήθηκε πλύσιμο των ριζών και καταμέτρηση του αριθμού των κόμβων, των θηλυκών ατόμων των κομβονηματωδών και των ωόσακων σε όλες τις ρίζες ξεχωριστά.

2.2 Αποτελέσματα και Συζήτηση

Όπως προκύπτει από τα αποτελέσματα τα οποία παρουσιάζονται στο πίνακα 1 φαίνεται ότι ενώ υπήρχε απευθείας δράση των βακτηριακών διαλυμάτων στις ρίζες των φυτών όπου έγινε ταυτόχρονη εφαρμογή των διαλυμάτων με προνύμφες νηματωδών, δεν υπήρξε καμία δράση στο άλλο μισό της ρίζας όπου πραγματοποιήθηκε μόλυνση μόνον με προνύμφες. Επομένως γίνεται σαφές από αυτό το πείραμα ότι δεν υπήρξε κάποιο επαγόμενο ερέθισμα από το τμήμα της ρίζας το οποίο μολύνθηκε με βακτήρια σε αυτό στο οποίο δεν μολύνθηκε. Ενδεχομένως αυτό να οφείλεται στο χαμηλό βακτηριακό φορτίο (108 cfu/ml) που χρησιμοποιήθηκε για τη μόλυνση των ριζών.

3 ΣΥΝΟΨΗ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Σύνοψη

Ο στόχος του ΠΕ 4.6.3 ήταν η διερεύνηση της διασυστηματικής δράσης και της επαγωγής του ερεθίσματος σε φυτά τομάτας στα οποία είχε διαχωριστεί το ριζικό τους σύστημα σε δύο τμήματα. Συγκεκριμένα πραγματοποιήθηκαν πειράματα με σκοπό τη καταγραφή της επαγωγής του ερεθίσματος από το ένα τμήμα της ρίζας στο άλλο που θα είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση της προσβολής της ρίζας από τις προνύμφες των κομβονηματοδών. Δεν παρατηρήθηκε επαγωγή του φαινομένου σύμφωνα με τα έως τώρα αποτελέσματα. Αυτό μπορεί να οφείλεται είτε στην απουσία δημιουργίας του ερεθίσματος από τη παρουσία των βακτηρίων στη ρίζα του φυτού είτε στην αδυναμία τυχόν ερεθισμάτων να επαχθούν σε άλλο τμήμα της ρίζας. Θα πρέπει να αποσαφηνιστεί εάν υπάρχει κάποιου είδους επαγωγή χρησιμοποιώντας μεταβολομικές μεθόδους σε μελλοντικές μελέτες.

Συμπεράσματα

- Δεν παρατηρήθηκε διασυστηματική δράση των βακτηριακών διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν σε φυτά τομάτας με διαχωρισμένο ριζικό σύστημα.
- Μείωση των νηματωδολογικών πληθυσμών παρατηρήθηκε μόνον στο τμήμα της ρίζας το οποίο μολύνθηκε ταυτόχρονα με βακτηριακό διάλυμα και με προνύμφες κομβονηματοδών.

4 ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι



Εικόνα 1. Φυτό τομάτας με διαχωρισμένη ρίζα η οποία αναπτύσσεται σε δύο δοχεία.



Εικόνα 2. Ανάπτυξη ριζικού συστήματος φυτού τομάτας την ημέρα μόλυνσης με βακτηριακά διαλύματα

A/A	μεταχείριση			
	Αριθμός νηματωδών ανά γραμμάριο ρίζας			
	Σε αυτό το τμήμα της ρίζας έγινε εφαρμογή του βακτηριακού διαλύματος και των προνυμφών		Σε αυτό το τμήμα της ρίζας έγινε εφαρμογή μόνον προνυμφών	
	Ρίζα 1		Ρίζα 2	
1	control	83,8	J2s	86,2
2	P. fluorescens	NA	J2s	67,9
3	B. licheniformis	NA	J2s	78,5
4	B. amyloliquefaciens	NA	J2s	70,9
5	liquid broth	64,2	J2s	73,3
6	P. fluorescens + J2s	42,7	J2s	78,5
7	B. licheniformis + J2s	45,3	J2s	68,2
8	B. amyloliquefaciens + J2s	49,3	J2s	74,1
9	liquid broth + J2s	91,2	J2s	86,7
10	Pochar - Nutryaction	28,5	J2s	87,2
11	(Pochar - Nutryaction) + J2s	37,8	J2s	69,7
12	Velum + J2s	3,1	J2s	73,8

Πίνακας 1. Αριθμός νηματωδών ανά γραμμάριο ρίζας στο τμήμα της ρίζας όπου πραγματοποιήθηκε εφαρμογή των βακτηριακών διαλυμάτων και των προνυμφών δευτέρου σταδίου και στο άλλο μισό της ρίζας όπου πραγματοποιήθηκε μόλυνση μόνον με προνύμφες.