



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

Παραδοτέο Π.4.6.4: Αναφορά αποτελεσματικότητας επιλεγμένων ειδών *Bacillus* και *Pseudomonas* έναντι του νηματώδη *Xiphinema index* σε *in vitro* και σε *in vivo* πειράματα

Πληροφορίες για το έγγραφο

Αριθμός παραδοτέου: Π.4.6.4

Ενότητα εργασίας: ΕΕ4

Επικεφαλής δικαιούχος: [ΕΛΓΟ-ΔΗΜΗΤΡΑ]

Συγγραφείς: [Εμμανουήλ Τζωρτζακάκης]

Έκδοση: 1.0

Είδος Παραδοτέου: [Έκθεση]

Ημερομηνία παράδοσης: [Ημέρα - Μήνας - Έτος]

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: ΤΑΕDR-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	10
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 Π4.6.4

Σκοπός του παραδοτέου είναι η *in vitro* αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας των μεταβολιτών επιλεγμένων ειδών *Bacillus* και *Pseudomonas* και άλλων βακτηρίων έναντι του νηματώδη *Xiphinema index*, φορέα του ιού του ριπιδωτού φύλλου στο αμπέλι. Επιλεγμένα στελέχη που είναι και τα περισσότερο αποτελεσματικά σε πειράματα *in vitro*, θα αξιολογηθούν περαιτέρω *in vivo* σε φυτά σε γλάστρες.

Δοκιμάστηκαν *in vitro* μεταβολίτες από 25 βακτήρια *Pseudomonas* sp, *Bacillus* sp και *Brevibacillus* sp. από Καθηγητή Π. Σαρρή (Πανεπιστήμιο Κρήτης / ΙΤΕ) και Καθηγητή Δ. Γκούμα (ΕΛΜΕΠΑ). Τα ποσοστά παρεμπόδισης της κινητικότητας του νηματώδη ήταν ενθαρρυντικά για περαιτέρω διερεύνηση μόνο σε μεταβολίτες προερχόμενους από τρία βακτήρια *Pseudomonas* sp. Επιλέχθηκαν και τρία άλλα βακτήρια *Pseudomonas* sp των οποίων το ποσοστό παρεμπόδισης της κινητικότητας του νηματώδη ήταν χαμηλό και δεν έχρηζε περαιτέρω διερεύνησης. Τα έξι προαναφερόμενα βακτήρια προέρχονταν από την συλλογή του Καθηγητή Π. Σαρρή (Πανεπιστήμιο Κρήτης / ΙΤΕ). Η αποτελεσματικότητα των μεταβολιτών των παραπάνω έξι βακτηρίων αξιολογήθηκε *in vivo* στον νηματώδη *X. index* σε σπορόφυτα συκιάς. Κανένας μεταβολίτης δεν μείωσε σημαντικά τον πληθυσμό του νηματώδη συγκριτικά με τον μάρτυρα. Οι τρεις βακτηριακοί μεταβολίτες που έδειξαν ενθαρρυντικά αποτελέσματα *in vitro*, σε δοκιμές

in vivo ήταν αναποτελεσματικοί στην μείωση του νηματώδη. Επιπρόσθετα αξιολογήθηκαν *in vivo* σε σπορόφυτα σικιάς μεταβολίτες προερχόμενοι από 10 διαφορετικά στελέχη *Bacillus* sp από Δρ Α. Βενιεράκη (ΓΠΑ). Για τα συγκεκριμένα δεν προηγήθηκαν βιοδοκιμές *in vitro* στα τρυβλία. Και στην περίπτωση αυτή, κανένας μεταβολίτης δεν μείωσε σημαντικά τον πληθυσμό του νηματώδη συγκριτικά με τον μάρτυρα. Επιπλέον και το νηματωδοκτόνο oxamyl (απαγορεύεται η χρήση του) που χρησιμοποιήθηκε ως θετικός μάρτυρας ήταν αναποτελεσματικό.

1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΣΤΟΧΟΙ

Μία από τις σημαντικότερες ιολογικές ασθένειες του αμπελιού είναι ο ιός του ριπιδωτού φύλλου (*Grapevine Fanleaf Virus*, GFLV) με αποκλειστικό φορέα μετάδοσης τον εκτοπαρασιτικό νηματώδη *Xiphinema index*, ο οποίος είναι ενδημικός σε αρκετές αμπελουργικές περιοχές της χώρας μας. Ο μόνος αποτελεσματικός τρόπος 'σχετικής' εξάλειψης του νηματώδη είναι η εξαετής αγρανάπαυση/αμειψισπορά πριν την φύτευση νέου αμπελώνα στην θέση παλαιού. Μια πιθανή 'αναζωπύρωση' του νηματώδη, θα μπορούσε να παρεμποδισθεί με μια στοχευμένη επέμβαση 'προστασίας' της ρίζας του νέο φυτεμένου αμπελώνα. Λόγω του ότι δεν υπάρχει εγκεκριμένο νηματωδοκτόνο για το αμπέλι, διερευνήσαμε *in vitro* και *in vivo* την επίδραση βακτηριακών μεταβολιτών, που είναι αποτελεσματικοί σε φυτοπαθογόνα (μύκητες και βακτήρια), στον νηματώδη *Xiphinema index*. Επισημαίνουμε ότι στόχος δεν είναι η αντιμετώπιση του νηματώδη σε υφιστάμενο αμπελώνα αλλά μια συμπληρωματική επέμβαση προληπτικού χαρακτήρα στον νέο αμπελώνα, του οποίου η φύτευση θα γίνει μετά την μακροχρόνια αγρανάπαυση όπως προαναφέρθηκε.

2 ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΩΝ ΕΡΓΑΣΙΩΝ

2.1 Υλικά και Μέθοδοι

Αρχική εκτίμηση ήταν οι πειραματικές εργασίες να ξεκινήσουν τον Μάιο 2024 με την πρόσληψη του προσωπικού (πρόσληψη για 12 μήνες). Η πρόσκληση βγήκε άγωνα και μέχρι την διαδικασία της δημοσίευσης της εκ νέου πρόσκλησης και την πρόσληψη ατόμου πέρασε χρονικό διάστημα 6 μηνών (η πρόσληψη έγινε 1 Οκτωβρίου). Οι 6 μήνες που πέρασαν ήταν ιδιαίτερα κρίσιμοι για την επιβίωση του νηματώδη *Xiphinema index* που η εκτροφή του γίνεται αποκλειστικά σε φυτά συκιάς. Λόγω των υψηλών θερμοκρασιών του καλοκαιριού υπήρξαν σημαντικές απώλειες στους πληθυσμούς των νηματωδών μέσα στις γλάστρες (όχι των φυτών) με συνέπεια να μειωθεί σημαντικά η διαθεσιμότητα νηματωδών για τις βιοδοκιμές. Είναι γνωστό βιβλιογραφικά ότι ο νηματώδης *Xiphinema index* είναι λιγότερο ευαίσθητος σε χημικά νηματωδοστατικά σε σχέση με είδη του *Meloidogyne*. Υποθέτοντας ότι τα είδη του *Meloidogyne* θα είναι επίσης πιο ευαίσθητα σε βακτηριακούς μεταβολίτες σε σχέση με τον νηματώδη *Xiphinema index*, αποφασίσαμε να ξεκινήσουμε τις βιοδοκιμές με είδη του *Meloidogyne* σαν προκαταρκτικό screening των βακτηριακών μεταβολιτών, την περίοδο της εξάμηνης αναμονής που προαναφέρθηκε.

Βιοδοκιμές in vitro στον νηματώδη *Meloidogyne javanica*

Οι βιοδοκιμές έγιναν σε τρυβλία διαμέτρου 3,5 cm με τουλάχιστον 100 προνύμφες 2^{ου} σταδίου του νηματώδη *Meloidogyne javanica* σε 1ml νερού. Οι επεμβάσεις ήταν:

1. Μάρτυρας (νηματώδεις σε 1 ml νερό + 1 ml νερό)

2. Oxamyl καρβαμιδικό νηματωδοκτόνο που η χρήση του απαγορεύεται (νηματώδεις σε 1 ml νερό + 1 ml διαλύματος oxamyl με τελική συγκέντρωση 25 ppm στο τρυβλίο)

3. Streptomycin 250 ppm + Captan 24 ppm Εφαρμόζονται για την αποφυγή ανάπτυξης βακτηρίων και μυκήτων στα τρυβλία, λόγω του ότι το διάλυμα των βακτηριακών μεταβολιτών περιέχει ίχνη του θρεπτικού υλικού. Αυτά προστίθενται στο αιώρημα των νηματωδών σε συγκέντρωση ώστε στον τελικό όγκο του τρυβλίου να επιτευχθεί η προαναφερόμενη συγκέντρωση (νηματώδεις σε 1 ml διαλύματος Streptomycin και Captan + 1 ml νερό)

4. Μάρτυρας υλικού ανάπτυξης βακτηρίων 50% (νηματώδεις σε 1 ml διαλύματος Streptomycin και Captan + 1 ml του προϊόντος της φυγοκέντρωσης του θρεπτικού υλικού)

5. Βακτηριακός μεταβολίτης 50% (νηματώδεις σε 1 ml διαλύματος Streptomycin και Captan + 1 ml του προϊόντος της φυγοκέντρωσης της βακτηριακής καλλιέργειας)

Δεν χρησιμοποιήθηκε για σύγκριση εμπορικό βιονηματωδοκτόνο με βακτήρια γιατί στην τρέχουσα περίοδο δεν υπάρχει κανένα εγκεκριμένο σκεύασμα.

Κάθε επέμβαση είχε 5 επαναλήψεις και έγινε παρατήρηση 50 προνυμφών 2^{ου} σταδίου στο στερεοσκόπιο μετά από 24h και 48h επώασης σε θερμοκρασία δωματίου (20-25°C). Οι προνύμφες χαρακτηρίστηκαν ως "affected" όταν ήταν τελείως ακίνητες ή κινούνταν ελάχιστα και έδειχναν ανικανότητα επαρκούς κίνησης για προσέγγιση ρίζας φυτού και είσοδό τους σε αυτήν. Όλες οι παρατηρήσεις έγιναν αποκλειστικά από τον επιστημονικά υπεύθυνο λόγω της απαίτησης μεγάλης εξοικείωσης με την φυσιολογική κινητικότητα των νηματωδών.

Στην περίπτωση του νηματωδοκτόνου Oxamyl, 100% των νηματωδών ήταν "affected" σε 24h και το ποσοστό αυτό παρέμεινε το ίδιο στις 48h, σε όλες τις πειραματικές δοκιμασίες. Για την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας των βακτηριακών μεταβολιτών έγινε στατιστική ανάλυση όλων των επεμβάσεων εξαιρώντας την επέμβαση με το νηματωδοκτόνο Oxamyl, και βλέποντας την διαφορά της επέμβασης 5 (βακτηριακός μεταβολίτης 50%) από την επέμβαση 4 (μάρτυρας υλικού ανάπτυξης βακτηρίων 50%). Επιπλέον χρησιμοποιήθηκε η formula Abbot στην οποία γίνεται

διόρθωση του ποσοστού των "affected" νηματώδων στην περίπτωση του βακτηριακού μεταβολίτη ως προς το αντίστοιχο ποσοστό του μάρτυρα υλικού ανάπτυξης βακτηρίων 50%.

Οι βακτηριακοί μεταβολίτες (38 συνολικά) και οι αντίστοιχοι μάρτυρες του υλικού ανάπτυξης δόθηκαν από τους/τις παρακάτω:

Καθηγητή Π. Σαρρή (Πανεπιστήμιο Κρήτης / ΙΤΕ) 31 συνολικά 9 *Pseudomonas* sp., 7 *Bacillus* sp, 9 *Brevibacillus* sp, 1 *Paenibacillus* sp, 1 *Kusheria* sp, 1 *Streptomyces* sp, 1 *Brevundimonas* sp, 1 *Variovorax* sp, 1 *Stutzerimonas* sp

Καθηγητή Δ. Γκούμα (ΕΛΜΕΠΑ) 5 συνολικά 5 *Bacillus*

Δρ Α. Βαρυμπόμπη (ΕΚΠΑ) 2 συνολικά *Bacillus licheniformis*, *Pseudomonas florescens*

Βιοδοκιμές *in vitro* στον νηματώδη *Xiphinema index*

Ακολούθησαν βιοδοκιμές στον νηματώδη *X. index* που αφορούν και το πακέτο εργασίας. Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, υπήρξαν σημαντικές απώλειες στους πληθυσμούς των νηματώδων μέσα στις γλάστρες με συνέπεια να μειωθεί σημαντικά η διαθεσιμότητα νηματώδων για τις βιοδοκιμές. Οι βιοδοκιμές έγιναν σε τρυβλία διαμέτρου 3,5 cm με 50-80 μεικτά στάδια (προνύμφες και ακμαία) του νηματώδη *X. index* σε 1ml νερού. Οι επεμβάσεις ήταν:

1. Μάρτυρας (νηματώδεις σε 1 ml νερό + 1 ml νερό)

2. Οxamyl καρβαμιδικό νηματοδοκτόνο που η χρήση του απαγορεύεται (νηματώδεις σε 1 ml νερό + 1 ml διαλύματος oxamyl με τελική συγκέντρωση 25 ppm στο τρυβλίο)

3. Streptomycin 250 ppm Εφαρμόζεται για την αποφυγή ανάπτυξης βακτηρίων στα τρυβλία, λόγω του ότι το διάλυμα των βακτηριακών μεταβολιτών περιέχει ίχνη του θρεπτικού υλικού. Ενώ στους νηματώδεις *Meloidogyne* έγινε προσθήκη Captan 24 ppm για την παρεμπόδιση ανάπτυξης μυκήτων, δεν έγινε στις τρέχουσες βιοδοκιμές λόγω του ότι το Captan στην συγκέντρωση των 24 ppm παρεμπόδιζε σημαντικά την κινητικότητα του νηματώδη *X. index*. Η προσθήκη της Streptomycin έγινε στο αιώρημα των νηματώδων ώστε στον τελικό όγκο του τρυβλίου να επιτευχθεί η προαναφερόμενη συγκέντρωση 250 ppm (νηματώδεις σε 1 ml διαλύματος Streptomycin + 1 ml νερό)

4. Μάρτυρας υλικού ανάπτυξης βακτηρίων 50% (νηματώδεις σε 1 ml διαλύματος Streptomycin + 1 ml του προϊόντος της φυγοκέντρησης του θρεπτικού υλικού)

5. Βακτηριακός μεταβολίτης 50% (νηματώδεις σε 1 ml διαλύματος Streptomycin + 1 ml του προϊόντος της φυγοκέντρησης της βακτηριακής καλλιέργειας)

Δεν χρησιμοποιήθηκε για σύγκριση εμπορικό βιονηματοδοκτόνο με βακτήρια γιατί στην τρέχουσα περίοδο δεν υπάρχει κανένα εγκεκριμένο σκεύασμα.

Κάθε επέμβαση είχε 5 επαναλήψεις και έγινε παρατήρηση 20 σταδίων του νηματώδη στο στερεοσκόπιο μετά από 24h και 48h επώασης σε θερμοκρασία δωματίου (20-25°C). Οι νηματώδεις χαρακτηρίστηκαν ως "affected" όταν ήταν τελείως ακίνητοι ή κινούνταν ελάχιστα και έδειχναν ανικανότητα επαρκούς κίνησης για προσέγγιση ρίζας φυτού και είσοδό τους σε αυτήν. Σε περιπτώσεις αμφιβολίας, ακουμπούσαμε τον νηματώδη με μια βελόνα για να φανεί η αντίδρασή του. Όλες οι παρατηρήσεις έγιναν αποκλειστικά από τον επιστημονικά υπεύθυνο λόγω της απαίτησης μεγάλης εξοικείωσης με την φυσιολογική κινητικότητα των νηματώδων.

Στην περίπτωση του νηματοδοκτόνου Oxamyl, το ποσοστό των "affected" νηματώδων ήταν μικρότερο του 90% και η επέμβαση συμπεριλήφθηκε στην στατιστική ανάλυση. Για την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας των βακτηριακών μεταβολιτών έγινε στατιστική ανάλυση όλων των επεμβάσεων και βλέποντας την διαφορά της επέμβασης 5 (βακτηριακός μεταβολίτης 50%) από την επέμβαση 4 (μάρτυρας υλικού ανάπτυξης βακτηρίων 50%) και επέμβαση 2 (νηματοδοστατικό). Επιπλέον χρησιμοποιήθηκε η formula abbot στην οποία γίνεται διόρθωση του ποσοστού των "affected" νηματώδων στην περίπτωση του βακτηριακού μεταβολίτη ως προς το αντίστοιχο ποσοστό του μάρτυρα υλικού ανάπτυξης βακτηρίων 50%.

Οι βακτηριακοί μεταβολίτες (24 συνολικά) και οι αντίστοιχοι μάρτυρες του υλικού

ανάπτυξης δόθηκαν από τους/τις παρακάτω:

Καθηγητή Π. Σαρρή (Πανεπιστήμιο Κρήτης / ΙΤΕ) 19 συνολικά

8 *Pseudomonas* sp., 7 *Bacillus* sp, 4 *Brevibacillus* sp. Όλοι οι μεταβολίτες των *Bacillus* και *Brevibacillus* και πέντε από τους μεταβολίτες του *Pseudomonas* είχαν χρησιμοποιηθεί στις βιοδοκιμές με τον νηματώδη *Meloidogyne javanica*.

Καθηγητή Δ. Γκούμα (ΕΛΜΕΠΑ) 5 συνολικά

5 *Bacillus*. Όλοι είχαν χρησιμοποιηθεί στις βιοδοκιμές με τον νηματώδη *Meloidogyne javanica*.

Μετά την δοκιμή όλων των μεταβολιτών, έγινε επανάληψη ορισμένων βιοδοκιμών με μεταβολίτες που έδωσαν ενθαρρυντικά αποτελέσματα

Βιοδοκιμές *in vivo* στον νηματώδη *Xiphinema index*

Από τους μεταβολίτες που δοκιμάστηκαν *in vitro* επιλέχθηκαν 6 προερχόμενοι από βακτήρια *Pseudomonas* sp. (Καθηγητή Π. Σαρρή, Πανεπιστήμιο Κρήτης / ΙΤΕ). Τρεις από αυτούς έδωσαν ενθαρρυντικά αποτελέσματα στις *in vitro* δοκιμές (και σε επαναληπτικό πείραμα) και οι άλλοι τρεις όχι. Επιπλέον δοκιμάστηκαν μεταβολίτες από 10 *Bacillus* sp (Δρ Α. Βενιεράκη, ΓΠΑ) τα οποία δεν αξιολογήθηκαν *in vitro*. Σε πλαστικά κύπελα (πάνω διάμετρος 6cm) χωρητικότητας 100ml με άμμο είχαν φυτευτεί σπορόφυτα συκιάς. Η συκιά είναι ένας καλός ξενιστής του νηματώδη *Xiphinema index*. Τα φυτά μολύνθηκαν με 30 άτομα *Xiphinema index* και μετά από 24 ώρες εφαρμόστηκαν οι παρακάτω επεμβάσεις:

1. Μάρτυρας (7 ml νερό)

2. Oxamyl (7 ml νερό με 0.8478 ml oxamyl που αντιστοιχεί σε 3.000 ml / εκτάριο)

3. Μάρτυρας υλικού ανάπτυξης βακτηρίων (7 ml)

4. Βακτηριακός μεταβολίτης (7 ml)

με 5 επαναλήψεις την κάθε μία.

Τα φυτά παρέμειναν 2-2,5 μήνες σε δωμάτιο με τεχνητό φως, 16 ώρες φωτοπερίοδο και θερμοκρασία 24-26 °C. Μετρήθηκε το ύψος των φυτών, εκριζώθηκαν και έγινε μέτρηση του ολικού βάρους και του βάρους του υπέργειου τμήματος, Στη συνέχεια έγινε εξαγωγή και καταμέτρηση των νηματωδών. Υπολογίστηκε η τιμή $Rf = \text{final population} / \text{initial population}$

2.2 Αποτελέσματα και Συζήτηση

Βιοδοκιμές *in vitro* στον νηματώδη *Meloidogyne javanica*

Μεταβολίτες από Καθηγητή Π. Σαρρή (Πανεπιστήμιο Κρήτης / ΙΤΕ) 31 συνολικά

Μετά από 24h επώασης, μόνο τρεις μεταβολίτες είχαν κάποιο σημαντικό αποτέλεσμα στην παρεμπόδιση της κινητικότητας των νηματωδών με τις τιμές Abbot να κυμαίνονται από 10,4 έως 11%. Στις 48h επώασης, επτά μεταβολίτες είχαν αυξημένη αποτελεσματικότητα στην παρεμπόδιση της κινητικότητας των νηματωδών με τις τιμές Abbot να είναι 3-32%

Μεταβολίτες από Καθηγητή Δ. Γκούμα (ΕΛΜΕΠΑ) 5 συνολικά

Μετά από 24h και 48h επώασης, μόνο ένας μεταβολίτης είχε κάποιο σημαντικό αποτέλεσμα στην παρεμπόδιση της κινητικότητας των νηματωδών με την τιμή Abbot να είναι 3,75%.

Μεταβολίτες από Δρ Α. Βαρυμπόμπη (ΕΚΠΑ) 2 συνολικά

Κανένας μεταβολίτης δεν είχε κάποιο σημαντικό αποτέλεσμα στην παρεμπόδιση της κινητικότητας των νηματωδών.

Βιοδοκιμές *in vitro* στον νηματώδη *Xiphinema index*

Μεταβολίτες από Καθηγητή Π. Σαρρή (Πανεπιστήμιο Κρήτης / ΙΤΕ) 19 συνολικά

Μετά από 24h επώασης, η παρεμπόδιση της κινητικότητας του νηματώδη από το oxamyl κυμαίνονταν από 52-75% ενώ μετά από 48 h από 63-87%. Από τους 19 μεταβολίτες, στους 9 (1 *Bacillus*, 2 *Brevibacillus* και 6 *Pseudomonas*) η παρεμπόδιση της κινητικότητας του νηματώδη μετά από 24h επώασης δεν διέφερε από αυτή του oxamyl ενώ ήταν στατιστικά μεγαλύτερη από τον μάρτυρα (υλικό ανάπτυξης βακτηρίων). Οι τιμές Abbot κυμαίνονταν από 25-57%. Παρόμοια τάση παρατηρήθηκε και στις 48 h επώασης με τις τιμές Abbot να κυμαίνονται από 48-67%. Όμως σε 4 περιπτώσεις (2 *Brevibacillus* και 2 *Pseudomonas*) στην επέμβαση 3 (νηματώδεις + streptomycine) η παρεμπόδιση της κινητικότητας των νηματωδών ήταν παρόμοια η μεγαλύτερη από αυτή του oxamyl.

Μεταβολίτες από Καθηγητή Δ. Γκούμα (ΕΛΜΕΠΑ) 5 συνολικά

Μετά από 24h επώασης, η παρεμπόδιση της κινητικότητας του νηματώδη από το oxamyl κυμαίνονταν από 55-66% ενώ μετά από 48 h από 63-70%. Μετά από 24h επώασης, και οι πέντε μεταβολίτες είχαν κάποιο σημαντικό αποτέλεσμα στην παρεμπόδιση της κινητικότητας των νηματωδών σε σχέση με τον μάρτυρα (υλικό ανάπτυξης βακτηρίων) αλλά ήταν στατιστικά μικρότερη από το oxamyl με την υψηλότερη τιμή Abbot να είναι 11%. Στις 48h επώασης, στην επέμβαση 3 (νηματώδεις + streptomycin) η παρεμπόδιση της κινητικότητας των νηματωδών ήταν παρόμοια η μεγαλύτερη από αυτή του oxamyl.

Έγινε επανάληψη ορισμένων βιοδοκιμών με 4 μεταβολίτες που έδειξαν ενθαρρυντικά αποτελέσματα, όπως αναφέρεται παρακάτω.

Μεταβολίτες από Καθηγητή Π. Σαρρή (Πανεπιστήμιο Κρήτης / ΙΤΕ) 4 συνολικά

Από τους 9 μεταβολίτες που έδωσαν την καλύτερη αποτελεσματικότητα στις 24 h επώασης, επιλέχθηκαν 4 (1 *Bacillus* και 3 *Pseudomonas*) που είχαν καλή αποτελεσματικότητα και στις 48 h επώασης, κατά την οποία δεν παρατηρήθηκε στην επέμβαση 3 (νηματώδεις + streptomycin) η παρεμπόδιση της κινητικότητας των νηματωδών να είναι παρόμοια η μεγαλύτερη από αυτή του oxamyl.

Ο μεταβολίτης από το *Bacillus* στις 24h επώασης έδωσε καλύτερη αποτελεσματικότητα από τον μάρτυρα, αλλά μικρότερη από το oxamyl. Οι μεταβολίτες από τα *Pseudomonas* έδωσαν παρόμοια αποτελέσματα με αυτά του προηγούμενου πειράματος. Η τιμή Abbot για τον ένα μεταβολίτη ήταν 42% στις 24h επώασης και 64% στις 48 h. Για τους άλλους δύο οι τιμές Abbot ήταν 69% και 75% στις 24 h και 87 % και 94% στις 48 h επώασης.

Βιοδοκιμές *in vivo* στον νηματώδη *Xiphinema index*

Κανένας από τους μεταβολίτες προερχόμενοι από τα 6 στελέχη του βακτηρίου *Pseudomonas* sp καθώς και η επέμβαση με oxamyl δεν είχαν καμία σημαντική επίδραση στην ανάπτυξη των φυτών, συγκρινόμενα με την επέμβαση με τον μάρτυρα του υλικού ανάπτυξης του βακτηρίου και τον μάρτυρα με νηματώδεις. Επιπλέον κανένας από τους μεταβολίτες προερχόμενοι από τα 6 στελέχη του βακτηρίου *Pseudomonas* sp καθώς και η επέμβαση με oxamyl δεν είχαν καμία σημαντική επίδραση στον πληθυσμό των νηματωδών. Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και στις βιοδοκιμές με τους μεταβολίτες προερχόμενους από τα 10 στελέχη του βακτηρίου *Bacillus* sp.

Σχετικά με τις *in vitro* βιοδοκιμές στον νηματώδη *Meloidogyne javanica*, όπου παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική παρεμπόδιση της κινητικότητας, αυτή ήταν σε ποσοστό κατώτερου του 50% και δεν θεωρήθηκε ενθαρρυντική ώστε να κριθεί αναγκαία η περαιτέρω διερεύνηση *in vivo* των μεταβολιτών.

Η μειωμένη ευαισθησία του νηματώδη *Xiphinema index* στο oxamyl συγκριτικά με αυτή του νηματώδη *Meloidogyne javanica* είναι αναμενόμενη. Η μεγάλη ευαισθησία του *X. index* στο Captan προκαλεί έκπληξη λόγω του ότι το Captan είναι μυκητοκτόνο και ότι

δεν παρατηρήθηκε παρόμοια ευαισθησία στον *M. javanica*. Επίσης έκπληξη προκαλεί η αυξημένη ευαισθησία του *X. index* στην streptomycine και η έλλειψη ευαισθησίας του *M. javanica* μετά από 48 h επώασης. Τα παραπάνω δημιουργούν ιδιαίτερες δυσκολίες στην πειραματική διαδικασία των βιοδοκιμών. Η απουσία του Captan δημιουργεί ανάπτυξη μυκήτων μετά από 48 h επώασης και η ευαισθησία στην streptomycine δημιουργεί έλλειψη αξιοπιστίας των αποτελεσμάτων μετά από 48 h επώασης, λόγω του ότι η παρεμπόδιση της κινητικότητας του νηματώδη σε πολλές περιπτώσεις είναι συγκρίσιμη με αυτή του oxamyl. Γενικά οι βιοδοκιμές *in vitro* στα τρυβλία δίνουν αποτελέσματα με μεγάλη παραλλακτικότητα και μειωμένη αξιοπιστία. Μεταβολίτες από 3 στελέχη του *Pseudomonas* sp, οι οποίοι έδωσαν ενθαρρυντικά αποτελέσματα παρεμπόδισης του νηματώδη *Xiphinema index* σε δύο ανεξάρτητα πειράματα *in vitro*, αποδείχτηκαν μη αποτελεσματικοί σε σπορόφυτα συκιάς. Εξίσου αναποτελεσματικοί σε σπορόφυτα συκιάς ήταν μεταβολίτες από 3 άλλα στελέχη του *Pseudomonas* sp, οι οποίοι ήταν μη αποτελεσματικοί *in vitro*. Λαμβάνοντας υπόψη την έλλειψη συσχέτισης των αποτελεσμάτων βιοδοκιμών *in vitro* και *in vivo*, δοκιμάσαμε απευθείας *in vivo* την αποτελεσματικότητα μεταβολιτών προερχόμενων από 10 στελέχη του *Bacillus* sp σε σύγκριση με το oxamyl. Και σε αυτή την περίπτωση, τόσο οι μεταβολίτες όσο και το oxamyl ήταν μη αποτελεσματικοί.

3 ΣΥΝΟΨΗ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Για την καλλιέργεια του αμπελιού δεν υπάρχει κανένα εγκεκριμένο νηματωδοκτόνο για μια επέμβαση προληπτικού χαρακτήρα σε νέο-φυτευμένο αμπελώνα. Θεωρήσαμε ως νηματώδη – στόχο, τον *Xiphinema index*, που είναι ο μοναδικός φορέας του ιού του ριπιδωτού φύλλου (*Grapevine Fanleaf Virus*, GFLV). Η προληπτικού χαρακτήρα επέμβαση στόχευε στην παρεμπόδιση μιας πιθανής 'αναζωπύρωσης' του νηματώδη, που θεωρητικά θα είχε 'εκμηδενιστεί' μετά από μια μακρά 6 ετή αγρανάπαυση ή αμειψισπορά, μετά την εκρίζωση ενός παλαιού αμπελώνα. Στην διεθνή βιβλιογραφία υπάρχουν αρκετές δημοσιεύσεις σχετικές με την χρήση βακτηριακών μεταβολιτών, ως εναλλακτικός τρόπος αντιμετώπισης νηματωδών του γένους *Meloidogyne*. Για τον νηματώδη *Xiphinema index* υπάρχουν ελάχιστες δημοσιεύσεις και όλες προέρχονται από το ίδιο ερευνητικό ίδρυμα, το University of Chile, Santiago (παρατίθενται στο Παράρτημα).

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η αρχικά *in vitro* αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας των μεταβολιτών επιλεγμένων ειδών *Bacillus* και *Pseudomonas* και άλλων βακτηρίων έναντι του νηματώδη *Xiphinema index* και στην συνέχεια η *in vivo* αξιολόγηση σε φυτά συκιάς (σπορόφυτα) σε γλάστρες, όσων μεταβολιτών βρέθηκαν αποτελεσματικοί *in vitro*. Η συκιά χρησιμοποιήθηκε ως φυτό μοντέλο λόγω του ότι είναι πολύ καλός ξενιστής του νηματώδη και αναπτύσσεται ικανοποιητικά σε ελεγχόμενες συνθήκες θερμοκρασίας και τεχνητού φωτισμού. Ως θετικός μάρτυρας και στις δύο βιοδοκιμές χρησιμοποιήθηκε το νηματωδοκτόνο oxamyl, η εφαρμογή του οποίου έχει απαγορευτεί.

Αρχικά χρησιμοποιήθηκε ως νηματώδης μοντέλο στις *in vitro* βιοδοκιμές το είδος *Meloidogyne javanica* σαν προκαταρκτικό screening των βακτηριακών μεταβολιτών, σε μια περίοδο εξαμήνου αναμονής για πρόσληψη προσωπικού. Χρησιμοποιήθηκαν μεταβολίτες από 38 βακτηριακά στελέχη τα οποία ήταν αποτελεσματικά έναντι κάποιων φυτοπαθογόνων προερχόμενα από Πανεπιστήμιο Κρήτης/ΙΤΕ (καθηγητής Π. Σαρρής), ΕΛΜΕΠΑ (καθηγητής Δ. Γκούμας) και ΕΚΠΑ (Δρ Μ. Βαρυμπόμπη). Κανένας από τους παραπάνω μεταβολίτες δεν έδωσε κάποιο ενθαρρυντικό αποτέλεσμα.

Ακολούθησαν *in vitro* βιοδοκιμές στον νηματώδη *X. index* που αφορούν και το πακέτο

εργασίας. Χρησιμοποιήθηκαν μεταβολίτες από 19 βακτηριακά στελέχη προερχόμενα από Πανεπιστήμιο Κρήτης/ΙΤΕ (καθηγητής Π. Σαρρής) και 5 βακτηριακά στελέχη προερχόμενα από το ΕΛΜΕΠΑ (καθηγητής Δ. Γκούμας). Μόνο μεταβολίτες προερχόμενοι από 3 στελέχη *Pseudomonas* sp προερχόμενα από Πανεπιστήμιο Κρήτης/ΙΤΕ (καθηγητής Π. Σαρρής) βρέθηκαν αποτελεσματικά. Οι μεταβολίτες αυτοί αξιολογήθηκαν *in vivo* σε σπορόφυτα συκιάς καθώς και άλλοι από 3 στελέχη *Pseudomonas* sp που ήταν μη αποτελεσματικοί στις *in vitro* βιοδοκιμές. Κανένας μεταβολίτης ούτε και το νηματώδοκτονο οχαμγλ δεν μείωσε σημαντικά τον πληθυσμό του νηματώδη έναντι του μάρτυρα. Λαμβάνοντας υπόψη την έλλειψη συσχέτισης των αποτελεσμάτων βιοδοκιμών *in vitro* και *in vivo*, δοκιμάσαμε απευθείας *in vivo* την αποτελεσματικότητα μεταβολιτών από 10 στελέχη του *Bacillus* sp προερχομένων από το ΓΠΑ (Δρ Α. Βενιερράκη) οι οποίοι ήταν αποτελεσματικοί σε αντιμετώπιση φυτοπαθογόνων. Και σε αυτή την περίπτωση, τόσο οι μεταβολίτες όσο και το οχαμγλ ήταν μη αποτελεσματικοί στην μείωση του νηματώδη.

Το συμπέρασμα είναι ότι κανένας από τους 34 μεταβολίτες των βακτηρίων *Pseudomonas* sp και *Bacillus* sp δεν έδειξε αξιόλογο ενδιαφέρον για την αντιμετώπιση του νηματώδη *Xiphinema index*. Παρόμοια αναποτελεσματικότητα αξιολογήθηκε και στο νηματώδοκτονο οχαμγλ.

4 ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι

Βιβλιογραφικές Αναφορές

Aballay et al., 2017. Nematicidal effect of rhizobacteria on plant-parasitic nematodes associated with vineyards. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 33: 131

Aballay et al., 2012. Assessment of rhizobacteria from grapevine for their suppressive effect on the parasitic nematode *Xiphinema index*. *Crop Protection* 42: 36-41

Castaneda-Alvarez et al., 2015. Exoenzymes and metabolites related to the nematicidal effect of rhizobacteria on *Xiphinema index* Thorne & Allen. *Journal of Applied Microbiology* 120: 413-424

Aballay et al., 2011. Screening of rhizosphere bacteria from grapevine for their suppressive effect on *Xiphinema index* Thorne & Allen on in vitro grape plants. *Plant and Soil* 347: 313-325

Aballay et al., 2020. Assessment of rhizobacterial consortia to manage plant parasitic nematodes on grapevine. *Crop Protection* 131, 105103

E.A. Tzortzakakis, T.C. Thoden & A. Chatzaki, 2024. Investigation of fluazaindolizine as a potential novel tool to manage *Xiphinema index*. *Crop Protection* <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2024.106636>

T. Thoden, I.V.Pardavella & E.A. Tzortzakakis, 2019. *In vitro* sensitivity of different populations of *Meloidogyne javanica* and *M. incognita* to the nematicides Salibro and Vydate. *Nematology* 21: 889-893.