



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

Παραδοτέο Π.4.8.1: Αύξηση της προσαρμοστικής ικανότητας των φυτών κάλυψης με τεχνολογίες σπόρου (biopriming), σε ελεγχόμενες συνθήκες ανάπτυξης

Πληροφορίες για το έγγραφο

Αριθμός παραδοτέου: **Π.4.8.1**

Ενότητα εργασίας: **ΕΕ4**

Επικεφαλής δικαιούχος: **ΜΦΙ**

Συγγραφείς: **Χάχαλης Δημοσθένης, Αγγελική Πετράκη, Νικολίνα Βιδάλη**

Έκδοση: **1.0**

Είδος Παραδοτέου: **Έκθεση**

Ημερομηνία παράδοσης: **15 - 12 - 2025**

Στοιχεία Πράξης

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

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

Κωδικός πράξης: 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 | ΥΠΟΕΝΟΤΗΤΑ 1 | 4 |
| 1.1. | ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΣΤΟΧΟΙ..... | 4 |
| 1.2. | ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΩΝ ΕΡΓΑΣΙΩΝ | 5 |
| 1.2.1. | ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ | 5 |
| 1.2.2. | ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ | 8 |
| 1.2.3. | ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ- HYDRO & BIO-PRIMING..... | 17 |
| 1.3. | ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ HYDRO & BIO-PRIMING | 17 |
| 1.4. | ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι | 22 |
| 2. | ΥΠΟΕΝΟΤΗΤΑ 2 | 23 |
| 2.1. | ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΣΤΟΧΟΙ..... | 23 |
| 2.2. | ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΩΝ ΕΡΓΑΣΙΩΝ | 24 |
| 2.2.1. | ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ..... | 24 |
| 2.2.2. | ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ | 33 |
| 2.3. | ΣΥΝΟΨΗ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ | 42 |
| 2.4. | ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ | 43 |

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 αναπτύχθηκαν δράσεις που ενισχύουν την αποτελεσματικότητα της βιολογικής καταπολέμησης. Έγινε προσπάθεια για βελτίωση της προσαρμοστικότητας των ωφέλιμων αρπακτικών και ενίσχυση της δράσης τους, καθώς επίσης και αξιοποίηση της λειτουργικής βιοποικιλότητας για την ανάπτυξη καλύτερα προσαρμοσμένης βιολογικής καταπολέμησης. Αναπτύχθηκαν βελτιωμένα προϊόντα για τη βιολογική καταπολέμηση, διερευνώντας την αξιοποίηση άγριων αυτοφυών φυτών για την ενίσχυση των οικοσυστημικών υπηρεσιών για την αντιμετώπιση επιβλαβών οργανισμών μέσω της βιολογικής καταπολέμησης και ενισχύοντας την δράση παρασιτοειδών με χρήση ουσιών φυσικής προέλευσης ή/και «ωφέλιμων ιών». Αναπτύχθηκαν βελτιωμένες μέθοδοι για την αντιμετώπιση των εχθρών μέσω της χρήσης βακτηρίων και μικροοργανισμών. Τέλος, χρησιμοποιήθηκαν καινοτόμες μέθοδοι για την αντιμετώπιση των ζιζανίων, μέσω προσεγγίσεων αξιοποίησης της βιοποικιλότητας και καλλιεργητικών πρακτικών.

Συνοπτική παρουσίαση του παραδοτέου Π4.8.1

Στόχος του έργου ήταν η αξιολόγηση μιας καινοτόμου προσέγγισης ενίσχυσης σπόρων (biopriming/seed enhancement) σε σπόρους τομάτας, μέσω τεχνικής επικάλυψης (coating) με επιλεγμένους βιολογικούς παράγοντες (ωφέλιμοι βάκιλλοι, ζυμομύκητες και μυκόρριζα), και η εκτίμηση της αποτελεσματικότητάς τους υπό αβιοτική καταπόνηση. Η αξιολόγηση πραγματοποιήθηκε σε ελεγχόμενες συνθήκες με εφαρμογή καταπόνησης αλατότητας και ξηρασίας, με έμφαση σε δείκτες βλαστικότητας/φυτρώματος (ποσοστό βλάστησης, ρυθμός βλάστησης, T50), καθώς και σε φυσιολογικές και μορφολογικές παραμέτρους ανάπτυξης φυταρίων σε θερμοκήπιο (π.χ. SPAD, NDVI, βιομάζα, μήκη, νωπά/ξηρά βάρη). Η έλλειψη επαρκούς εδαφικής υγρασίας ή η επικράτηση χαμηλών θερμοκρασιών κατά τη σπορά θεωρούνται σημαντικά εμπόδια για γρήγορη και ομοιόμορφη φυτρωτικότητα, καθώς και στην ανάπτυξη των φυτών κατά τα πρώτα στάδια της καλλιέργειας. Τα φυτά εδαφοκάλυψης χρησιμοποιούνται ευρέως πλέον στα ολοκληρωμένα συστήματα διαχείρισης ζιζανίων

στη γεωργία. Στόχος, ήταν να αξιολογηθεί η επίδραση της υδατικής προμεταχείρισης των σπόρων, της βιολογικής προμεταχείρισης και συνδυασμός αυτών, στον ρυθμό βλαστικότητα και στην βελτίωση των αγρονομικών χαρακτηριστικών για την επιλογή τους ως φυτά εδαφοκάλυψης. Εφαρμόστηκε ειδικό πρωτόκολλο για την προμεταχείριση του σπόρου με το αιώρημα από σπόρια *B. subtilis* (strain NCBI 3610; ATTC 6051). Επιλέχθηκαν πέντε είδη, το λαθούρι (*Lathyrus sativus* L.) το μπιζέλι (*Pisum sativum* L.), το τριφύλλι (*Trifolium subterraneum* L.), ο βίκος (*Vicia sativa* L.) και το κριθάρι (*Hordeum vulgare* L.). Η αξιολόγηση πραγματοποιήθηκε σε ελεγχόμενες συνθήκες σε θάλαμο ανάπτυξης και το δεύτερο πείραμα, πραγματοποιήθηκε σε θερμοκήπιο.

1 Υποενότητα 1.

1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΣΤΟΧΟΙ

Η αύξηση της συχνότητας και της έντασης των αβιοτικών καταπονήσεων, όπως η ξηρασία και η αλατότητα, αποτελεί μία από τις σημαντικότερες προκλήσεις της σύγχρονης γεωργίας. Η κλιματική αλλαγή, σε συνδυασμό με την υποβάθμιση των εδαφικών πόρων και την περιορισμένη διαθεσιμότητα νερού, έχει οδηγήσει σε εκτεταμένα φαινόμενα υδατικού και οσμωτικού στρες, επηρεάζοντας αρνητικά την ανάπτυξη και την παραγωγικότητα των καλλιεργειών (Vurukonda et al., 2016).

Τα πρώιμα στάδια ανάπτυξης των φυτών, και ειδικότερα η βλάστηση των σπόρων και το φύτερωμα των φυταρίων, θεωρούνται ιδιαίτερα ευαίσθητα σε αβιοτικές καταπονήσεις. Η μειωμένη διαθεσιμότητα νερού ή η αυξημένη συγκέντρωση αλάτων μπορεί να προκαλέσει καθυστέρηση ή αναστολή της βλάστησης, μειωμένη εγκατάσταση και ανομοιομορφία της καλλιέργειας, με άμεσες επιπτώσεις στην τελική απόδοση (Ashraf & Foolad, 2005). Το πρόβλημα αυτό είναι ιδιαίτερα κρίσιμο για καλλιέργειες υψηλής οικονομικής σημασίας, όπως η τομάτα, όπου η επιτυχής εγκατάσταση της καλλιέργειας αποτελεί βασική προϋπόθεση για τη σταθερότητα και την ποιότητα της παραγωγής.

Η αντιμετώπιση των αβιοτικών καταπονήσεων βασίστηκε παραδοσιακά σε πρακτικές υψηλών εισροών, όπως η εντατική άρδευση ή η χρήση χημικών σκευασμάτων. Ωστόσο, οι πρακτικές αυτές συχνά συνοδεύονται από αυξημένο περιβαλλοντικό αποτύπωμα και περιορισμένη αποτελεσματικότητα σε συνθήκες παρατεταμένου στρες (Farooq et al., 2009). Στο πλαίσιο της μετάβασης προς πιο βιώσιμα και φιλικά προς το περιβάλλον συστήματα γεωργικής παραγωγής, αναδεικνύεται η ανάγκη για εναλλακτικές στρατηγικές που ενισχύουν τη φυσική προσαρμοστική ικανότητα των φυτών, ήδη από τα αρχικά στάδια ανάπτυξής τους.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι τεχνολογίες ενίσχυσης σπόρων (seed enhancement), όπως το priming και η επικάλυψη σπόρων (seed coating), οι οποίες επιτρέπουν τη στοχευμένη εφαρμογή ωφέλιμων μικροοργανισμών απευθείας στον σπόρο. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, οι τεχνικές αυτές μπορούν να βελτιώσουν τη βλαστικότητα, να επιταχύνουν το φύτερωμα και να ενισχύσουν την ανθεκτικότητα των φυτών σε συνθήκες αβιοτικού στρες (Paparella et al., 2015). Παράλληλα, η χρήση φυτοπροστατευτικών και βιοδιεγερτικών μικροοργανισμών, όπως βακίλλοι και άλλοι ωφέλιμοι μικροβιακοί παράγοντες, έχει συσχετιστεί με βελτιωμένη φυσιολογική

απόκριση των φυτών και καλύτερη εγκατάσταση υπό δυσμενείς περιβαλλοντικές συνθήκες (Ruzzi & Arco, 2015).

Στο πλαίσιο αυτό, το παρόν παραδοτέο εστιάζει στην αξιολόγηση της επίδρασης της επικάλυψης σπόρων τομάτας με επιλεγμένους βιολογικούς παράγοντες, υπό συνθήκες καταπόνησης αλατότητας και ξηρασίας, σε ελεγχόμενες συνθήκες ανάπτυξης. Η προσέγγιση αυτή στοχεύει στην ανάδειξη φιλικών προς το περιβάλλον λύσεων χαμηλών εισροών, οι οποίες μπορούν να συμβάλουν στη βελτίωση της εγκατάστασης και της αρχικής ανάπτυξης των φυτών, υποστηρίζοντας τη βιώσιμη γεωργική παραγωγή σε περιβάλλοντα αυξημένης περιβαλλοντικής πίεσης. Ταυτόχρονα, εστιάζει στην αξιολόγηση της επίδρασης υδατικής προμεταχείρισης των σπόρων, της βιολογικής προμεταχείρισης και συνδυασμός αυτών, στον ρυθμό βλαστικότητας και στην βελτίωση των αγρονομικών χαρακτηριστικών για την επιλογή τους ως φυτά εδαφοκάλυψης.

1.2. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΩΝ ΕΡΓΑΣΙΩΝ

1.2.1. Υλικά και Μέθοδοι

Για την υλοποίηση του συγκεκριμένου παραδοτέου πραγματοποιήθηκε τεχνική επικάλυψης σπόρων τομάτας (seed coating) με διαφορετικούς βιολογικούς παράγοντες, σε συνεργασία με το Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας και την ερευνητική ομάδα της κας Μαρκέλλου. Οι επικαλυμμένοι σπόροι χρησιμοποιήθηκαν τόσο σε δοκιμές βλαστικότητας σε τρυβλία Petri όσο και σε πειράματα σποράς σε γλάστρες, υπό τρεις διαφορετικές μεταχειρίσεις: μάρτυρα, καταπόνηση ξηρασίας (drought stress) και καταπόνηση αλατότητας (salt stress).

Οι βιολογικοί παράγοντες που δοκιμάστηκαν ήταν οι εξής:

- Βάκιλλος Α (*Bacillus halotolerans* – Cal.1.30),
- Βάκιλλος Β (*Bacillus velezensis* – Cal.1.29),
- Kusneria* (376, μείγμα βακίλλων),
- Ζυμομύκητας Α (248),
- Ζυμομύκητας Β (*Candida oleaceae* – 4.1.14),
- Ζυμομύκητας Γ (*Metschnikowia pulcherrima* – 4.1.15),
- Μυκόρριζα με βακίλλους (εμπορικό σκεύασμα: Vibramycin).

Επικάλυψη σπόρων

Για την επικάλυψη των σπόρων ακολουθήθηκε πρωτόκολλο του Εργαστηρίου Φυτοπαθολογίας. Μετά από προκαταρκτικές δοκιμές, καθορίστηκαν συγκεκριμένοι συνδυασμοί και ποσότητες Carboxymethyl Cellulose Sodium Salt (low viscosity) και Gomme Arabique για κάθε βιολογικό παράγοντα, ώστε να επιτυγχάνεται καλή προσκόλληση στην επιφάνεια του σπόρου, με τη χρήση ρόδας ανάδευσης.

Παράλληλα, χρησιμοποιήθηκε κόκκινο χρώμα ζαχαροπλαστικής, ώστε να είναι ορατό το αποτέλεσμα της ομοιόμορφης επικάλυψης. Για κάθε βιολογικό παράγοντα χρησιμοποιήθηκαν οι κατάλληλες ποσότητες του μίγματος επικάλυψης και των ανεπτυγμένων καλλιεργειών, σε falcon σωληνάρια, με διαχωρισμένες ποσότητες σπόρων.

Δοκιμή βλαστικότητας σε τρυβλία

Οι επικαλυμμένοι σπόροι τοποθετήθηκαν σε αποστειρωμένα τρυβλία Petri, σε τρεις

επαναλήψεις των 20 σπόρων ανά βιολογικό παράγοντα και μεταχείριση. Παράλληλα χρησιμοποιήθηκαν σπόροι-μάρτυρες χωρίς επικάλυψη, καθώς και σπόροι που έφεραν μόνο τα υλικά του coating χωρίς την παρουσία βιολογικού παράγοντα.

Για τις ανάγκες του πειράματος εφαρμόστηκαν δύο αβιοτικές καταπονήσεις σε όλες τις επεμβάσεις:

α) καταπόνηση αλατότητας (salt stress), με χρήση υδατικού διαλύματος ρυθμισμένης ηλεκτρικής αγωγιμότητας 5 dS m^{-1} ,

β) καταπόνηση ξηρασίας (drought stress), με χρήση πολυαιθυλενογλυκόλης (PEG – Polyethylene glycol) σε συγκέντρωση 20%, ώστε να επιτευχθεί υδατικό δυναμικό περίπου $-0,5 \text{ MPa}$, που αντιστοιχεί σε μέτρια καταπόνηση ξηρασίας.

Σε κάθε τρυβλίο τοποθετήθηκαν 20 σπόροι, μαζί με συγκεκριμένη ποσότητα του αντίστοιχου υδατικού διαλύματος και τοποθετήθηκαν σε θάλαμο ανάπτυξης σταθερών συνθηκών. Η καταμέτρηση των βλαστημένων σπόρων πραγματοποιήθηκε σε καθημερινή βάση μέχρι την παύση εμφάνισης νέων φυταρίων, σύμφωνα με το πρωτόκολλο βλαστικότητας της ISTA (1993).

Από τη δοκιμή αυτή προέκυψαν δεδομένα για το ποσοστό βλαστικότητας, τον ρυθμό βλάστησης και τον χρόνο που απαιτήθηκε για τη βλάστηση του 50% των σπόρων (T50). Ο ρυθμός βλάστησης υπολογίστηκε με τον τύπο που προτείνεται από τους Singh et al. (2018):

$$n_1/d_1 + (n_2-n_1)/d_2 + (n_3-n_2)/d_3 \dots n^{\text{th}} \text{ day}$$



Εικόνα 4.8.1.-1: Βλαστημένοι σπόροι επικαλυμμένοι με Bacillus A υπό συνθήκες αλατότητας



Εικόνα 4.8.1.-2: Αναπτυγμένα φυτάρια από αμεταχειριστούς σπόρους, συγκριτικά με σπόρους Bacillus A, σε συνθήκες control.



Εικόνα 4.8.1.-3: Συγκριτική φωτογραφία φυταρίων από τρυβλία με σπόρους επικαλυμμένους με ζυμομύκητα A, υπό συνθήκες control και αλατότητας.

Σπορά σε γλάστρες

Αντίστοιχα, πραγματοποιήθηκε σπορά των ίδιων βιολογικών παραγόντων σε γλάστρες με υπόστρωμα τύρφης και περλίτη σε αναλογία 3:1. Χρησιμοποιήθηκαν 15 σπόροι ανά γλάστρα και τρεις επαναλήψεις ανά μεταχείριση. Οι γλάστρες τοποθετήθηκαν σε θερμοκήπιο υπό ελεγχόμενες συνθήκες, σύμφωνα με τυχαίο πειραματικό σχέδιο.

Εφαρμόστηκαν οι ίδιες τρεις μεταχειρίσεις αβιοτικών καταπονήσεων. Στην περίπτωση της αλατότητας, χρησιμοποιήθηκε υδατικό διάλυμα με ρυθμισμένη ηλεκτρική αγωγιμότητα περίπου 5 dS m^{-1} . Για την καταπόνηση ξηρασίας υπολογίστηκε η υδατοχωρητικότητα της γλάστρας με το συγκεκριμένο υπόστρωμα και οι γλάστρες αρδεύονταν με το 60% της ποσότητας νερού που απαιτείται για πλήρη άρδευση, επιβάλλοντας πρακτικά καταπόνηση ξηρασίας 40%.

Ο υπολογισμός του επιθυμητού βάρους των γλαστρών έγινε βάσει σχετικού τύπου, ώστε οι αρδεύσεις να πραγματοποιούνται όταν το βάρος μειωνόταν στο προκαθορισμένο επίπεδο, με χρήση νερού βρύσης ή διαλύματος αυξημένης αγωγιμότητας, ανάλογα με τη μεταχείριση, όπως φαίνεται παρακάτω:

$$W_{\text{στόχος}} = W_{\text{γλάστρας}} + W_d + (W_{fc} - W_d) \times \frac{X}{100}$$

Κατά τη διάρκεια του πειράματος πραγματοποιήθηκε αρχικά, καθημερινή καταμέτρηση των βλαστημένων σπόρων μέχρι την παύση εμφάνισης νέων φυταρίων, ώστε να υπολογιστεί το ποσοστό φυτρώματος (emergence), ο ρυθμός βλάστησης και το T50, όπως και στα τρυβλία Petri. Στη συνέχεια αφαιρέθηκαν όλα τα φυτάρια, διατηρώντας τρία φυτά ανά γλάστρα για περαιτέρω μετρήσεις ανάπτυξης.

Περίπου 40 ημέρες μετά τη σπορά πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις SPAD (SPAD, %RH, N), NDVI και λήψη φωτογραφιών με το σύστημα Phenocheck. Ακολούθως, τα φυτά απομακρύνθηκαν και μετρήθηκαν το νωπό βάρος βλαστού και ρίζας, το μήκος του υπέργειου τμήματος, καθώς και τα ξηρά βάρη μετά από ξήρανση σε κατάλληλο φούρνο. Από τα δεδομένα αυτά υπολογίστηκε το ποσοστό υγρασίας του βλαστού και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση όλων των παραμέτρων, τα αποτελέσματα της οποίας παρουσιάζονται στο επόμενο κεφάλαιο.



Εικόνα 4.8.1.-4: Τυχαία απεικόνιση μέρους ανάπτυξης των φυτών.

1.2.2. Αποτελέσματα και Συζήτηση

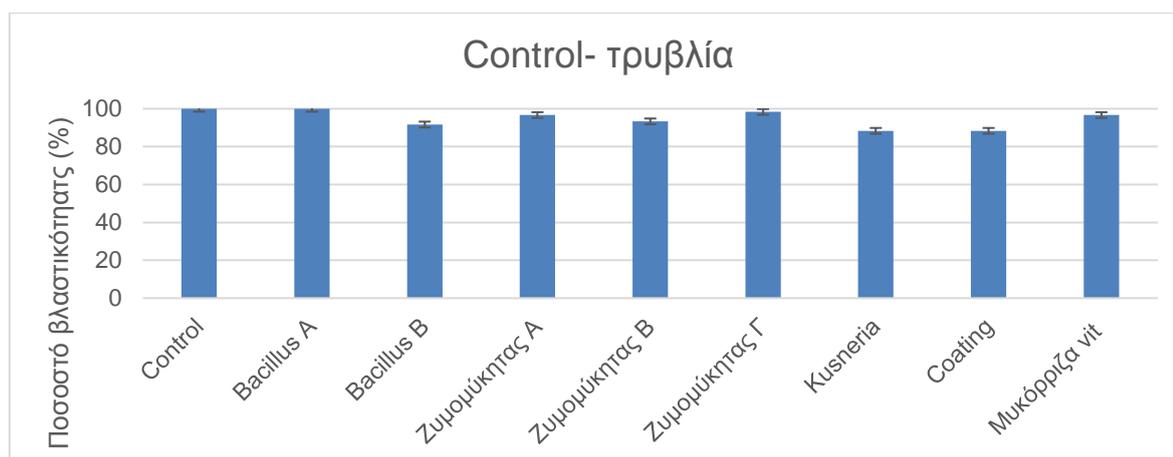
Α) Σπόροι σε τρυβλία

Η βλαστικότητα των σπόρων στα τρυβλία ήταν είτε υψηλότερη είτε στο ίδιο στατιστικό εύρος στους control σπόρους σε σύγκριση με τις μεταχειρίσεις αλατότητας. Συγκεκριμένα, υψηλότερη βλαστικότητα στους control παρατηρήθηκε στους αμεταχείριστους σπόρους, στο Bacillus A και στον ζυμομύκητα Γ, ενώ στους υπόλοιπους βιολογικούς παράγοντες δεν καταγράφηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές. Το T50 ήταν γενικά μικρότερο στους control σπόρους, με εξαίρεση τον ζυμομύκητα Γ, όπου επιτεύχθηκε ταχύτερα το 50% της τελικής βλάστησης. Ο ρυθμός βλάστησης

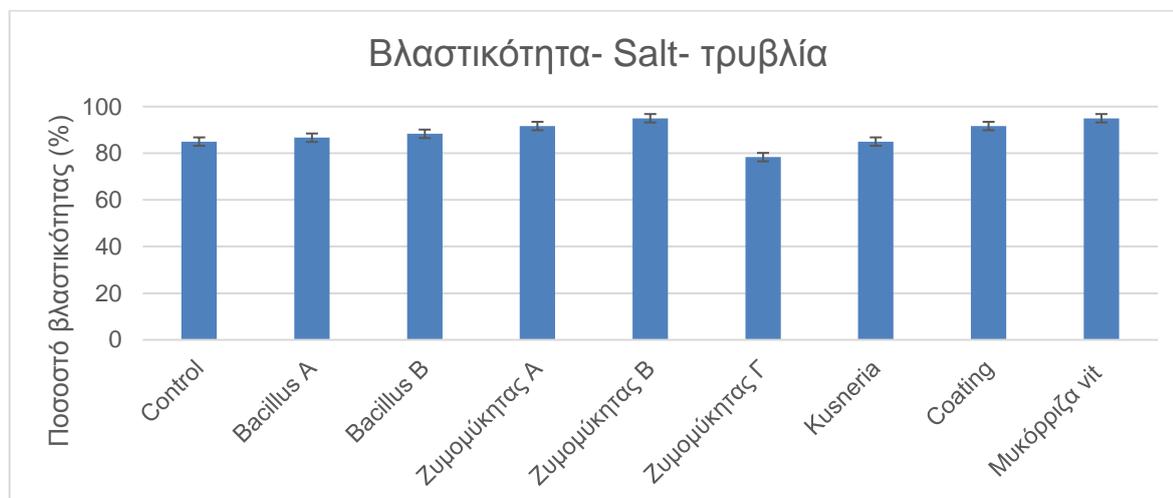
παρουσίασε διαφοροποιήσεις μεταξύ των μεταχειρίσεων, με υψηλότερες τιμές στους βακίλλους (A & B), στους ζυμομύκητες (B & Γ) και στην *Kusneria*, χωρίς ωστόσο σε όλες τις περιπτώσεις να παρατηρείται διαφορά μεταξύ control και αλατότητας.

Μεταξύ των βιολογικών παραγόντων, το *Bacillus A* εμφάνισε την καλύτερη συνολική απόκριση υπό αλατότητα, συνδυάζοντας υψηλό ποσοστό βλαστικότητας, χαμηλό T50 και αυξημένο ρυθμό βλάστησης. Αντίθετα, ο ζυμομύκητας Γ και η *Kusneria* παρουσίασαν μειωμένη βλαστικότητα και ρυθμό βλάστησης, καθώς και αυξημένο T50.

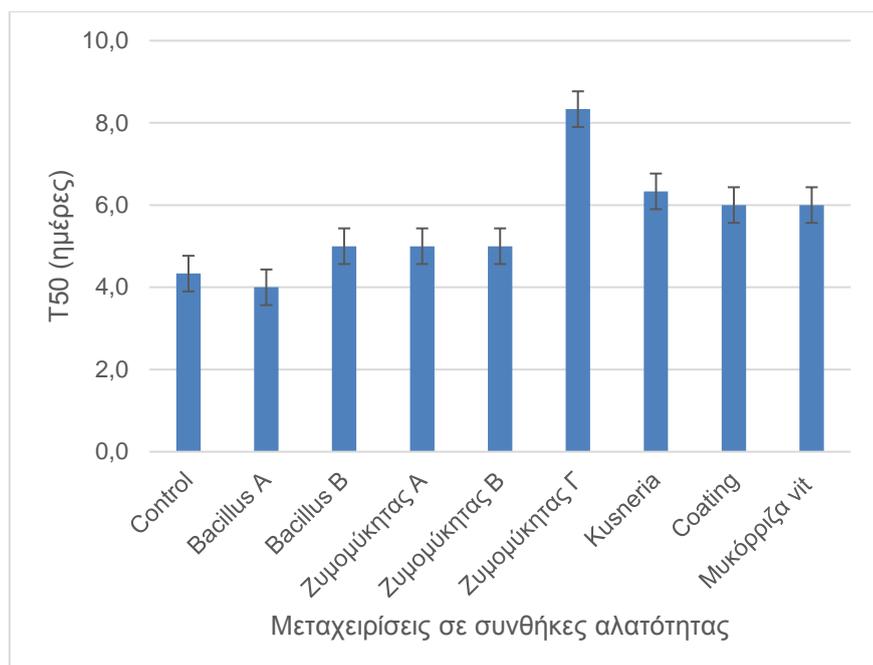
Τέλος, πρέπει να αναφερθεί πως τα αποτελέσματα καταπόνησης ξηρασίας σε τρυβλία δεν παρουσιάζονται, καθώς η εφαρμογή PEG 20% αναδείχθηκε μη βιώσιμη για όλες τις μεταχειρίσεις καθώς σχεδόν όλοι οι βιολογικοί παράγοντες δεν βλάστησαν υπό αυτές τις συνθήκες. Ωστόσο, ύστερα από έκπλυση και επαναληπτική δοκιμή βλαστικότητας, προέκυψε υψηλή βιωσιμότητα των σπόρων αυτών, ενώ πιλοτικές δοκιμές με χαμηλότερες συγκεντρώσεις PEG υποδεικνύουν ότι συγκέντρωση περίπου 10% θα μπορούσε να προκαλέσει μέτρια καταπόνηση και να είναι βιώσιμες συνθήκες βλάστησης και ανάπτυξης των σπόρων σε τρυβλία.



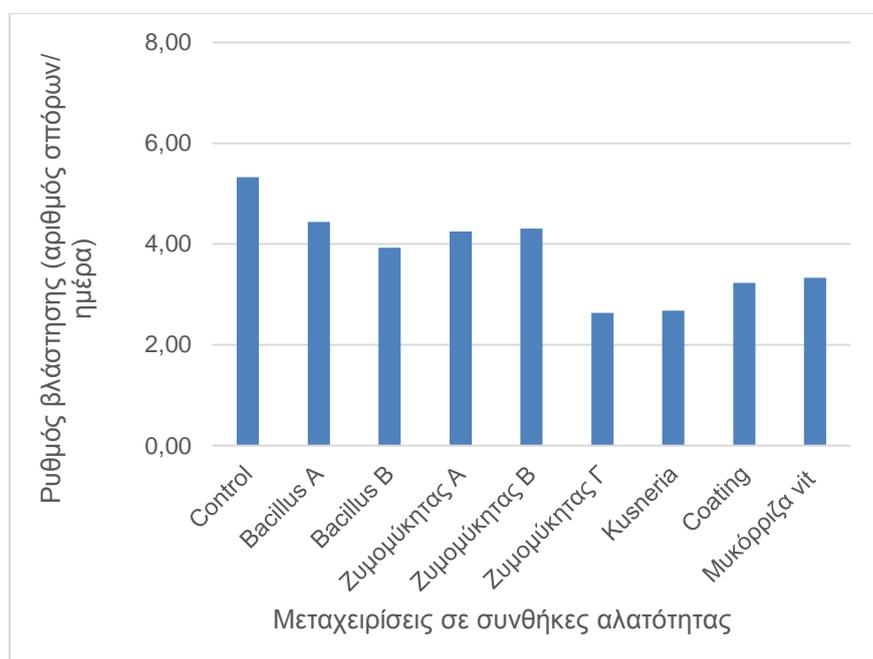
Γράφημα 4.8.1-1: Ποσοστό βλαστικότητας όλων των μεταχειρίσεων σε συνθήκες control



Γράφημα 4.8.1-2: Ποσοστό βλαστικότητας όλων των μεταχειρίσεων υπό συνθήκες αλατότητας



Γράφημα 4.8.1-3: Ημέρες που χρειάστηκαν οι σπόροι τομάτας για να βλαστήσει το 50% αυτών σε τρυβλία υπό συνθήκες αλατότητας.



Γράφημα 4.8.1-4: αριθμός σπόρων που βλάστησαν ανά ημέρα σε όλες τις μεταχειρίσεις σε συνθήκες αλατότητας στα τρυβλία

Β) Σπορά σε γλάστρες

Σε όλες τις μεταχειρίσεις και συνθήκες ανάπτυξης (μάρτυρες, αλατότητα και ξηρασία) παρατηρήθηκε γενικά υψηλή βλαστικότητα. Παρ' όλα αυτά, διαπιστώθηκε τάση για υψηλότερα ποσοστά στους μάρτυρες, ενώ η ξηρασία οδήγησε συχνά στα χαμηλότερα ποσοστά βλάστησης, ιδιαίτερα στους σπόρους με απλό coating. Υπό συνθήκες αλατότητας, οι σπόροι χρειάστηκαν κατά κανόνα 2–3 επιπλέον ημέρες για να φτάσουν το 50% της τελικής βλάστησης (T50), σε σύγκριση με τους μάρτυρες και τη ξηρασία, στους περισσότερους βιολογικούς παράγοντες (π.χ. Bacillus A και B, ζυμομύκητας Γ και μυκόρριζα). Ο ρυθμός βλάστησης παρουσίασε περιορισμένες και κυρίως μη στατιστικά σημαντικές διαφοροποιήσεις μεταξύ των μεταχειρίσεων.

Συγκρίνοντας τη δράση των βιολογικών παραγόντων, οι ζυμομύκητες, κυρίως οι Α και Β, ευνόησαν την καλύτερη εγκατάσταση των φυτών στις γλάστρες υπό συνθήκες αβιοτικής καταπόνησης (αλατότητα και ξηρασία), εμφανίζοντας υψηλή βλαστικότητα, αυξημένο ρυθμό βλάστησης και χαμηλότερο T50 σε σχέση με τους υπόλοιπους παράγοντες.

Όσον αφορά τις μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν κατά τη συγκομιδή, παρατηρήθηκαν διαφοροποιήσεις ανάλογα με την παράμετρο. Σε μετρήσεις όπως SPAD, σχετική υγρασία (%RH) και περιεκτικότητα σε Ν δεν καταγράφηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ μεταχειρίσεων ή συνθηκών ανάπτυξης. Αντίθετα, το NDVI βρέθηκε αυξημένο στους αμεταχειριστούς σπόρους, στο Bacillus A, στην *Kusneria* και στη μυκόρριζα, ανεξαρτήτως συνθηκών ανάπτυξης (μάρτυρες, αλατότητα και ξηρασία), υποδηλώνοντας καλύτερη φυτική ευρωστία. Ακόμη, κρίνοντας τον κάθε βιολογικό παράγοντα ξεχωριστά, πολλοί από αυτούς έφεραν υψηλότερο NDVI σε control συνθήκες και άλλοι σε συνθήκες αλατότητας (πχ ζυμομύκητας Α, Coating, μυκόρριζα).

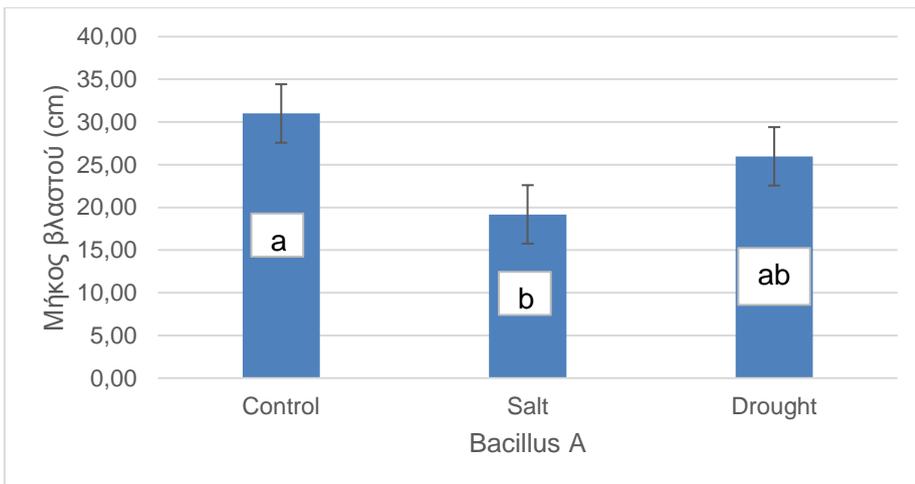
Η ανάπτυξη των βλαστών, όπως εκφράστηκε μέσω του μήκους και του νωπού βάρους, ευνοήθηκε κυρίως στις μεταχειρίσεις με Bacillus A και Β καθώς και στους ζυμομύκητες Α, Β και Γ, τόσο στους μάρτυρες όσο και υπό συνθήκες αλατότητας και ξηρασίας. Παρόμοια αποτελέσματα άλλωστε αναφέρονται και στην μελέτη των Gowtham et al οι οποίοι αναφέρουν ότι το coating με Bacillus subtilis ενισχύει την αντοχή και ανάπτυξη των φυτών τομάτας υπό συνθήκες ξηρασίας ενεργοποιώντας μηχανισμούς άμυνας. Ακόμη, η θετική επίδραση των ζυμομυκήτων, ίσως να οφείλεται στο γεγονός ότι συμβάλλουν στη ρύθμιση της φυτικής ορμονικής ισορροπίας, κυρίως μέσω παραγωγής αυξινών (IAA), ενισχύοντας την ανάπτυξη του ριζικού συστήματος και την πρόσληψη νερού και θρεπτικών στοιχείων (Bajus et al., 2025). Παράλληλα, μπορούν να μετριάσουν το οξειδωτικό στρες και να υποστηρίξουν τη διατήρηση της φωτοσυνθετικής ικανότητας, οδηγώντας σε βελτιωμένη φυτική ευρωστία και ανάπτυξη του βλαστού, όπως καταγράφηκε και στην παρούσα μελέτη.

| | | NDVI |
|--------------------------|---------|------|
| Αμεταχειριστοι σπόροι | Control | 0.77 |
| | Salt | 0.72 |
| | Drought | 0.74 |
| Bacillus A | Control | 0.74 |
| | Salt | 0.68 |
| | Drought | 0.61 |
| Bacillus B | Control | 0.32 |
| | Salt | 0.40 |
| | Drought | 0.29 |
| Ζυμομύκτης Α | Control | 0.51 |
| | Salt | 0.55 |
| | Drought | 0.38 |
| Ζυμομύκτης Β | Control | 0.54 |
| | Salt | 0.44 |
| | Drought | 0.45 |
| Ζυμομύκτης Γ | Control | 0.46 |
| | Salt | 0.45 |
| | Drought | 0.26 |
| Kusneria | Control | 0.60 |
| | Salt | 0.65 |
| | Drought | 0.51 |
| Coating | Control | 0.37 |
| | Salt | 0.47 |
| | Drought | 0.25 |
| Μυκόρριζα vit | Control | 0.59 |
| | Salt | 0.69 |
| | Drought | 0.50 |

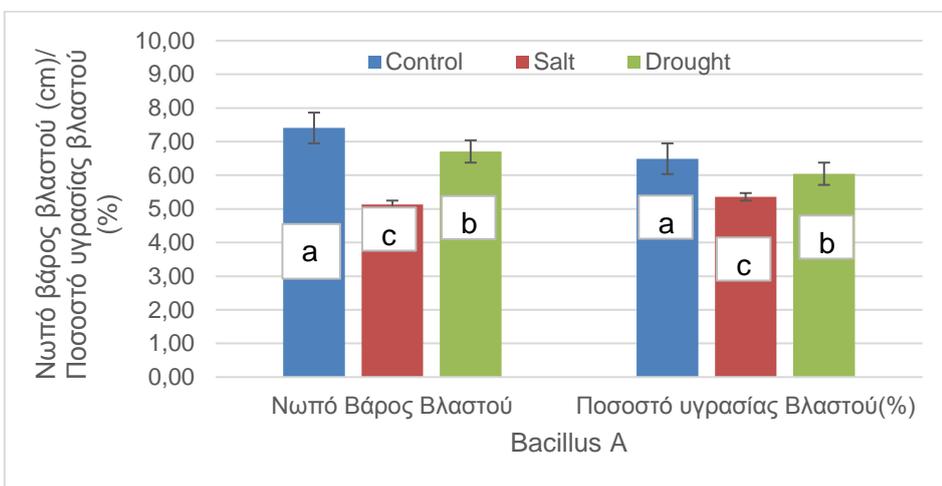
Πίνακας 4.8.1-1: Μετρήσεις NDVI σε όλες τις μεταχειρίσεις σε συνθήκες την ημέρα συγκομιδής των φυτών

Αντίθετα, οι σπόροι που επικαλύφθηκαν με *Kusneria* ή μόνο με coating παρουσίασαν τη μικρότερη ανάπτυξη, ιδιαίτερα υπό συνθήκες αβιοτικής καταπόνησης. Το ποσοστό υγρασίας του βλαστού ήταν υψηλότερο στους αμεταχειριστούς σπόρους και στο Bacillus A, ενώ οι υπόλοιπες μεταχειρίσεις κινήθηκαν σε χαμηλότερα και μεταξύ τους παρόμοια επίπεδα.

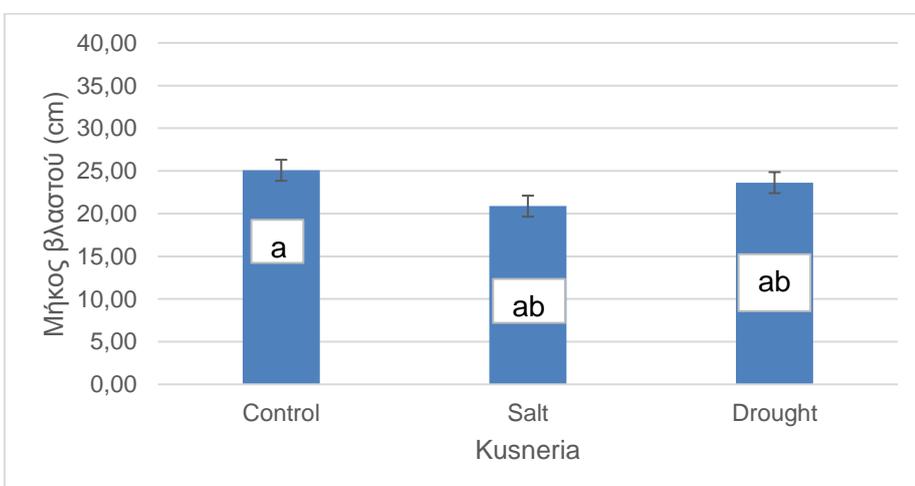
Αναφορικά με την επίδραση των συνθηκών ανάπτυξης, παρατηρήθηκε ότι υπό συνθήκες ξηρασίας οι μάρτυρες, οι βάκιλλοι και οι ζυμομύκτες διατήρησαν ή και βελτίωσαν την ανάπτυξη του βλαστού, παρουσιάζοντας τιμές συγκρίσιμες με τον μάρτυρα ή τουλάχιστον υψηλότερες από την αλατότητα. Επιπλέον, σε πολλές περιπτώσεις τα φυτά που υπέστησαν ξηρασία εμφάνισαν υψηλότερο ποσοστό υγρασίας στον βλαστό.



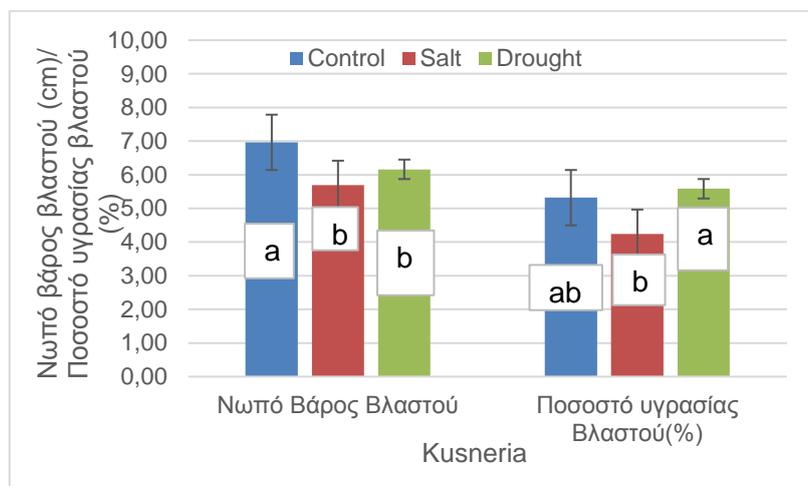
Γράφημα 4.8.1-5: Μήκος βλαστού φυτών με Bacillus A σε όλες τις συνθήκες σε γλάστρες



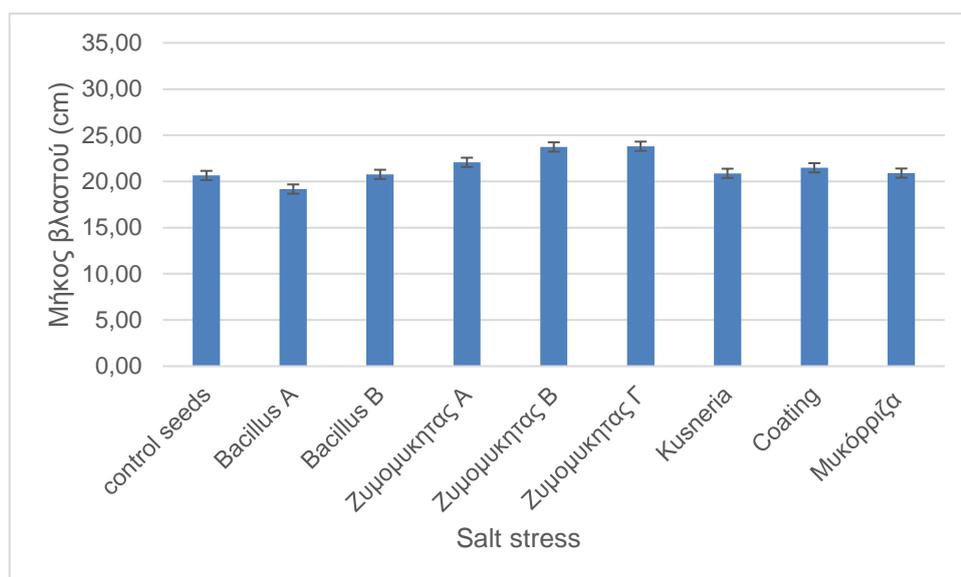
Γράφημα 4.8.1-6: Νωπό βάρος και ποσοστό υγρασίας βλαστού σε Bacillus A σε όλες τις συνθήκες σε γλάστρες



Γράφημα 4.8.1-7:: Μήκος βλαστού φυτών με Kusneria σε όλες τις συνθήκες σε γλάστρες



Γράφημα 4.8.1-8:Νωπό βάρος και ποσοστό υγρασίας βλαστού σε Kusneria σε όλες τις συνθήκες σε γλάστρες



Γράφημα 4.8.1-9: Μήκος βλαστού σε όλες τους βιολογικούς παράγοντες υπό συνθήκες αλατότητας

Τα νωπά και ξηρά βάρη των ριζών δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ μεταχειρίσεων ή συνθηκών ανάπτυξης. Ωστόσο, η οπτική αξιολόγηση έδειξε ότι τα φυτά που αναπτύχθηκαν υπό αλατότητα εμφάνισαν γενικά πιο αδύναμο ριζικό σύστημα, με λιγότερα πλευρικά ριζίδια, σε σύγκριση με τους μάρτυρες και τη ξηρασία. Ορισμένοι βιολογικοί παράγοντες, όπως το Bacillus A, οδήγησαν στη δημιουργία πιο ανεπτυγμένου ριζικού συστήματος ακόμη και υπό συνθήκες καταπόνησης, γεγονός που συνδέεται με τη βελτιωμένη βλαστική ανάπτυξη του υπέργειου μέρους των φυτών που παρατηρήθηκε στις αντίστοιχες μεταχειρίσεις.

Η βελτιωμένη ανάπτυξη του ριζικού συστήματος φυτών υπό συνθήκες αβιοτικής καταπόνησης με τη χρήση βακίλλων και ζυμομυκήτων έχει τεκμηριωθεί σε προηγούμενες μελέτες και αποδίδεται στη φυτοπροαγωγική τους δράση μέσω διαφορετικών μηχανισμών. Σύμφωνα με τους Wang et al. (2019) και Patani et al. (2023), στελέχη του γένους *Bacillus* λειτουργούν ως αποτελεσματικοί PGPR, προάγοντας την ανάπτυξη των ριζών μέσω παραγωγής αυξινών, δραστηριότητας ACC deaminase και βελτίωσης της πρόσληψης νερού και θρεπτικών στοιχείων, οδηγώντας σε αυξημένο ριζικό όγκο και καλύτερη αντοχή των φυτών σε συνθήκες ξηρασίας και

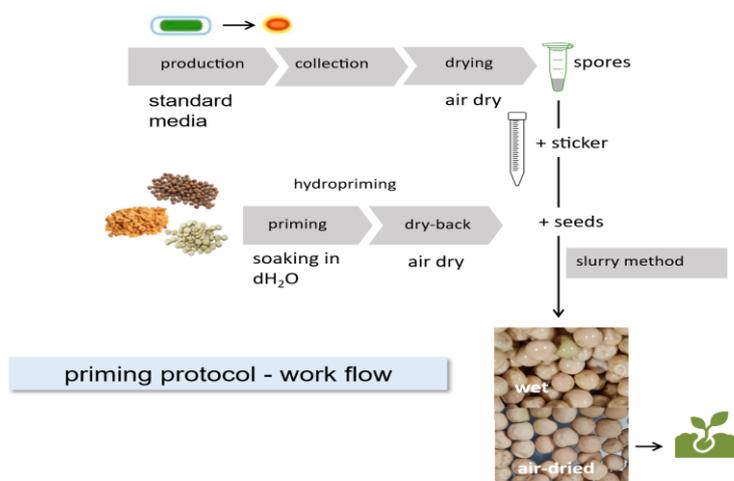
αλατότητας. Παράλληλα, έχει αναφερθεί ότι ορισμένοι ζυμομύκητες μπορούν να συμβάλλουν θετικά στη ριζική ανάπτυξη και στη διατήρηση της ριζικής δραστηριότητας υπό υδατικό ή ωσμωτικό στρες, είτε μέσω ρύθμισης της φυτικής ορμονικής ισορροπίας είτε μέσω ενίσχυσης των αντιοξειδωτικών μηχανισμών του φυτού, όπως αναφέρεται από τους Boenel et al. (2023) και Raklami et al. (2024). Οι επιδράσεις αυτές υποστηρίζουν τον ρόλο τόσο των βακίλλων όσο και των ζυμομυκήτων ως βιολογικών παραγόντων που μπορούν να βελτιώσουν τη ριζοβολία και τη συνολική φυτική ευρωστία υπό συνθήκες αβιοτικής καταπόνησης.



Εικόνα 4.8.1.5: Εξέλιξη της ανάπτυξης των φυτών με βάκιλλο A, σε διαφορετικά στάδια ανάπτυξης και στις 3 συνθήκες μεταχείρισης.

1.2.3. Υλικά και Μέθοδοι- Hydro & Bio-priming

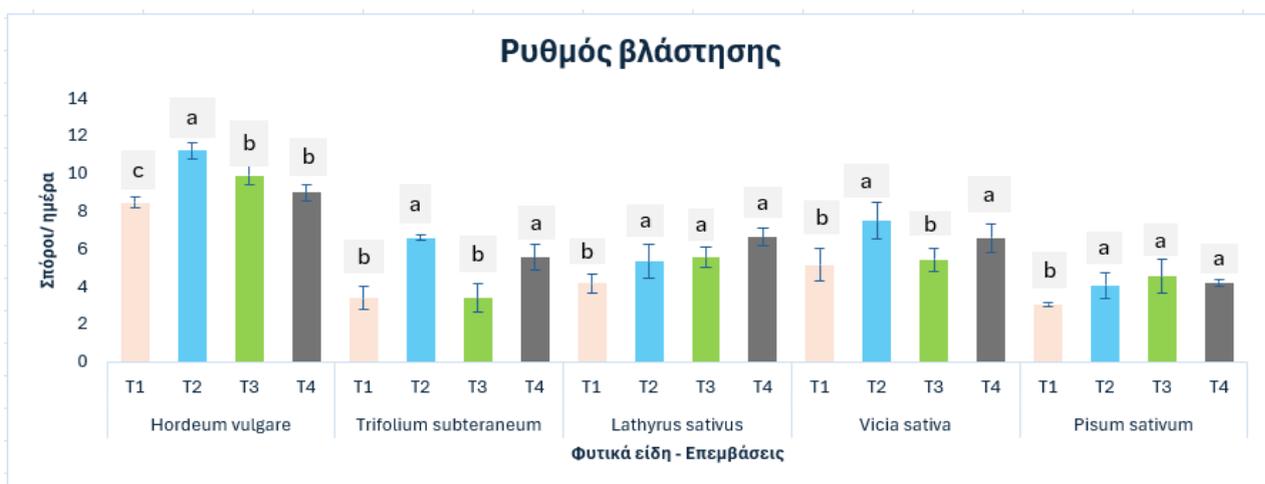
Όλες οι διαδικασίες προετοιμασίας εκτελέστηκαν σε θερμοκρασία δωματίου (~25 °C). Για τις μεταχειρίσεις με ενυδάτωση (T2 και T4), οι σπόροι εμποτίστηκαν σε δοχείο με νερό για διάστημα 8 h. Ακολούθως οι σπόροι απλώθηκαν σε απορροφητικό χαρτί και αφέθηκαν για 24 h. Για τις μεταχειρίσεις (biopriming T3 και Hydro-bio priming T4) οι σπόροι εμβαπτίστηκαν σε διάλυμα σακχαρόζης (10% w/v) και *Bacillus subtilis* (στέλεχος NCBI 3610· ATCC 6051) όπου οι σπόροι παρέμειναν για 24h.



Εικόνα 4.8.1.6: Πρωτόκολλο προμεταχειρίσεων σπόρων

Για την διεξαγωγή των δοκιμών, πραγματοποιήθηκαν όλες οι προ-μεταχειρίσεις των σπόρων σύμφωνα με το πρωτόκολλο, και τοποθετήθηκαν σπόροι είτε σε τρυβλία όπου παρέμειναν σε θάλαμο σταθερών συνθηκών, είτε σε δοχεία με τύρφη: περλίτη (3:1) όπου παρέμειναν στο θερμοκήπιο. Πραγματοποιούνταν καθημερινή καταγραφή των σπόρων που βλάστησαν στα τριβλία και στο θερμοκήπιο. Μετρήθηκε το νωπό βάρος και το μήκος της ρίζας των σπόρων. Μετρήθηκε το νωπό βάρος και το μήκος της ρίζας καθώς και το νωπό βάρος του υπέργειου μέρους των φυτών στο θερμοκήπιο.

1.3. Αποτελέσματα και Συζήτηση Hydro & Bio-priming



Γράφημα 4.8.1.10: Ρυθμός βλάστησης σπόρων σε τρυβλία

Ο ρυθμός βλάστησης αυξήθηκε σε όλες τις προμεταχειρίσεις σπόρων και για τα πέντε είδη. Για το *Hordeum vulgare*, *Trifolium subteraneum* και *Vicia sativa* στην T2 προμεταχείριση παρατηρήθηκε αύξηση του ρυθμού βλαστικότητας.



Γράφημα 4.8.1.11 Μήκος ρίζας των σπόρων σε τρυβλία

Το μήκος της ρίζας αυξήθηκε σε όλες τις προμεταχειρίσεις των σπόρων, παρουσιάζοντας διαφορά μεταξύ των μεταχειρίσεων και μεταξύ των ειδών. Οι μεταχειρίσεις T2 και T4 αύξησαν σε όλα τα φυτικά είδη τον ρυθμό βλάστησης των σπόρων, και ακολούθησε η μεταχείριση T3, συγκρινόμενα με τον μάρτυρα.

Σε όλα τα φυτά εκτός από τα *Lathyrus sativus* αυξήθηκε το μήκος τις ρίζας με όλες τις προ-μεταχειρίσεις



Εικόνα 4.8.1.7 Συγκριτική φωτογραφία σπόρων από τρυβλία



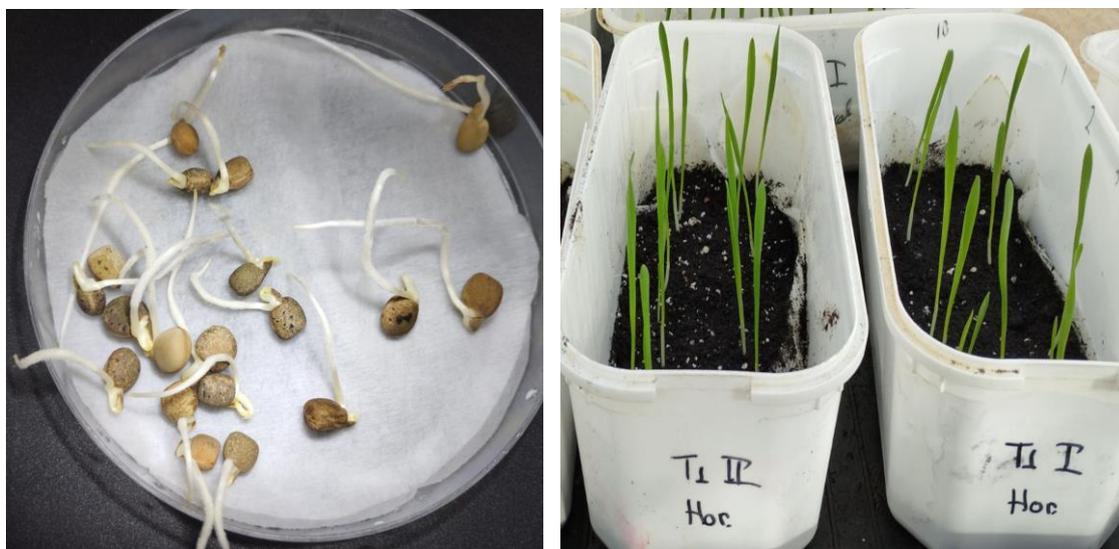
Γράφημα 4.8.1.12: Ποσοστό βλάστησης σε θερμοκήπιο

Στις περισσότερες περιπτώσεις, οι προμεταχειρίσεις, και ιδίως η T4 επίδρασε θετικά στο τελικό ποσοστό βλάστησης των σπόρων, σε σύγκριση με τους μάρτυρες. Εξαιρέση αποτελεί η μείωση του ποσοστού αυτού στο Lathyrus Sativus υπό την T3 μεταχείριση.



Γράφημα 4.8.1.13 : Βάρος ρίζας στο θερμοκήπιο

Θετική είναι η επίδραση των προμεταχειρίσεων στο τελικό βάρος της ρίζας που μετρήθηκε σε σύγκριση με τους μάρτυρες T1.



Εικόνες 4.8.1.8,9: Φωτογραφίες κατά την διάρκεια των δοκιμών σε θάλαμο και θερμοκήπιο

1.4. ΣΥΝΟΨΗ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Αρχικά η παρούσα μελέτη αξιολόγησε τη δράση διαφορετικών βιολογικών παραγόντων μέσω επικάλυψης σπόρων τομάτας, τόσο σε πειράματα βλάστησης σε τρυβλία όσο και σε σπορά σε γλάστρες, υπό συνθήκες αβιοτικής καταπόνησης (αλατότητα και ξηρασία). Τα αποτελέσματα ανέδειξαν σαφείς διαφοροποιήσεις μεταξύ των βιολογικών

παραγόντων, τόσο ως προς τη βλαστικότητα όσο και ως προς την ανάπτυξη και εγκατάσταση των φυτών.

Στα πειράματα σε τρυβλία, η αλατότητα επηρέασε αρνητικά τη βλαστικότητα και την ταχύτητα βλάστησης σε σύγκριση με τους μάρτυρες, με το Bacillus A να παρουσιάζει την καλύτερη συνολική απόκριση, συνδυάζοντας υψηλό ποσοστό βλαστικότητας, χαμηλό T50 και αυξημένο ρυθμό βλάστησης. Αντίθετα, ο ζυμομύκητας Γ και η Kusneria εμφάνισαν μειωμένη απόδοση υπό συνθήκες αλατότητας. Η εφαρμογή PEG 20% για προσομοίωση ξηρασίας αποδείχθηκε μη βιώσιμη για τη βλάστηση σε τρυβλία, γεγονός που υποδεικνύει ότι τόσο υψηλά επίπεδα ωσμωτικής καταπόνησης δεν επιτρέπουν αξιόπιστη αξιολόγηση των βιολογικών παραγόντων στο στάδιο της βλάστησης σε εργαστηριακή δοκιμή σε τρυβλία.

Στις γλάστρες, όπου αξιολογήθηκε η ανάπτυξη των φυτών σε πιο ρεαλιστικές συνθήκες, παρατηρήθηκε γενικά υψηλή βλαστικότητα σε όλες τις μεταχειρίσεις, με τους μάρτυρες να υπερέχουν και τη ξηρασία να επιφέρει συχνά τα χαμηλότερα ποσοστά συγκριτικά με τις άλλες δύο συνθήκες ανάπτυξης αλλά παραμένοντας σε υψηλά επίπεδα. Υπό συνθήκες αλατότητας, καταγράφηκε καθυστέρηση στο T50 στους περισσότερους βιολογικούς παράγοντες. Ωστόσο, οι ζυμομύκητες, και ιδιαίτερα οι Α και Β, ευνόησαν την καλύτερη εγκατάσταση των φυτών υπό αβιοτική καταπόνηση, εμφανίζοντας υψηλή βλαστικότητα, αυξημένο ρυθμό βλάστησης και χαμηλότερο T50.

Όσον αφορά την ανάπτυξη των φυτών, οι μεταχειρίσεις με Bacillus A και Β καθώς και με ζυμομύκητες (Α, Β και Γ) οδήγησαν σε αυξημένο μήκος και νωπό βάρος βλαστού, τόσο στην αλατότητα όσο και στην ξηρασία. Το Bacillus A ξεχώρισε επιπλέον για τη δημιουργία πιο ανεπτυγμένου ριζικού συστήματος, ακόμη και υπό συνθήκες καταπόνησης, γεγονός που συνδέεται με τη συνολικά βελτιωμένη φυτική ευρωστία. Αντίθετα, η Kusneria και το απλό coating παρουσίασαν περιορισμένη συμβολή στην ανάπτυξη, ιδίως υπό αβιοτικού στρες.

Συνολικά, τα αποτελέσματα καταδεικνύουν ότι το Bacillus A αποτελεί τον πιο αποτελεσματικό βιολογικό παράγοντα για την ενίσχυση της ανάπτυξης της τομάτας τόσο στο στάδιο της βλάστησης όσο και της μεταγενέστερης ανάπτυξης, ενώ οι ζυμομύκητες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο κυρίως στη βελτίωση της εγκατάστασης και της υπέργειας ανάπτυξης υπό συνθήκες αβιοτικής καταπόνησης. Οι διαφορές αυτές αναδεικνύουν τη σημασία της επιλογής κατάλληλου βιολογικού παράγοντα και τρόπου εφαρμογής για την ενίσχυση της ανθεκτικότητας των φυτών σε συνθήκες περιβαλλοντικού στρες.

Στο δεύτερο πείραμα, σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας, συμπεραίνεται πως υπάρχει θετική ανταπόκριση των σπόρων στις προμεταχειρίσεις που διενεργήθηκαν, με κυρίαρχες τις T2 και T4, διασφαλίζοντας καλύτερη βλαστικότητα και αρχική εγκατάσταση των φυτών εδαφοκάλυψης που χρησιμοποιήθηκαν, ώστε να ανταπεξέλθουν καλύτερα στον ανταγωνισμό με τα ζιζάνια.

Συνεπώς, η προμεταχείριση των σπόρων με εμβάπτιση σε νερό και σε βάκιλλο, μπορεί να αποτελέσει ένα πολύτιμο εργαλείο για τη βιώσιμη γεωργία, συμβάλλοντας στη μείωση της χρήσης ζιζανιοκτόνων και στη βελτίωση της παραγωγικότητας και της διαχείρισης των καλλιεργειών.

1.4. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι

Βιβλιογραφικές Αναφορές

- Ashraf, M., & Foolad, M. R. (2005). Pre-sowing seed treatment—A shotgun approach to improve germination, plant growth, and crop yield under saline and non-saline conditions. *Advances in Agronomy*, 88, 223–271.
- Bajus M., Vivodová Z., Bačovčinová M., Labancová E., Kučerová D., Horvátová Á., Holeková K., Hačkuličová D., Vadkertiová R., Kollárová K., 2025. The yeast *Papiliotrema laurentii* alleviates drought-induced stress in maize and affects oxidative status, LEA genes, hormone concentrations, and fatty acid allocation. *Current Plant Biology*, vol. 44.
- Balestrazzi Alma, et al. Seed quality as a proxy of climate-ready orphan legumes: the need for a multidisciplinary and multi-actor vision. *Frontiers in Plant Science*, 2024, 15: 1388866.
- Boenel M., Salas P., Quiroga M., Molina R., 2023. Yeast inoculation improves growth and physiological performance of tomato plants under water stress conditions. *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias (UNCuyo)*, vol. 55(2).
- Farooq, M., Basra, S. M. A., Wahid, A., Ahmad, N., & Saleem, B. A. (2009). Improving drought tolerance in crops through seed priming. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 195, 237–246.
- Gowtham H.G., Brijesh Singh S., Murali M., Shilpa N., Melvin Prasad, Mohammed Aiyaz, Amruthesh K. N., Niranjana S.R., 2020. Induction of drought tolerance in tomato upon the application of ACC deaminase producing plant growth promoting rhizobacterium *Bacillus subtilis* Rhizo SF 48. *Microbiological Research*, Vol 234.
- ISTA (International Seed Testing Association). International rules for seed testing. *Seed Science Technology*, 1993, 21.
- Paparella, S., Araujo, S. S., Rossi, G., Wijayasinghe, M., Carbonera, D., & Balestrazzi, A. (2015). Seed priming: State of the art and new perspectives. *Plant Cell Reports*, 34, 1281–1293.
- Patani A., Khezri M., Ebrahimzadeh A., Hosseini S., 2023. Plant growth-promoting *Bacillus* strains improve growth and physiological responses of tomato under salinity stress. *Frontiers in Plant Science*, vol. 14.
- Radhakrishnan R., Hashem A., Abdhalla E.F., 2017. *Bacillus*: A Biological Tool for Crop Improvement through Bio-Molecular Changes in Adverse Environments. *Front Physiol* 8:667
- Raklami A., Tahiri A., Bechtaoui N., Meddich A., Oufdou K., 2024. Stress-tolerant yeasts as plant growth-promoting microorganisms under abiotic stress conditions. *FEMS Microbiology Letters*, vol. 371.
- Ruzzi, M., & Aroca, R. (2015). Plant growth-promoting rhizobacteria act as biostimulants in horticulture. *Scientia Horticulturae*, 196, 124–134.
- Singh, K., Gupta, N. & Dhingra, M. (2018). Effect of temperature regimes, seed priming and priming duration on germination and seedling growth on American cotton. *Journal of Environmental Biology*, 39, 83–91.
- Vurukonda, S. S. K. P., Vardharajula, S., Shrivastava, M., & SkZ, A. (2016). Enhancement of drought stress tolerance in crops by plant growth promoting rhizobacteria. *Microbiological Research*, 184, 13–24.

- Wang X., Wang C., Sui J., Liu Z., Li Q., Ji C., Song X., Hu Y., 2019. *Bacillus amyloliquefaciens* enhances drought tolerance in tomato by regulating antioxidant defense, hormone signaling and root development. *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 20(22).

2. Υποενότητα 2

Συγγραφείς: Αιμιλία Μαρκέλλου, Θεώνη Μαργαριτοπούλου, Δέσποινα-Μαρία Στικά, Σπυρίδων Νάστος, Μαρία Κωστοπούλου, Αλεξία Λογοθέτη

2.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΣΤΟΧΟΙ

Η εγκατάσταση των καλλιεργειών στον αγρό είναι το πιο σημαντικό στάδιο στον κύκλο ζωής των καλλιεργειών, το οποίο εξαρτάται από την ποιότητα των σπόρων πριν από τη σπορά. Από τη συγκομιδή έως τη σπορά, ένα ευρύ φάσμα παραγόντων, συμπεριλαμβανομένης του γενετικού υπόβαθρου και των επικρατούσων περιβαλλοντικών συνθηκών, μπορεί να έχει σημαντική επίδραση στην ποιότητα των σπόρων. Αυτοί οι παράγοντες, μεμονωμένα ή σε συνδυασμό, μπορούν να προκαλέσουν τεράστια οικονομική ζημία. Ωστόσο, ο έλεγχος όλων αυτών των παραγόντων για τη βελτίωση της ποιότητας των σπόρων είναι ένα δύσκολο έργο για τους αγρότες, ωστόσο, ορισμένοι από τους παράγοντες του προγράμματος θα μπορούσαν να ελεγχθούν για αυτόν το σκοπό. Για την αντιμετώπιση του ζητήματος, οι φυσικές ιδιότητες των σπόρων μπορούν να τροποποιηθούν με την εξωγενή εφαρμογή ορισμένων φυσικών, χημικών ή βιολογικών ενώσεων απευθείας στην επιφάνεια μέσω ενός φυσικού περιβλήματος στον σπόρο. Η εφαρμογή επικαλύψεων μέσω της επικάλυψης των σπόρων μπορεί να βελτιώσει την βλαστική ικανότητα, να ενισχύει τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των φυτών, την απόδοση και, το πιο σημαντικό, την αποτελεσματικότητα της εγκατάστασης των σπόρων. Επιπλέον, η επικάλυψη των σπόρων προσφέρει μια ελκυστική επιλογή ως εργαλείο για την ενίσχυση της εγκατάστασης των καλλιεργειών, προωθώντας τις προκλήσεις που αντιμετωπίζουν τα γεωργικά συστήματα και την αποκατάσταση υποβαθμισμένων εδαφών.

Επίσης, η επικάλυψη των σπόρων μπορεί να ενισχύσει σημαντικά την αντοχή των νεαρών φυταρίων σε παθογόνα, αξιοποιώντας ωφέλιμους μικροοργανισμούς (των γενών *Bacillus* και *Trichoderma*) απευθείας στους σπόρους, δημιουργώντας ένα προστατευτικό βιοφίλμ για την καταπολέμηση των ασθενειών που μεταδίδονται από το έδαφος ή/και τους σπόρους, προκαλώντας συστηματική ανθεκτικότητα στα φυτά ή μπλοκάροντας φυσικά τα παθογόνα, ενώ παράλληλα μπορεί να ενισχύσουν τη βλάστηση των σπόρων και την ανάπτυξη φυταρίων, για βιώσιμη γεωργία.

Ο σκοπός του παρόντος εγγράφου είναι η παρουσίαση των αποτελεσμάτων καινοτόμου έρευνας στα πλαίσια του παραδοτέου Π4.8.1, που αφορά τη χρήση βιολογικών παραγόντων με τεχνολογία επικάλυψης στο σπόρο για την αύξηση της ανθεκτικότητας των φυτών σε παθογόνα εδάφους όπως είναι ο ωομύκητας *Phytophthora nicotianae* και ο μύκητας *Verticillium dahliae*. Επίσης, η τεχνική βιοκάλυψης δοκιμάστηκε και σε φυτά αγγουριού προκειμένου να μελετηθεί αν αυξάνει η ανθεκτικότητα των φυτών ενάντια στον βιοτροφικό μύκητα φυλλώματος *Podospahera xanthii*.

2.2. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΩΝ ΕΡΓΑΣΙΩΝ

Σε αυτή τη μελέτη, δοκιμάστηκαν διάφορες συγκεντρώσεις των βιοπολυμερών καρβοξυμεθυλοκυτταρίνη (CMC) και αραβικό κόμμι (Arabic gum) για την αποτελεσματικότητά τους ως παράγοντες επικάλυψης σε συνδυασμό με διαφορετικούς βιολογικούς παράγοντες όπως τα στελέχη γένους *Bacillus* Cal.l.30 και Cal.r.29, το στέλεχος του γένους *Metschnikowia* 4.1.14, το στέλεχος του γένους *Candida* 4.1.15, το στέλεχος του γένους *Kushneria* 376, και το στέλεχος ζυμομύκητα 248. Η επικάλυψη εφαρμόστηκε σε σπόρους τομάτας *Solanum lycopersicum* και σπόρους μελιτζάνας *Solanum melongela*.

Αρχικά, οι σπόροι υποβλήθηκαν σε ξεχωριστή επεξεργασία σε διαλύματα βιοπολυμερών και εξετάστηκαν ως προς τη βλαστική τους ικανότητα. Οι κατάλληλες συγκεντρώσεις βιοπολυμερών χρησιμοποιήθηκαν στη συνέχεια για την επικάλυψη των σπόρων με τους διάφορους βιολογικούς παράγοντες που αναφέρθηκαν και προηγουμένως. Προσδιορίστηκαν το ποσοστό και ο αριθμός των σπόρων που βλάστησαν, ώστε να αξιολογηθεί η αποτελεσματικότητα της επικάλυψης. Επιλέχθηκε ο συνδυασμός συγκέντρωσης βιοπολυμερών με τον εκάστοτε βιολογικό παράγοντα, που παρουσίασε τα καλύτερα αποτελέσματα και χρησιμοποιήθηκε ως τελική μέθοδος επικάλυψης. Στη συνέχεια προσδιορίστηκαν η βλαστική ικανότητα των σπόρων και το μήκος των ριζών. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η επικάλυψη με βιοπολυμερή ωφέλησε τη βλαστική ικανότητα των σπόρων. Στη συνέχεια, ακολούθησε η σπορά των επικαλυμμένων σπόρων τομάτας και μελιτζάνας με τη καλύτερη αποτελεσματικότητα έναντι των παθογόνων *Phytophthora nicotianae* και *Verticillium dahliae* στο θερμοκήπιο καθώς και μη επικαλυμμένων σπόρων στους οποίους ο βιολογικός παράγοντας εφαρμόστηκε με τη μέθοδο του ριζοποτίσματος. Μετά τη την τεχνητή μόλυνση, πραγματοποιήθηκε αξιολόγηση σχετικά με την αποτελεσματικότητα των βιολογικών παραγόντων αλλά και σύγκριση μεταξύ των μεθόδων coating και ριζοποτίσματος.

Επίσης, οι μέθοδοι coating και ριζοπότισμα αξιολογήθηκαν ως προς την αποτελεσματικότητά τους και στο παθοσύστημα αγγούρι- *Podospaera xanthii*.

2.2.1. Υλικά και Μέθοδοι

In vivo* βιοδοκιμές στο παθοσύστημα τομάτα – *Phytophthora nicotianae

Σπόροι Τομάτας και Βιολογικοί Παράγοντες

Σε αυτή τη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν σπόροι τομάτας της ποικιλίας "St. Pierre". Οι βιολογικοί παράγοντες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν 2 βακτηριακά στελέχη του γένους *Bacillus* τα οποία είναι φυσικά ενδόφυτα και απομονώθηκαν από το φυτό *Calendula officinalis*, τα "*B. halotolerans* Cal.l.30 και *B. velezensis* Cal.r.29" (Βενιεράκη ΓΠΑ). Πιο συγκεκριμένα, το στέλεχος Cal.l.30 απομονώθηκε από τα φύλλα, ενώ το στέλεχος Cal.r.29 απομονώθηκε από τις ρίζες του φυτού. Επιπλέον χρησιμοποιήθηκαν 2

ζυμομύκητες: τα στελέχη "4.1.15 *Candida oleophila*" και "4.1.14 *Metschnikowia pulcherrima*" (ΜΦΙ), καθώς και το στέλεχος ζυμομύκητα "248" και το στέλεχος "376" του γένους *Kushneria* (ΙΤΕ, Σαρρής).

Παρασκευή Βιολογικών Παραγόντων

Για τα Cal.l.30 και Cal.r.29 , απομονώθηκε μονή αποικία των βακίλλων από τρυβλίο και τοποθετήθηκαν σε McCartney με 5 mL υγρού μέσου lysogeny broth (LB). Ύστερα, επώαστηκαν για 24 ώρες σε ανακινητήρα (160 rpm) στους 26°C. Την επόμενη ημέρα, υλοποιήθηκε εμβολιασμός 500 μl από τα McCartney σε κωνική φιάλη με 50 ml lysogeny broth (LB) και επώαστηκαν για 24 ώρες σε ανακινητήρα (160 rpm) στους 26°C. Τη 3^η ημέρα, πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση (8000 rpm), για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και επαναδιάλυση του ιζήματος σε H₂O προς σχηματισμό υδατικού εναιωρήματος με ένδειξη φωτόμετρου OD₆₀₀ 0,85. Ο προσδιορισμός των βακτηριακών πληθυσμών στις υγρές καλλιέργειες έγινε με μέτρηση της οπτικής πυκνότητας και καταμέτρηση των μονάδων που σχηματίζουν αποικίες (colony forming units – CFU). Τα βακτήρια διατηρήθηκαν σε τρυβλία με στερεό LB (1,4% w/v άγαρ) για περαιτέρω χρήση. Για μακροχρόνια συντήρηση, τα βακτηριακά απομονωμένα στελέχη διατηρήθηκαν ως αποθέματα γλυκερόλης (20% v/v) στους -80°C.

Επικάλυψη Σπόρων Ντομάτας με Βακτηριακά Στελέχη

Οι σπόροι τομάτας επικαλύφθηκαν με τους βιολογικούς παράγοντες ξεχωριστά, υιοθετώντας τη μέθοδο των Chin, et al. χρησιμοποιώντας διάλυμα Arabic gum σε 2 διαφορετικές συγκεντρώσεις (25% και 40%) και καρβοξυμεθυλοκυτταρίνη (CMC) σε 2 διαφορετικές συγκεντρώσεις (0.5% και 2%), ως υλικά επικάλυψης, τα οποία εφαρμόστηκαν συνδυαστικά. Οι σπόροι παρέμειναν στο διάλυμα για 30 λεπτά, μέχρι να στρωθούν στα τρυβλία. Η επικάλυψη χωρίς την παρουσία βιολογικού παράγοντα χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας της διαδικασίας επικάλυψης.

Επίδραση της Επικάλυψης Σπόρων με τους Βιολογικούς Παράγοντες στη Βλάστηση των Σπόρων

Οι επικαλυμμένοι σπόροι, μαζί με τους αντίστοιχους μάρτυρες, τοποθετήθηκαν σε τρυβλία που περιείχαν ως θρεπτικό υπόστρωμα water agar (1% agar). Για κάθε μεταχείριση χρησιμοποιήθηκαν περίπου 8 σπόροι ανά τρυβλίο και 2 επαναλήψεις. Τα τρυβλία διατηρήθηκαν σε επωαστικό θάλαμο στους 22°C, σχετική υγρασία 60%, σε συνθήκες φυσικού φωτός ημέρας. Τα δεδομένα καταγράφηκαν για τον υπολογισμό του ποσοστού και του χρόνου βλάστησης.

In planta βιοδοκιμές στο παθοσύστημα τομάτα – *Phytophthora nicotianae*

Σχεδιασμός πειραμάτων

Το πείραμα πραγματοποιήθηκε σε γυάλινο θερμοκήπιο ελεγχόμενων συνθηκών (μέση ημερήσια θερμοκρασία 22,5°C, ελάχιστο 19 °, μέγιστο 26°C , ημερήσια σχετική υγρασία χώρου 63%, ελάχιστο 45% και μέγιστο 81%, 16 ώρες φως/8 ώρες σκοτάδι).

Προκειμένου να επιλεγούν τα βέλτιστα φυτά για τις πειραματικές δοκιμές, πραγματοποιήθηκε αξιολόγηση έτοιμων ανεπτυγμένων φυταρίων τομάτας (από εξωτερικό Φυτώριο) και φυταρίων που προέκυψαν από σπορά εντός του θερμοκηπίου του ΜΦΙ. Διαπιστώθηκε ότι η βέλτιστη επιλογή ήταν η σπορά να πραγματοποιείται εντός του ΜΦΙ λόγω ελέγχου της ανάπτυξης των φυτών και ελέγχου παρουσίας εχθρών και ασθενειών. Το πειραματικό σχέδιο που ακολουθήθηκε ήταν οι 'Πλήρως Τυχαιοποιημένες Ομάδες'.

Σπορά επικαλυμμένων και μη επικαλυμμένων σπόρων

Σε αυτό το στάδιο της πειραματικής διαδικασίας πραγματοποιήθηκε η σπορά των επικαλυμμένων σπόρων με τους βιολογικούς παράγοντες που, από προηγούμενα πειράματα της δράσης και με βάση το παράρτημα 4.5.2., είχαν παρουσιάσει τη μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα έναντι του ωμούκητα *P. nicotianae*. Ειδικότερα, επιλέχθηκε το ενδοφυτικό βακτηριακό στέλεχος "Cal.I.30", και ένα μείγμα ενδομυκορριζικών μυκήτων και ριζοβακτηρίων, το "Vitacracin". Παράλληλα, σπάρθηκαν μη επικαλυμμένοι σπόροι στους οποίους ο βιολογικός παράγοντας εφαρμόστηκε μέσω ριζοποτίσματος.

Για το "Vitacracin" χρησιμοποιήθηκε η συνιστάμενη δόση 10% w/v. Στο συγκεκριμένο πείραμα, αξιοποιήθηκαν 7 φυτά ανά επέμβαση με 20 ml ριζοποτίσματος στο καθένα και έτσι απαιτήθηκαν 280 ml διαλύματος με 28 gr "Vitacracin" διαλυμένα σε H₂O. Για το Cal.I.30 πραγματοποιήθηκε η διαδικασία που έχει προαναφερθεί προς παρασκευή 20 ml διαλύματος Cal.I.30 για το κάθε φυτό.

Οι συνολικές επεμβάσεις ήταν οι εξής :

Πίνακας 4.8.1 - 2: Επεμβάσεις που πραγματοποιήθηκαν σε σπόρους τομάτας

| Coating | Ριζοπότισμα |
|--|---|
| Controls (0.5% CMC , 25% Arabic Gum, H ₂ O) | Controls (H ₂ O) |
| Cal.I.30 (0.5% CMC , 25% Arabic Gum, Cal.I.30) | Cal.I.30 |
| Vitacracin (0.5% CMC , 25% Arabic Gum, Vitacracin) | Vitacracin |
| <i>Phytophthora nicotianae</i> (controls + P.n.) | <i>Phytophthora nicotianae</i> |
| Cal.I.30 + <i>Phytophthora nicotianae</i> | Cal.I.30 + <i>Phytophthora nicotianae</i> |
| Vitacracin + <i>Phytophthora nicotianae</i> | Vitacracin + <i>Phytophthora nicotianae</i> |



Εικόνα 4.8.1- 10: Ενδεικτική εικόνα των σπορόφυτων τομάτας που αναπτύχθηκαν κατά την πορεία του πειράματος, πριν την μόλυνση με το παθογόνο.

Αντίστοιχο πείραμα προηγήθηκε με τη χρήση όλων των προαναφερόμενων βιολογικών παραγόντων που αξιοποιήθηκαν και στην *in vivo* πειραματική διαδικασία, ωστόσο λόγω της μειωμένης μολυσματικότητας του ωμοκύκτα εξαιτίας των πολλαπλών αναγεννήσεων το πείραμα απορρίφθηκε χωρίς την λήψη αποτελεσμάτων.

Προετοιμασία Μολύσματος

Για την επιτυχή παρασκευή μολύσματος *P. nicotianae* ακολουθήθηκε η μέθοδος baiting με αχλάδι και μολυσμένο χώμα από τον ωμοκύκτα. Συγκεκριμένα, το αχλάδι ήρθε σε επαφή με μίγμα μολυσμένου χώματος και νερού για 7 ημέρες. Όταν τα ζωοσπόρια μόλυναν το αχλάδι, εμφανίσθηκαν υδατώδεις κηλίδες και ακολούθησε απομόνωση σε θρεπτικό υπόστρωμα PARB. Όταν η αποικία αναπτύχθηκε ακολούθησε μεταφορά μυκηλιακών δίσκων σε τρυβλία με θρεπτικό μέσο V8 (ένας δίσκος στο κέντρο κάθε τρυβλίου, 15 τρυβλία). Ύστερα από 7 ημέρες, από τα τρυβλία του πλήρους ανεπτυγμένου ωμοκύκτα πραγματοποιήθηκε μεταφορά σε γυάλινα τρυβλία με προσθήκη V8 Broth και παρέμειναν σε θερμοκρασία δωματίου για 24 ώρες. Την επόμενη ημέρα, απομακρύνθηκε το V8 Broth και προστέθηκε Saline. Ακολούθησαν 4 διαδοχικά ξεπλύματα με Saline και στη συνέχεια τα τρυβλία τοποθετήθηκαν σε επωαστικό θάλαμο με λάμπες ανάπτυξης φυτών στους 25°C για 24 ώρες. Τη τελευταία ημέρα, προστέθηκε παγωμένο αποστειρωμένο και απιονισμένο H₂O για 30 min όπου και μετρήθηκε η συγκέντρωση των ζωοσπορίων (2×10^5). Ο όγκος του μολύσματος για το κάθε φυτό ήταν 10 ml και πραγματοποιήθηκε σε τομάτες 2 εβδομάδων στο στάδιο του δεύτερου πραγματικού φύλλου.

Για τις τεχνητές μολύνσεις ακολουθήθηκε η μέθοδος παρασκευής μολύσματος του EPPO: EPPO Standards, Diagnostic protocols for regulated pests, Appendix

4. Techniques for producing sporangia, © 2004 OEPP/EPPO, Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 34, 155 –157.

In planta* βιοδοκιμές στο παθοσύστημα μελιτζάνα – *Verticillium dahliae

Σπόροι Μελιτζάνας και Βιολογικοί Παράγοντες

Σε αυτή τη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν σπόροι μελιτζάνας της ποικιλίας μελιτζάνας "Σκουτάρι". Οι βιολογικοί παράγοντες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν δύο. Ο πρώτος ήταν το βακτηριακό στέλεχος *B. halotolerans* Cal.I.30 και ο δεύτερος βιολογικός παράγοντας το "Vitacracin". Η διαδικασία παρασκευής διαλυμάτων βιολογικών παραγόντων τόσο για το coating όσο και για το ριζοπότισμα ήταν η ίδια με εκείνη που ακολουθήθηκε στις *in vivo* βιοδοκιμές στο παθοσύστημα τομάτα – *Phytophthora nicotianae*.

Επικάλυψη Σπόρων Μελιτζάνας με Βιολογικούς Παράγοντες

Οι σπόροι μελιτζάνας επικαλύφθηκαν με τους βιολογικούς παράγοντες ξεχωριστά, υιοθετώντας τη μέθοδο των Chin, et al. όπως ακριβώς και στο πείραμα με τη τομάτα και τη *Phytophthora nicotianae*.

Σχεδιασμός πειραμάτων

Ο σχεδιασμός του πειράματος πραγματοποιήθηκε με την ίδια μέθοδο που επιλέχθηκε για το παθοσύστημα τομάτα-*Phytophthora nicotianae*.

Σπορά επικαλυμμένων και μη επικαλυμμένων σπόρων

Σε αυτό το στάδιο της πειραματικής διαδικασίας πραγματοποιήθηκε σπορά των επικαλυμμένων σπόρων με Cal.I.30 και Vitacracin, καθώς και η σπορά μη επικαλυμμένων σπόρων, στους οποίους ο βιολογικός παράγοντας εφαρμόστηκε μέσω ριζοποτίσματος.

Οι συνολικές επεμβάσεις ήταν οι εξής :

Πίνακας 4.8.1 - 3: Επεμβάσεις που πραγματοποιήθηκαν σε σπόρους μελιτζάνας

| Coating | Ριζοπότισμα |
|---|--|
| Controls (0.5% CMC , 25% AG) | Controls (H2O) |
| Cal.I.30 (0.5% CMC , 25% AG, Cal.I.30) | Cal.I.30 |
| Vitacracin (0.5% CMC, 25% AG, Vitacracin) | Vitacracin |
| <i>Verticillium dahliae</i> (controls + V.d.) | <i>Verticillium dahliae</i> |
| Cal.I.30 + <i>Verticillium dahliae</i> | Cal.I.30 + <i>Verticillium dahliae</i> |

Vitacracin + *Verticillium dahliae*

Vitacracin + *Verticillium dahliae*

Προετοιμασία Μολύσματος

Στο πείραμα χρησιμοποιήθηκε στέλεχος του παθογόνου *Verticillium dahliae* από την συλλογή του ΜΦΙ. Το στέλεχος αναπτύχθηκε αρχικά σε τρυβλία με στερεό θρεπτικό υπόστρωμα PDA, τα οποία παρέμειναν στον επωαστικό θάλαμο για 5 ημέρες στους 25°C. Μετά την επώασή τους, πάρθηκαν 4 μυκηλιακοί δίσκοι (διαμέτρου 1,5 cm) από κάθε τρυβλίο, οι οποίοι μεταφέρθηκαν σε 100mL υγρού μέσου SNN και τοποθετήθηκαν σε αναδευτήρα (150 rpm, 25 °C) για 3 ημέρες, ώστε να επιτευχθεί επαρκής παραγωγή σπορίων.

Μετά την επώαση, το περιεχόμενο των κωνικών φιαλών διαχωρίστηκε από το θρεπτικό υπόστρωμα μέσω αποστειρωμένης διήθησης. Το εναιώρημα φυγοκεντρήθηκε (6000 rpm) για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Το ίζημα που προέκυψε αναδιαλύθηκε σε απιονισμένο νερό και η τελική αιώρηση προσαρμόστηκε ώστε να επιτευχθεί συγκέντρωση σπορίων περίπου $8-9 \times 10^6$ σπορίων ανά mL, η οποία χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα.

Όλες οι διαδικασίες πραγματοποιήθηκαν υπό άσηπτες συνθήκες για τη διασφάλιση της καθαρότητας και της επαναληψιμότητας των καλλιεργειών.

Για το ριζοπότισμα, χρησιμοποιήθηκαν 10 mL μολύσματος ανά φυτό, στις κατάλληλες επεμβάσεις.

In planta* βιοδοκιμές στο παθοσύστημα αγγούρι – *Podospahera xanthii

Το πείραμα πραγματοποιήθηκε σε γυάλινο θερμοκήπιο ελεγχόμενων συνθηκών. Οι επεμβάσεις ήταν: **1.** Νερό, **2.** Θρεπτικό υλικό, **3.** Στέλεχος Βακίλου Cal.r.19, **4.** Cal.r.29

Πείραμα στο θερμοκήπιο

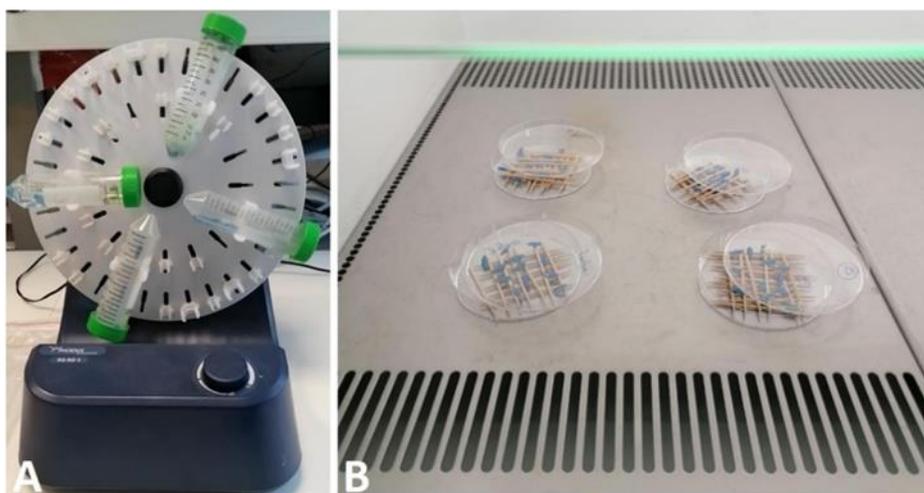
Επίδραση της βιοκάλυψης των σπόρων με βακτηριακά στελέχη του γένους *Bacillus* στην ανάπτυξη φυτών αγγουριάς.

Από κάθε καλλιέργεια των τριών βακτηριών, μεταφέρθηκαν 15 ml της καλλιέργειας σε σωλήνα φυγοκέντρωσης των 50 ml (falcon centrifuge tube). Οι καλλιέργειες φυγοκεντρήθηκαν στις 5.000 στροφές ανά λεπτό για 10 λεπτά. Το υπερκείμενο από κάθε σωλήνα απομακρύνθηκε με χρήση πιπέτας και το ίζημα που περιείχε τα βακτηριακά κύτταρα διαλύθηκε με προσθήκη διαλύματος, ίσης ποσότητας με την καλλιέργεια που φυγοκεντρήθηκε, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (επταένυδρο θειικό μαγνήσιο) συγκέντρωσης 10 mM και 1% CMC (καρβοξυμεθυλοκυτταρίνη). Το θειικό μαγνήσιο χρησιμοποιήθηκε για να αποφευχθεί η πλασμόλυση των κυττάρων λόγω ώσμωσης, ενώ η καρβοξυμεθυλοκυτταρίνη χρησιμοποιήθηκε για να διευκολυνθεί η προσκόλληση των κυττάρων στον σπόρο. Για μάρτυρα στην επένδυση των σπόρων, χρησιμοποιήθηκε διάλυμα $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ και CMC χωρίς βακτηριακά κύτταρα. Σπόροι αγγουριάς

μεταφέρθηκαν στους σωλήνες, οι οποίοι στη συνέχεια έμειναν υπό ανάδευση για 90 λεπτά. Οι σπόροι ύστερα μεταφέρθηκαν σε άδεια τρυβλία στερεωμένοι σε αποστειρωμένες οδοντογλυφίδες και αφέθηκαν για δύο ώρες σε θάλαμο νηματικής ροής για να στεγνώσουν. Η σπορά των επενδυμένων σπόρων έγινε την ίδια μέρα με την σπορά των μη επενδυμένων.

| Κωδικοί BBCH | Στάδιο Ανάπτυξης | Περιγραφή σταδίου |
|--------------------|------------------|---|
| 00, 01, 03, 05, 07 | 0 | Μη διακριτή η ανάπτυξη του φυτού κάτω από την εδαφική επιφάνεια |
| 9 | 1 | Οι κοτυληδόνες διαπερνούν την επιφάνεια του εδάφους |
| 10 | 2 | Πλήρες ξεδίπλωμα των κοτυληδόνων |
| 11 | 3 | Πλήρες ξεδίπλωμα του 1 ^{ου} πραγματικού φύλλου |

Πίνακας 4.8.1- 4 :Στάδια ανάπτυξης των φυτών κατά τις αξιολογήσεις



Εικόνα 4.8.1- 11: (Α) Ανάδευση των σπόρων μέσα στα βακτηριακά εναιωρήματα. (Β) Στέγνωμα των σπόρων εντός του θαλάμου νηματικής ροής.

Η τεχνητή μόλυνση με τον μύκητα έγινε μέσω ψεκάσμου φυλλώματος με αιώρημα του παθογόνου. Για την παρασκευή του αιωρήματος χρησιμοποιήθηκαν φύλλα κολοκυθίου με νέες αποικίες ωιδίου. Δεν χρησιμοποιήθηκαν παλαιωμένα φύλλα με νεκρωμένους ιστούς, καθώς και πολυκαιρισμένες αποικίες του μύκητα ώστε να αποφευχθούν τα μη βιώσιμα κονίδια. Με χρήση νυστεριού αποκόπηκαν τμήματα των επιλεγμένων φύλλων με προσβολή και μεταφέρθηκαν σε 200 ml αποστειρωμένου και απεσταγμένου νερού. Ύστερα από ήπια ανάδευση, το αιώρημα φιλτραρίστηκε μέσα από διπλή αποστειρωμένη γάζα ώστε να απομακρυνθεί ο φυτικός ιστός από τα κονίδια του μύκητα. Η συγκέντρωση των κονιδίων στο αιώρημα προσδιορίστηκε με αιμοκυτταρόμετρο Neubauer. Ακολούθησε αραιώση του αιωρήματος με αποστειρωμένο και απεσταγμένο νερό έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση των κονιδίων στο αιώρημα να είναι ίση με 10^5 κονίδια/ml. Κάθε φυτό ψεκάστηκε με περίπου 2 ml του αιωρήματος με ψεκαστήρα χειρός. Τεχνητή μόλυνση έγινε μόνο στα δύο πρώτα πραγματικά φύλλα. Προκειμένου να διατηρηθεί υψηλή υγρασία στο θερμοκήπιο, έγινε ρίψη νερού στο πάτωμα του

θερμοκηπίου, τόσο τη μέρα της τεχνητής μόλυνσης όσο και τις επόμενες μέρες. Ωστόσο, η υγρασία στο θερμοκήπιο δεν υπερέβη το 60% ενώ συχνά έπεφτε έως και 40%.

| Επεμβάσεις | Βιοκάλυψη | Κωδικοί |
|----------------|-----------|---------|
| Νερό | Ναι | H2O+ |
| | Όχι | H2O- |
| Θρεπτικό υλικό | Ναι | C+ |
| | Όχι | C- |
| Cal.r.19 | Ναι | 19+ |
| | Όχι | 19- |
| Cal.r.29 | Ναι | 29+ |
| | Όχι | 29- |
| Cal.l.30 | Ναι | 30+ |
| | Όχι | 30- |

Πίνακας 4.8.1-5: Οι κωδικοί των επεμβάσεων



Εικόνα 4.8.1-12: Διαβροχή του φύλλου με το αιώρημα κονιδίων

Τα φυτά του πειράματος οργανώθηκαν σε πλήρεις ομάδες σε ελεύθερη διάταξη (Randomized complete block design). Κάθε πάγκος στο γυάλινο θερμοκήπιο αποτελούσε μια ομάδα (block) και οι θέσεις των φυτών στην ομάδα ήταν τυχαίες με βάση την τυχαιοποίηση των κωδικών τους ανά ομάδα (δύο φυτά ανά κωδικό). Η τυχαιοποίηση των θέσεων έγινε καθώς οι συνθήκες όπως η θερμοκρασία και υγρασία μπορεί να διαφέρουν αναλόγως της περιοχής του θερμοκηπίου λόγω διαφορετικών χρόνων σκίασης. Χρησιμοποιήθηκαν τέσσερις πάγκοι του θερμοκηπίου, επομένως τα φυτά χωρίστηκαν σε τέσσερις ομάδες και σε κάθε ομάδα υπήρχαν τέσσερα φυτά ανά επέμβαση και δύο φυτά ανά κωδικό.

Οι αξιολογήσεις της ασθένειας έγιναν βάσει του προτύπου του EPPO (EPPO, 1996). Για κάθε φυτό του πειράματος έγινε καταγραφή του ποσοστού της φυλλικής επιφάνειας που είχε καλυφθεί με τις αποικίες του μύκητα στα τέσσερα πρώτα πραγματικά φύλλα. Η καταγραφή έγινε από το 1^ο έως το 4^ο φύλλο για όλα τα φυτά, καθώς κανένα από τα νεότερα φύλλα δεν εμφάνισε συμπτώματα κατά την διεξαγωγή του πειράματος. Στην εικόνα 2.7 παρουσιάζονται ενδεικτικά φύλλα αγγουριάς με καταγεγραμμένα ποσοστά

μόλυνσης. Οι αξιολογήσεις έγιναν 7, 10 και 13 μέρες μετά την τεχνητή μόλυνση των δύο πραγματικών φύλλων.

| 1 | Φυτό_1 | Φυτό_2 | Φυτό_1 | Φυτό_2 |
|---|--------|--------|--------|--------|
| | I | II | III | IV |
| 1 | H2O- | H2O- | C+ | C+ |
| 2 | 29+ | 29+ | 30+ | 30+ |
| 3 | C- | C- | H2O+ | H2O+ |
| 4 | 29- | 29- | 30- | 30- |
| 5 | 19- | 19- | 19+ | 19+ |

| 2 | Φυτό_3 | Φυτό_4 | Φυτό_3 | Φυτό_4 |
|---|--------|--------|--------|--------|
| | I | II | III | IV |
| 1 | 19+ | 19+ | C+ | C+ |
| 2 | H2O+ | H2O+ | 29- | 29- |
| 3 | H2O- | H2O- | 30- | 30- |
| 4 | 19- | 19- | C- | C- |
| 5 | 29+ | 29+ | 30+ | 30+ |

| 3 | Φυτό_5 | Φυτό_6 | Φυτό_5 | Φυτό_6 |
|---|--------|--------|--------|--------|
| | I | II | III | IV |
| 1 | C+ | C+ | H2O- | H2O- |
| 2 | 19- | 19- | 19+ | 19+ |
| 3 | 29+ | 29+ | C- | C- |
| 4 | 29- | 29- | 30+ | 30+ |
| 5 | H2O+ | H2O+ | 30- | 30- |

| 4 | Φυτό_7 | Φυτό_8 | Φυτό_7 | Φυτό_8 |
|---|--------|--------|--------|--------|
| | I | II | III | IV |
| 1 | 29- | 29- | C- | C- |
| 2 | H2O+ | H2O+ | 30- | 30- |
| 3 | 19+ | 19+ | 30+ | 30+ |
| 4 | C+ | C+ | H2O- | H2O- |
| 5 | 29+ | 29+ | 19- | 19- |

Πίνακας 4.8.1-6: Πειραματικό σχέδιο. Η διάταξη των φυτών ανά ομάδα.

Για τον υπολογισμό της έντασης της ασθένειας χρησιμοποιήθηκε ο τύπος:

$$\text{Ένταση ασθένειας (\%)} = \frac{\sum(n)}{N}$$

όπου n είναι το ποσοστό της προσβεβλημένης φυλλικής επιφάνειας σε κάθε φύλλο και N είναι το πλήθος των προσβεβλημένων φύλλων.

Για τον υπολογισμό του εμβαδού κάτω από την καμπύλη εξέλιξης της ασθένειας (AUDPC) χρησιμοποιήθηκε ο τύπος:

$$AUDPC (\% - \text{ημέρες}) = \sum_{i=1}^{n-1} \frac{Y_i + Y_{i+1}}{2} (T_{i+1} - T_i)$$

όπου Y_i είναι η ένταση της ασθένειας στην $i^{\text{η}}$ παρατήρηση, T είναι οι ημέρες που έχουν περάσει από την τεχνητή μόλυνση στην $i^{\text{η}}$ παρατήρηση και n είναι ο συνολικός αριθμός των παρατηρήσεων. Η πρώτη παρατήρηση ($i = 1$), θεωρείτε ότι έγινε την μέρα της τεχνητής μόλυνσης, όπου η ένταση της ασθένειας ήταν ίση με 0.

Για τον υπολογισμό της αποτελεσματικότητας (Overall efficacy) των επεμβάσεων χρησιμοποιήθηκε ο τύπος:

$$\text{Αποτελεσματικότητα}_{\text{επέμβαση}} (\%) = \frac{AUDPC_{\text{μάρτυρα}} - AUDPC_{\text{επέμβαση}}}{AUDPC_{\text{μάρτυρα}}} 100\%$$

Ως μάρτυρας ορίστηκε η επέμβαση του νερού.

Για την μετατροπή του μοντέλου εξέλιξης της ασθένειας σε γραμμικό, έγινε μετατροπή της έντασης της ασθένειας (Y) για κάθε χρονική περίοδο στον φυσικό λογάριθμο του $1/(1-Y)$. Ύστερα οι τροποποιημένες τιμές εκφράστηκαν ως συνάρτηση του χρόνου.

Η αξιολόγηση της ανάπτυξης των φυτών έγινε κατά τις δύο πρώτες εβδομάδες από την σπορά τους. Ο πρώτος ψεκασμός φυλλώματος με τις επεμβάσεις έγινε σε φυτά 14 ημερών, στα οποία είχε σχηματισθεί το πρώτο πραγματικό φύλλο. Οι επόμενοι ψεκασμοί ακολούθησαν σε εβδομαδιαία βάση ενώ η τεχνητή μόλυνση με τον μύκητα έγινε μία μέρα μετά τον δεύτερο ψεκασμό. Η πρώτη αξιολόγηση της ασθένειας έγινε 7 μέρες μετά την τεχνητή μόλυνση και οι επόμενες ακολούθησαν ανά διαστήματα τριών ημερών. Συνολικά έγιναν τρεις ψεκασμοί με τις επεμβάσεις και τρεις αξιολογήσεις της ασθένειας.

2.2.2. Αποτελέσματα και Συζήτηση

In vivo βιοδοκιμές στο παθοσύστημα τομάτα – *Phytophthora nicotianae*

Αρχικά, μελετήθηκε η επίδραση των διαφορετικών συγκεντρώσεων των βιοπολυμερών καρβοξυμεθυλοκυτταρίνη (CMC) και αραβικό κόμμι (Arabic gum) ως υλικών επικάλυψης των σπόρων και καταγράφηκε το ποσοστό βλαστικότητας για κάθε συνδυαστική μεταχείριση. Όπως προκύπτει από τον παρακάτω πίνακα, είναι εμφανές ότι η παρουσία των βιοπολυμερών βελτίωσε την βλαστικότητα των σπόρων σε σύγκριση με τους μη επικαλυμμένους σπόρους (μάρτυρες).

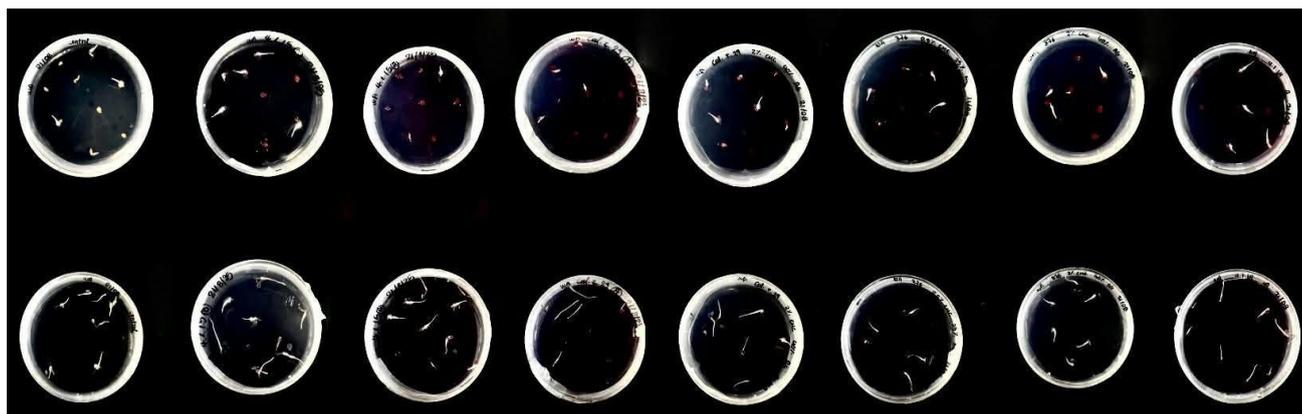
Πίνακας 4.8.1 -7: Ποσοστό βλαστικότητας σπόρων τομάτας σε διάφορες συγκεντρώσεις σκευάσματος επικάλυψης

| Ποσοστό βλαστικότητας (%) | | | |
|-----------------------------|----------|----------|----------|
| Μεταχείριση | 3 ημερών | 4 ημερών | 6 ημερών |
| controls | 40.3 | 74.1 | 89.7 |
| 0.5% CMC, 25% AG | 53.55 | 70.2 | 92.85 |
| 0.5% CMC, 40% AG | 36.9 | 84.5 | 100 |
| 2% CMC, 25% AG | 45.55 | 86.6 | 100 |
| 2% CMC, 40% AG | 18.75 | 65.3 | 100 |

Σε δεύτερη φάση επιλέχθηκαν ορισμένες συγκεντρώσεις βιοπολυμερών και συνδυάστηκαν με τους βιολογικούς παράγοντες που αναφέρθηκαν παραπάνω. Από τον πίνακα φαίνεται ότι επιλέχθηκε ο συνδυασμός που εμφάνισε το μεγαλύτερο ποσοστό βλαστικότητας για κάθε βιολογικό παράγοντα. Στις περισσότερες περιπτώσεις, η μεταχείριση που εμφάνισε το μεγαλύτερο ποσοστό βλαστικότητας αντιστοιχούσε και στη μεταχείριση όπου οι σπόροι είχαν το μεγαλύτερο μήκος ριζών. Εξαιρέση αποτέλεσε ο παράγοντας Cal.I.30. Παρότι ο συνδυασμός **2% CMC + 40% AG + Cal.I.30** εμφάνισε υψηλότερο ποσοστό βλαστικότητας, τελικά επιλέχθηκε ο συνδυασμός **0.5% CMC + 25% AG + Cal.I.30**, καθώς παρήγαγε σπόρους με σημαντικά μεγαλύτερο μήκος ρίζας και εμφάνισε ταχύτερη βλάστηση.

Πίνακας 4.8.1 -8: Βλαστικότητα (%) σπόρων τομάτας που επενδύθηκαν με επιλεγμένους μικροοργανισμούς και διαφορετικά σκευάσματα επικάλυψης *in vitro*.

| Ποσοστό βλαστικότητας (%) | | | | |
|-----------------------------|----------|----------|----------|-----------|
| | 4 ημέρες | 5 ημέρες | 7 ημέρες | 12 ημέρες |
| <i>Μάρτυρας</i> | 58.34 | 63.89 | 87.5 | 93.75 |
| 0.5% CMC, 25% AG + 4.1.15 | 25 | 50 | 93.75 | 100 |
| 2% CMC, 40% AG + 4.1.15 | 43.75 | 56.25 | 81.25 | 93.75 |
| | | | | |
| 0.5% CMC, 25% AG + 4.1.14 | 74.1 | 81.25 | 93.75 | 93.75 |
| 2% CMC, 40% AG + 4.1.14 | 25 | 25 | 50 | 75 |
| | | | | |
| 0.5% CMC, 25% AG + Cal.r.29 | 31.25 | 43.75 | 62.5 | 81.25 |
| 2% CMC, 40% AG + Cal.r.29 | 62.5 | 81.25 | 87.5 | 93.75 |
| | | | | |
| 0.5% CMC, 25% AG + 376 | 50 | 78.57 | 87.5 | 87.5 |
| 2% CMC, 40% AG + 376 | 66.07 | 80.36 | 93.75 | 93.75 |
| | | | | |
| 0.5% CMC, 25% AG + 248 | 50 | 68.75 | 87.5 | 87.5 |
| 2% CMC, 40% AG + 248 | 37.5 | 62.5 | 93.75 | 93.75 |
| | | | | |
| 0.5% CMC, 25% AG + Cal.l.30 | 67.86 | 74.11 | 74.1 | 87.5 |
| 2% CMC, 40% AG + Cal.l.30 | 18.75 | 50 | 93.75 | 93.75 |



Εικόνα 4.8.1-13: Ενδεικτική εικόνα σπορόφυτων τομάτας *in vitro* επικαλυμμένα και μη με διάφορες συγκεντρώσεις σκευασμάτων επικάλυψης, 7 μέρες μετά τη μεταφορά τους στο τρυβλίο.

In planta* βιοδοκιμές στο παθοσύστημα τομάτα – *Phytophthora nicotianae

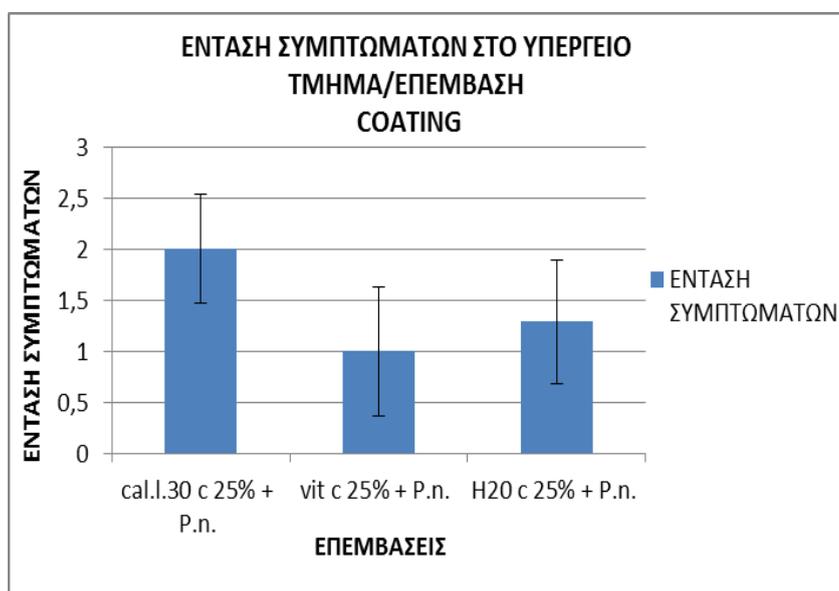
Για την αξιολόγηση των βιολογικών παραγόντων με το σύστημα επικάλυψης *in planta*, χρησιμοποιήθηκαν βιολογικοί παράγοντες που παρουσίασαν σημαντικά αποτελέσματα σε άλλα πακέτα εργασίας (ΠΕ. 4.5.2). Οι παράγοντες που επιλέχτηκαν ήταν το στέλεχος *Bacillus* Cal.l.30 και η κοινοπραξία μικροβιακών παραγόντων με το εμπορικό όνομα Vitacracin. Μία εβδομάδα μετά τη μόλυνση των νεαρών φυταρίων τομάτας με *Phytophthora nicotianae* παρατηρήθηκαν συμπτώματα της ασθένειας τόσο στο

υπέργειο όσο και στο υπόγειο τμήμα του φυτού.

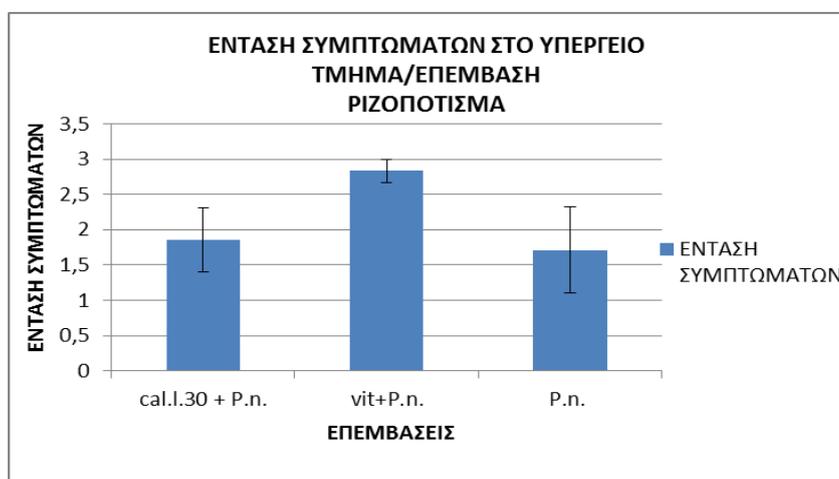
Ειδικότερα, η αξιολόγηση της έντασης της ασθένειας στο υπέργειο τμήμα του φυτού έγινε με βάση την εξής κλίμακα :

- 0= υγιές φυτό
- 1=χλώρωση στα φύλλα του φυτού
- 2=πλάγιασμα βλαστού
- 3=στένωση λαιμού
- 4=θάνατος ,

και τα αποτελέσματα απεικονίζονται στα γραφήματα κάτωθι Γραφήματα.



Γράφημα 4.8.1 - 14: Ένταση των συμπτωμάτων (με χρήση κλίμακας 0-4) στο υπέργειο τμήμα των φυτών σε πείραμα με επικαλυμμένους σπόρους με το Βάκιλλο Cal.l.30 και το βιολογικό σκεύασμα Vitacracin.



Γράφημα 4.8.1 - 15: Ένταση των συμπτωμάτων (με χρήση κλίμακας 0-4) στο υπέργειο τμήμα των φυτών σε πείραμα με το Βάκιλλο Cal.l.30 και το βιολογικό σκεύασμα Vitacracin, στο οποίο οι επεμβάσεις

πραγματοποιήθηκαν με ριζοπότισμα.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι, η επέμβαση που απέτρεψε με μεγαλύτερη επιτυχία την εκδήλωση συμπτωμάτων και κατ' επέκταση της ασθένειας στο υπέργειο τμήμα του φυτού μετά τη μόλυνση με *Phytophthora nicotianae* είναι η επικάλυψη των σπόρων με Vitacracin (0.5% CMC , 25% AG , Vitacracin) . Αντίθετα , η λιγότερο αποτελεσματική επέμβαση αποδείχθηκε η εφαρμογή Vitacracin με τη μέθοδο του ριζοποτίσματος.

Τα συμπεράσματα αυτά φαίνονται και στην **Εικόνα 4.8.1-14**, στην οποία απεικονίζεται ξεκάθαρα η διαφορά στην ανάπτυξη των φυτού και στην ικανότητα των βλαστών να τους παρέχουν στήριξη :

Vit ριζοπότισμα



Vit επικάλυψη σπόρου



Εικόνα 4.8.1-14: Ενδεικτικές εικόνες φυτών τομάτας όπου εφαρμόστηκε το εμπορικό σκεύασμα Vitacracin (Vit) με ριζοπότισμα ή με επικάλυψη του σπόρου.

Αντίστοιχα, αξιολόγηση της ασθένειας πραγματοποιήθηκε και στο υπόγειο-ριζικό τμήμα του φυτού. Η κλίμακα στην οποία βασίστηκε η αξιολόγηση της έντασης των συμπτωμάτων στη ρίζα είναι η εξής :

0=υγιές φυτό

0.5=νέκρωση που περιορίζεται στα άκρα των ριζών

1=νέκρωση στο κάτω μισό των πρωτογενων ριζών

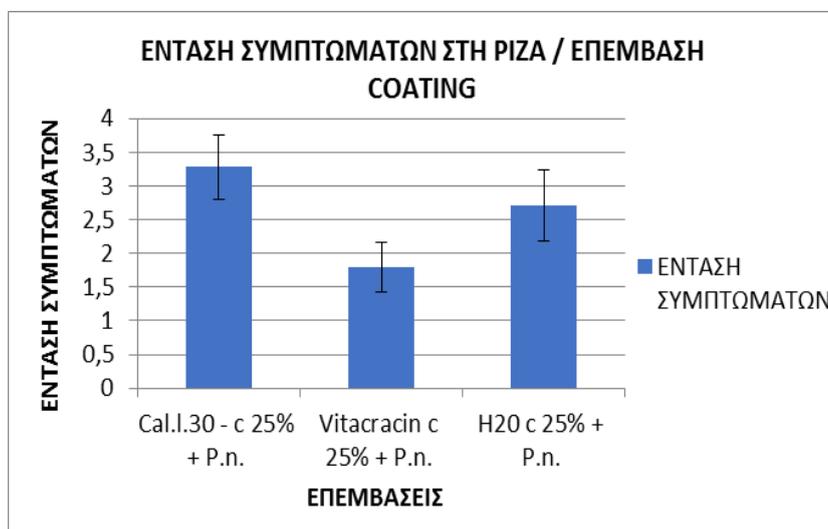
2=νέκρωση σε όλες τις πρωτογενείς ρίζες

3=νέκρωση που φτάνει στην κορυφή και στις πλευρικές ρίζες

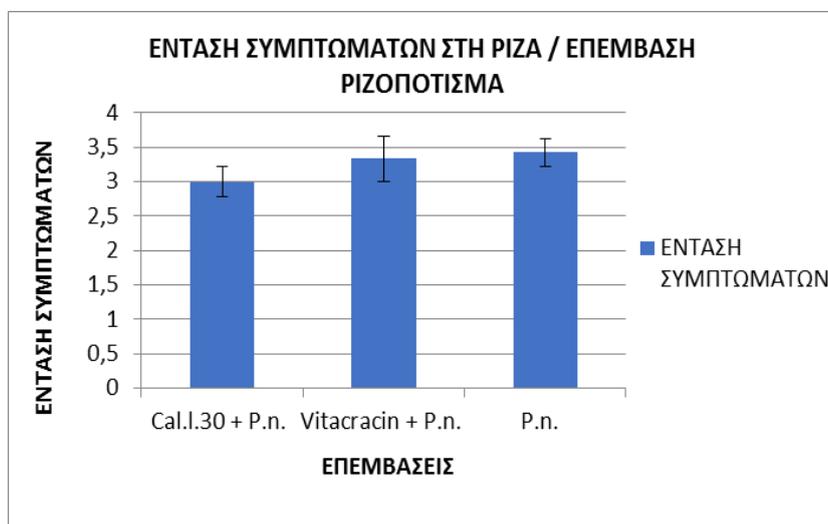
4=σάπιο υποκοτύλιο

5=όλο το φυτό νεκρό

Τα αποτελέσματα απεικονίζονται στα Γραφήματα που ακολουθούν:



Γράφημα 4.8.1 - 16: Ένταση των συμπτωμάτων (με χρήση κλίμακας 0-4) στο υπόγειο τμήμα των φυτών (ρίζα) σε πείραμα με επικαλυμμένους σπόρους με το Βάκιλλο Cal.I.30 και το βιολογικό σκεύασμα Vitacracin.



Γράφημα 4.8.1 - 17: Ένταση των συμπτωμάτων (με χρήση κλίμακας 0-4) στο υπόγειο τμήμα των φυτών (ρίζα) σε πείραμα με το Βάκιλλο Cal.I.30 και το βιολογικό σκεύασμα Vitacracin, στο οποίο οι επεμβάσεις πραγματοποιήθηκαν με ριζοπότισμα.

Συμπερασματικά, η επέμβαση που απέτρεψε με μεγαλύτερη επιτυχία την εκδήλωση της ασθένειας στο υπόγειο - ριζικό τμήμα του φυτού μετά τη μόλυνση με *Phytophthora nicotianae* είναι η επικάλυψη των σπόρων με Vitacracin (0.5% CMC, 25% AG, Vitacracin). Αντιθέτως, η λιγότερο αποτελεσματική επέμβαση ήταν η εφαρμογή Vitacracin με τη μέθοδο του ριζοποτίσματος.

Τα παραπάνω απεικονίζονται και στις φωτογραφίες όπου είναι εμφανής η διαφορά στην

έκταση των ριζών και στην ικανότητα του φυτού να παράγει πλάγιες ρίζες:

Επικάλυψη σπόρων με Vitacracin – coating



Εφαρμογή Vitacracin μέσω ριζοποτίσματος



Εικόνα 4.8.1-15: Ενδεικτικές εικόνες φυτών τομάτας 25 ημερών στις οποίες πραγματοποιήθηκε επικάλυψη του σπόρου με Vitacracin (πάνω) ή ριζοπότισμα με το σκεύασμα κατά τη σπορά (κάτω).

In planta* βιοδοκιμές στο παθοσύστημα μελιτζάνα – *Verticillium dahliae

Για την αξιολόγηση των βιολογικών παραγόντων με το σύστημα επικάλυψης *in planta*, χρησιμοποιήθηκαν βιολογικοί παράγοντες που παρουσίασαν σημαντικά αποτελέσματα σε άλλα πακέτα εργασίας (ΠΕ. 4.5.2). Οι παράγοντες που επιλέχτηκαν ήταν το στέλεχος *Bacillus Cal.l.30* και η κοινοπραξία μικροβιακών παραγόντων με το εμπορικό όνομα Vitacracin.

Τη χρονική στιγμή συγγραφής του συγκεκριμένου παραδοτέου το πείραμα βρίσκεται σε εξέλιξη, μιας και η μόλυνση με το παθογόνο δεν έχει δείξει ακόμα συμπτώματα στα φυτά παρόλο έχουν περάσει 4 εβδομάδες από την εφαρμογή του. Παρόλα αυτά, σημαντική είναι η φαινοτυπική αξιολόγηση των φυτών μεταξύ αυτών που πραγματοποιήθηκε επικάλυψη σπόρου και αυτών που η εφαρμογή των παραγόντων πραγματοποιήθηκε με ριζοπότισμα όπως παρουσιάζεται στην παρακάτω **Εικόνα 4.8.1-16**.

H₂O

coating

Vitacracin+coating

Cal.I.30 + coating



H₂O

Vitacracin

Cal.I.30

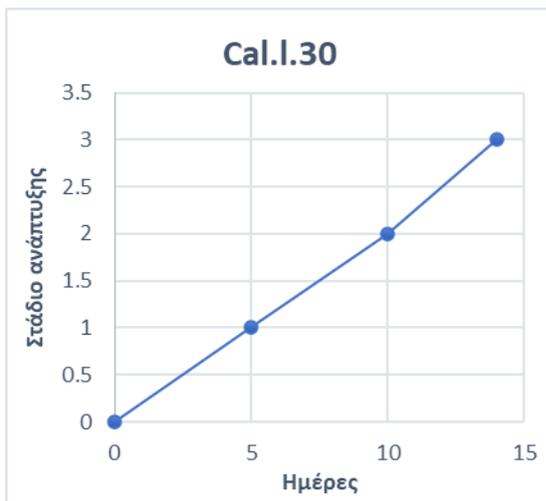
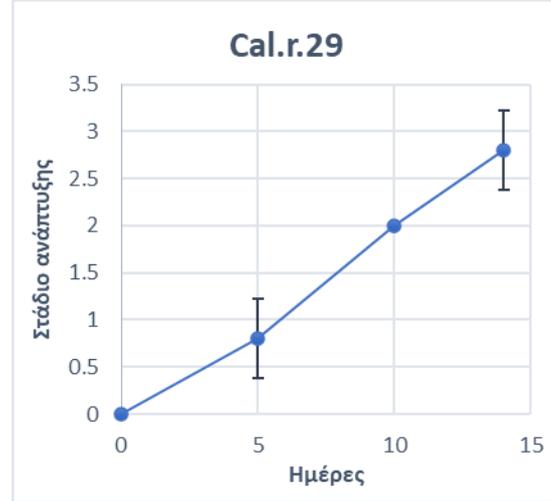
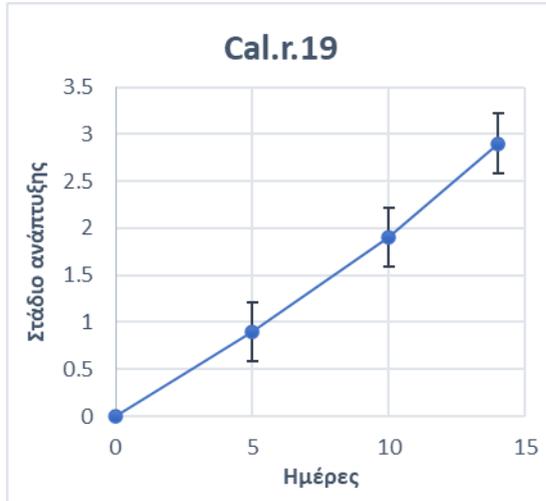
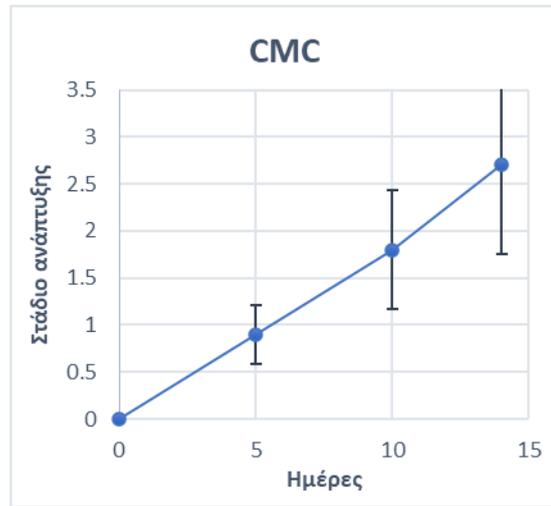
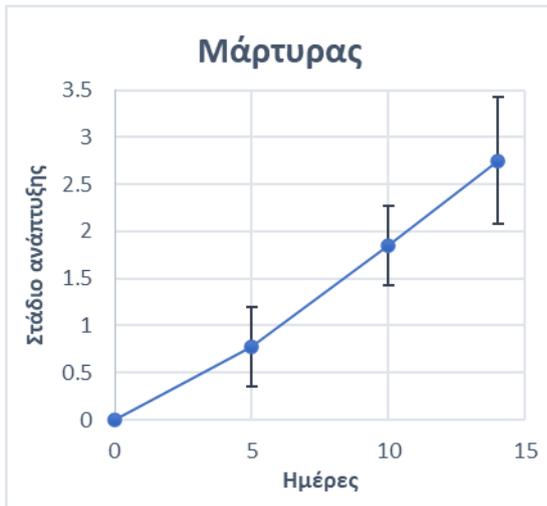


Εικόνα 4.8.1-16: Ενδεικτικές φωτογραφίες φυτών μελιτζάνας στις οποίες πραγματοποιήθηκε επικάλυψη σπόρου (coating, πάνω) ή ριζοπότισμα (κάτω) κατά τη σπορά με το στέλεχος *Bacillus Cal.I.30* ή το εμπορικό σκεύασμα Vitacracin.

Η φαινοτυπική παρατήρηση των φυτών δείχνει ότι η επικάλυψη του σπόρου με τους βιολογικούς παράγοντες δεν επηρεάζει φυσιολογικά την ανάπτυξη των φυτών. Εντούτοις, και οι δύο εφαρμογές φαίνεται να επηρεάζουν θετικά την ανάπτυξη των φυτών σε σχέση με το μάρτυρα (H₂O) είτε πραγματοποιήθηκε επικάλυψη του σπόρου είτε ριζοπότισμα.

Ιn vivo βιοδοκιμές στο παθοσύστημα αγγούρι – *Rodospahera xanthii*

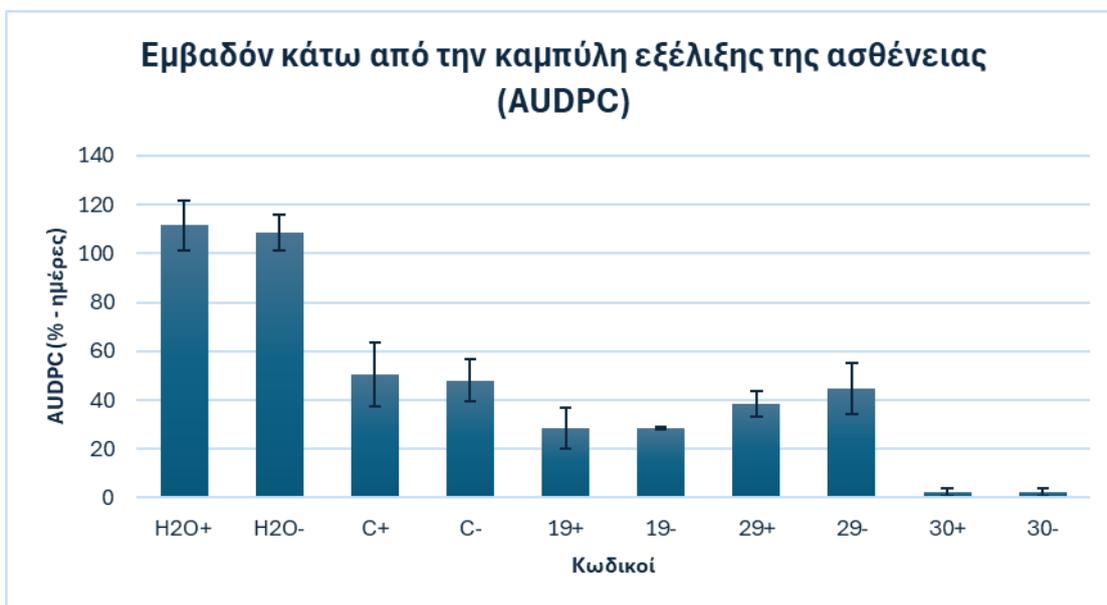
Τα αποτελέσματα της καταγραφής των σταδίων ανάπτυξης των φυτών 5, 10 και 14 ημέρες μετά τη σπορά παρουσιάζονται στο παρακάτω **Γράφημα 4.8.1.-18.**



Γράφημα 4.8.1- 18: Στάδια ανάπτυξης φυτών αγγουριάς σε περίοδο 15 ημερών μετά τη φύτευση

Όπως φαίνεται στο **Γράφημα 4.8.1.-18**, δεν παρατηρούμε σημαντικές διαφορές μεταξύ των φυτών που έχουν υποστεί βιοκάλυψη με τους βιολογικούς παράγοντες (Cal.r.19, Cal.r.29, Cal.l.30) και τα φυτά που δεν υπέστη βιοκάλυψη (Μάρτυρας). Δεν βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των φυτών σε καμία από τις τρεις χρονικές στιγμές, σε επίπεδο σημαντικότητας $p < 0,05$. Παρόλα αυτά, τα φυτά τα οποία είχαν δεχτεί βιοκάλυψη με το στέλεχος Cal.l.30 εμφάνισαν μηδενική απόκλιση στο στάδιο της ανάπτυξης τους και στις τρεις χρονικές στιγμές που έγινε η καταγραφή.

Στο θερμοκηπιακό πείραμα, έγινε αξιολόγηση της προσβολής από τον παθογόνο μύκητα στα φυτά αγγουριάς και της ικανότητας των βακτηριακών στελεχών να αντιμετωπίσουν την ασθένεια, μέσω της βιοκάλυψης του σπόρου και των ψεκασμών φυλλώματος. Οι ψεκασμοί έγιναν σε εβδομαδιαία βάση και ξεκίνησαν μία εβδομάδα πριν την τεχνητή μόλυνση με το παθογόνο. Στο γράφημα που ακολουθεί, απεικονίζεται το εμβαδόν κάτω από την καμπύλη εξέλιξης της ασθένειας για κάθε κωδικό κατά μέσο όρο.



Γράφημα 4.8.1-19: Εμβαδόν κάτω από την καμπύλη εξέλιξης της ασθένειας σε φυτά αγγουριού όπου εφαρμόστηκε βιοκάλυψη (+ δείγματα) ή όχι (- δείγματα) με βακτηριακά αιωρήματα στελεχών του γένους *Bacillus* και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε μόλυνση με αιώρημα κονιδίων του μύκητα *Podosphaera xanthii*.

Για να εκτιμηθεί κατά πόσο ο παράγοντας της βιοκάλυψης είχε επίδραση στην αντιμετώπιση του ωιδίου, πέρα των ψεκασμών φυλλώματος, έγινε two-way ANOVA των AUDPC ανά κωδικό και ανά block, με προκαθορισμένους παράγοντες την επέμβαση και

το εάν είχε προηγηθεί βιοκάλυψη του σπόρου. Από τον στατιστικό έλεγχο, ο παράγοντας της βιοκάλυψης κρίθηκε ως μη στατιστικά σημαντικός με $p = 0,920$.

2.3. ΣΥΝΟΨΗ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα μελέτη αξιολογήθηκε η επίδραση της επικάλυψης σπόρων τομάτας και μελιτζάνας με βιολογικούς παράγοντες, σε συνδυασμό με βιοπολυμερή (Αραβικό κόμμα και καρβοξυμεθυλοκυτταρίνη), στην ένταση των συμπτωμάτων που προκαλεί το παθογόνο *Phytophthora nicotianae* και το *Verticillium dahlia*, αντίστοιχα.

Οι πειραματικές διαδικασίες περιλάμβαναν δύο βήματα: αρχικά την αξιολόγηση της επίδρασης των βιοπολυμερών στην βλαστικότητα των σπόρων, και στη συνέχεια τη μελέτη της ανάπτυξης και έντασης των συμπτωμάτων στα φυτά μετά την μόλυνση με το παθογόνο. Αρχικά η εφαρμογή των βιοπολυμερών (Αραβικό κόμμα και καρβοξυμεθυλοκυτταρίνη) στους σπόρους τομάτας και μελιτζάνας είχε θετική επίδραση στην βλαστικότητα. Οι παρατηρούμενες βελτιώσεις στην βλαστικότητα των σπόρων είναι σύμφωνες με τη βιβλιογραφία, η οποία υποδεικνύει ότι τα βιοπολυμερή που χρησιμοποιήθηκαν είναι πλούσια σε θρεπτικά συστατικά (πολυσακχαρίτες) και μπορούν να βελτιώσουν τη διαδικασία βλάστησης. Επιπλέον, η χρήση αυτών ενδέχεται να συμβάλλει στην επιβίωση των βιολογικών παραγόντων κατά τη φάση βλάστησης και να προάγει τη φυτική ανάπτυξη.

Στο επόμενο στάδιο του πειράματος, μελετήθηκε η επίδραση των βιολογικών παραγόντων και της μεθόδου εφαρμογής τους (με επικάλυψη σπόρων και ριζοπότισμα) στην ανάπτυξη της ασθένειας που προκαλούν τα παθογόνα *Phytophthora nicotianae* και το *Verticillium dahliae*. Τα αποτελέσματα δείχνουν διαφοροποιήσεις στην ένταση των συμπτωμάτων της ασθένειας μεταξύ των επεμβάσεων, υποδηλώνοντας ότι τόσο οι βιολογικοί παράγοντες όσο και το υλικό επικάλυψης, μπορεί να επηρεάζουν τη δυναμική της αλληλεπίδρασης φυτού-παθογόνου. Μεταξύ των επεμβάσεων που πραγματοποιήθηκαν, τα καλύτερα αποτελέσματα ως προς τον περιορισμό εκδήλωσης συμπτωμάτων στο υπέργειο τμήμα αλλά και στο υπόγειο μέρος των φυτών μετά την μόλυνση με το παθογόνο ωομύκητα *Phytophthora nicotianae* στη τομάτα, τα έδωσε η επέμβαση επικάλυψης σπόρων με Vitacracin (0.5% CMC , 25% AG , Vitacracin). Αντίθετα , η εφαρμογή του Vitacracin μέσω ριζοποτίσματος παρουσίασε χαμηλότερη αποτελεσματικότητα και στα δύο τμήματα, υποδεικνύοντας ότι η εφαρμογή με την επικάλυψη σπόρων ενισχύει τη δράση των υπό δοκιμή βιολογικών παραγόντων.

Τέλος, η μέθοδος βιοκάλυψης αξιολογήθηκε ενάντια στην ανάπτυξη της ασθένειας που προκαλεί ο βιοτροφικός μύκητας *Podosphaera xanthii* στο αγγούρι. Αξιολογήθηκαν τρία στελέχη του γένους *Bacillus*, Cal.l.30, Cal.r.29 και Cal.r.19. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι δεν υπήρχε διαφοροποίηση στην προστασία των φυτών ενάντια στο παθογόνο με και χωρίς βιοκάλυψη του σπόρου, υποδεικνύοντας ότι η βιοκάλυψη δεν προσφέρει επιπρόσθετη προστασία στα φυτά.

Συνολικά, τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης υποδεικνύουν ότι η επικάλυψη σπόρων με κατάλληλους συνδυασμούς βιοπολυμερών και βιολογικών παραγόντων αποτελεί μια υποσχόμενη και στοχευμένη προσέγγιση για τη βελτίωση της ανάπτυξης των φυτών και τον περιορισμό της έντασης της σήψης λαιμού και ριζών που προκαλείται από τον ωομύκητα *Phytophthora nicotianae*. Η μέθοδος της επικάλυψης σπόρων επιτρέπει την ακριβή εφαρμογή των βιοπολυμερών και βιολογικών παραγόντων σε σκευασμα, στο αρχικό στάδιο ανάπτυξης του φυτού, μειώνοντας την ανάγκη επαναλαμβανόμενων εφαρμογών και την κατανάλωση πόρων. Υπό αυτό το πρίσμα, η

τεχνική αυτή ευθυγραμμίζεται με τις αρχές της βιώσιμης φυτοπροστασίας, συμβάλλοντας στη μείωση του περιβαλλοντικού αποτυπώματος και στην ανάπτυξη πιο «πράσινων» γεωργικών πρακτικών.

2.4. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ

Βιβλιογραφικές Αναφορές

- Chin, J.M.; Lim, Y.Y.; Ting, A.S.Y. Biopolymers for biopriming of Brassica rapa seeds: A study on coating efficacy, bioagent viability and seed germination. J. Saudi Soc. Agric. Sci. 2021, 20, 198–207.
- Wang, Y.; Li, S.; Wang, Y.; Yao, Z.; Yu, Z.; Zhang, W.; Yang, J. Seed Coatings as Biofilm Micro-Habitats: Principles, Applications, and Sustainability Impacts. Agronomy 2025, 15, 2854.
- Talha Javed, Irfan Afzal, Rubab Shabbir, Kamran Ikram, Muhammad Saqlain Zaheer, Muhammad Faheem, Hafiz Haider Ali, Javaid Iqbal. Seed coating technology: An innovative and sustainable approach for improving seed quality and crop performance. Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences, Volume 21, Issue 8, 2022, Pages 536-545.