ΕΛΛΗΝΙΚΟ ΜΕΣΟΓΕΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

«ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΑΠΟΜΟΝΩΜΕΝΩΝ ΑΠΟ ΑΛΟΦΥΤΑ ΕΝΑΝΤΙ ΣΗΜΑΝΤΙΚΩΝ ΦΥΤΟΠΑΘΟΓΟΝΩΝ ΤΩΝ ΚΗΠΕΥΤΙΚΩΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ»

ΣΤΕΦΑΝΟΣ ΣΟΥΛΤΑΤΟΣ

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών

"Εφαρμοσμένη Επιστήμη και Τεχνολογία στη Γεωπονία"

ΜΑΙΟΣ, 2024

Τα αποτελέσματα της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής προέκυψαν στα πλαίσια του ερευνητικού προγράμματος «Βιώσιμες λύσεις για την Βιολογική Αντιμετώπιση Επιβλαβών Μικροοργανισμών και την Επαγωγή της Αντοχής των Καλλιεργειών στην Αλατότητα» και ακρωνύμιο «BIOCONTROL» (Κωδικός έργου Τ2ΕΔΚ-01859, Κωδικός Πράξης/MIS 5073622. Το Έργο υλοποιήθηκε στο πλαίσιο της Ενιαίας Δράσης Κρατικών Ενισχύσεων Έρευνας, Τεχνολογικής Ανάπτυξης & Καινοτομίας «ΕΡΕΥΝΩ – ΔΗΜΙΟΥΡΓΩ – ΚΑΙΝΟΤΟΜΩ» του Ε.Π. «Ανταγωνιστικότητα, Επιχειρηματικότητα και Καινοτομία» (ΕΠΑνΕΚ) 2014-2020 και συγχρηματοδοτείται από το Ευρωπαϊκό Ταμείο Περιφερειακής Ανάπτυξης (ΕΤΠΑ).>

ΜΕΛΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ

1. ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ: ΜΑΡΚΑΚΗΣ ΕΜΜΑΝΟΥΗΛ
ΙΔΙΟΤΗΤΑ: ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ
ΙΔΡΥΜΑ/ΦΟΡΕΑΣ: ΕΛΛΗΝΙΚΟ ΜΕΣΟΓΕΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

2. ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ: ΓΚΟΥΜΑΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ
ΙΔΙΟΤΗΤΑ: ΟΜΟΤΙΜΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ
ΙΔΡΥΜΑ/ΦΟΡΕΑΣ: ΕΛΛΗΝΙΚΟ ΜΕΣΟΓΕΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

3. ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ: ΤΡΑΝΤΑΣ ΕΜΜΑΝΟΥΗΛ
ΙΔΙΟΤΗΤΑ: ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ
ΙΔΡΥΜΑ/ΦΟΡΕΑΣ: ΕΛΛΗΝΙΚΟ ΜΕΣΟΓΕΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

ΤΟ ΕΡΓΟ ΑΥΤΟ ΥΛΟΠΟΙΗΘΗΚΕ ΣΤΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΥΚΗΤΟΛΟΓΙΑΣ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΑΜΠΕΛΟΥ, ΛΑΧΑΝΟΚΟΜΙΑΣ, ΑΝΘΟΚΟΜΙΑΣ ΚΑΙ ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΣΙΑΣ, ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΕΛΙΑΣ, ΥΠΟΤΡΟΠΙΚΩΝ ΦΥΤΩΝ ΚΑΙ ΑΜΠΕΛΟΥ, ΕΛΛΗΝΙΚΟΣ ΓΕΩΡΓΙΚΟΣ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΣ «ΔΗΜΗΤΡΑ»

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή είναι αφιερωμένη στον αγαπημένο μου καθηγητή Δρα Εμμανουήλ Μαρκάκη και στον συνεργάτη μου Νικόλαο Κρασαγάκη

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα Μεταπτυχιακή Διατριβή ξεκίνησε και ολοκληρώθηκε στο εργαστήριο μυκητολογίας του τμήματος Αμπέλου, Λαχανοκομίας, Ανθοκομίας και Φυτοπροστασίας του Ινστιτούτου Ελιάς, Υποτροπικών φυτών και Αμπέλου, Ελληνικός Γεωργικός Οργανισμός «ΔΗΜΗΤΡΑ» με την επιστημονική υποστήριξη του Δρα Εμμανουήλ Α. Μαρκάκη, Κύριου Ερευνητή του Ελληνικού Γεωργικού Οργανισμού «ΔΗΜΗΤΡΑ» (πλέον Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα Γεωπονιας, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Ελληνικό Μεσογειακό Πανεπιστήμιο). Αυτή τη στιγμή που το έργο έχει ολοκληρωθεί, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Αναπλ. Καθηγητή Εμμανουήλ Μαρκάκη για την ευκαιρία που μου έδωσε να εργαστώ στο εργαστήριό του και να αποκτήσω γνώσεις πάνω σε θέματα Φυτοπαθολογίας. Επιπλέον, η καθοδήγηση και η εμπιστοσύνη που μου επέδειξε κατά τη διάρκεια αυτής της εμπειρίας αποτέλεσαν κρίσιμους παράγοντες για την επιτυχή ολοκλήρωση της μελέτης μου.

Επιπρόσθετα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον αναπληρωτή Καθηγητή Παναγιώτη Σαρρή για τη διάθεση των βακτηριακών στελεχών που αξιολογήθηκαν στα πλαίσια της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Ομότιμο Καθηγητή κ. Δημήτριο Γκούμα και τον Επίκουρο Καθηγητή Εμμανουήλ Τραντά για την ανάγνωση, τις επισημάνσεις και τη βαθμολόγηση της διατριβής μου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ ..... **V**

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ..... **VI**

ΛΙΣΤΑ ΣΥΝΤΟΜΕΥΣΕΩΝ ..... **VIII**

ΠΕΡΙΛΗΨΗ ..... **IX**

ABSTRACT ..... **XII**

1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ **1**

1.1 Ο μυκητας Botrytis cinerea 1

1.1.1 Συμπτωματολογια 3

1.1.2 Βιολογικος κυκλος και επιδημιολογια 4

1.1.3 Αντιμετωπιση 6

1.2 Ο ωομυκητας Phytophthora infestans 7

1.2.1 Συμπτωματολογια 8

1.2.2 Βιολογικος κυκλος και επιδημιολογια 9

1.2.3 Αντιμετωπιση 13

1.3 Ο μυκητας Verticillium dahliae 14

1.3.1 Συμπτωματολογια 15

1.3.2 Βιολογικος κυκλος και επιδημιολογια 16

1.3.3 Αντιμετωπιση 18

1.4 Βιολογικη αντιμετωπιση 20

1.5 Ο Συγχρονος ρολος της Φασματοσκοπιας στην εγκαιρη ανιχνευση ασθενειων 23

1.6 Σκοποι της παρουσας Εργασιας 25

2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ **27**

2.1 Στερεα και υγρα θρεπτικα υποστρωματα καλλιεργειας μικροοργανισμων 27

2.1.1 Στερεο θρεπτικο υποστρωμα πατατας-δεξτροζης-αγαρ (Potato-Dextrose-Agar, PDA) 27

2.1.2 Οξινισμενο στερεο θρεπτικο υποστρωμα πατατας-δεξτροζης-αγαρ (Acidified Potato-Dextrose-Agar, APDA) 27

2.1.3 Υγρο θρεπτικο υποστρωμα πατατας-δεξτροζης (Potato-Dextrose-Broth, PDB) 28

2.1.4 Υγρο θρεπτικο υποστρωμα τριπτικασεΐνης-σογιας (Tryptic Casein-Soy-Broth, TSB) 28

2.2 In-vitro βιοδοκιμες 28

2.2.1 Δοκιμες αντιπαραβολης 28

2.2.2 Δοκιμες πτητικων 29

2.2.3 Καταγραφη μυκητολογικων παραμετρων για τη διερευνηση της επιδρασης των υπο εξεταση βακτηριακων στελεχων 30

2.3 In-planta και in-vivo βιοδοκιμες 32

2.3.1 Φυτικο υλικο 32

2.3.2 Προελευση βιολογικων παραγοντων 33

2.3.3 Παθοσυστημα τοματα-Botrytis cinerea 33

2.3.4 Παθοσυστημα τοματας-Phytophthora infestans 36

2.3.5 Παθοσυστημα Μελιτζανα-Verticillium dahliae και τοματα Verticillium dahliae 38

2.3.6 Καταγραφη παραμετρων ασθενειας και φυτικης αναπτυξης 41
2.3.7 Επαναπομονωση του παθογονου Verticillium dahliae 42
2.3.8 Ποσοτικοποιηση του DNA του Verticillium dahliae με Real-Time PCR 43
2.3.9 Ληψη φασματικων δεδομενων και υπολογισμος δεικτων βλαστησης 44
2.4 Πειραματικος σχεδιασμος και στατιστικη αναλυση 46

3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ 49

3.1 Αποτελεσματα αξιολογησης βακτηριακων στελεχων εναντι του μυκητα Botrytis cinerea 49
3.1.1 Αποτελεσματα in-vitro βιοδοκιμων 49
3.1.2 Αποτελεσματα in-planta βιοδοκιμων σε φυτα τοματας 54
3.1.3 Αποτελεσματα in-vivo βιοδοκιμων σε καρπους τοματας 60
3.2 Αποτελεσματα αξιολογησης βακτηριακων στελεχων εναντι του μυκητα Verticillium dahliae 63
3.2.1 Αποτελεσματα in-vitro βιοδοκιμων 63
3.2.2 Αποτελεσματα in-planta βιοδοκιμων σε φυτα τοματα 68
3.2.3 Αποτελεσματα in-planta βιοδοκιμων σε φυτα μελιτζανας 74
3.3 Αποτελεσματα αξιολογησης βακτηριακων στελεχων εναντι του ωομυκητα Phytophthora infestans 79
3.3.1 Αποτελεσματα in-vitro βιοδοκιμων 79
3.3.2 Αποτελεσματα in-vivo βιοδοκιμων σε φυλλαρια τοματας 84

4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ 87

5 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ – ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΕΡΓΑΣΙΕΣ 91

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ 92

ΛΙΣΤΑ ΣΥΝΤΟΜΕΥΣΕΩΝ

Πίνακας 1: Λίστα συντομεύσεων μεταπτυχιακής διατριβής.

Σύντμηση	Πλήρες όνομα
C-	*Control*
B.c.	*Botrytis cinerea*
P.i.	*Phytophthora infestans*
V.d.	*Verticillium dahliae*
SAR	*Κωδικός βακτηριακών στελεχών*
CDIPs	*Cell Death Inducing Proteins*
ICs	*Infection Cushions*
PCD	*Programmed Cell Death*
PCWDEs	*Plant Cell Wall Degrading Enzymes*
ROS	*Reactive Oxygen Species*
PTI	*Pattern Triggered Immunity*
ETI	*Effector Triggered Immunity*
PRR	*Pattern Recognition Receptors*
PR proteins	*Pathogenesis Related proteins*
MARKs	*Microtubule Affinity Regulating Kinases*
PAMPs	*Pathogen-Associated Molecular Patterns*
DAMPs	*Damage-Associated Molecular Patterns*
BCA	*Biological Control Agents*
ISR	*Induced Systemic Resistance*
SAR	*Systemic Acquired Resistance*
Cfu	*Colony Forming Unit*
PDA	*Potato Dextrose Agar*
APDA	*Acidified Potato Dextrose Agar*
PDB	*Potato Dextrose Broth*
TSB	*Tripticasein Soy Broth*
NDVI	*Normalized Difference Vegetation Index*
CVI	*Chlorophyll Vegetation Index*
NPCI	*Normalized Pigment Chlorophyll Index*
GNDVI	*Green Normalized Difference Vegetation Index*
PSRI	*Plant Senescence Reflectance Index*
TVI	*Triangular Vegetation Index*
EVI	*Enhanced Vegetation Index*

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η γεωργική παραγωγή ταλανίζεται από πληθώρα βιοτικών και αβιοτικών παραγόντων οι οποίοι προκαλούν σημαντικές οικονομικές απώλειες παγκοσμίως. Προκειμένου να διασφαλιστεί η ετήσια παραγωγή εφαρμόζονται μεγάλες ποσότητες αγροχημικών γεγονός που επιφέρει δυσμενείς επιδράσεις τόσο στο περιβάλλον όσο και στην ασφάλεια των παραγόμενων τροφίμων. Ταυτόχρονα, οι επικείμενοι Ευρωπαϊκοί περιορισμοί για την χρήση αγροχημικών καθιστούν επιτακτική ανάγκη εύρεσης εναλλακτικών μεθόδων διαχείρισης. Η βιολογική αντιμετώπιση των ασθενειών αναδύεται ως μια εναλλακτική, αποτελεσματική και ταυτόχρονα βιώσιμη στρατηγική. Κεφάλαιο της βιολογικής αντιμετώπισης αποτελεί η αξιολόγηση του ενδοφυτικού μικροβιώματος από αλόφυτα. Πληθώρα μελετών έχει διερευνήσει τις ευεργετικές επιδράσεις των ενδοφυτικών μικροοργανισμών έναντι σημαντικών φυτοπαθογόνων.

Οι ασθένειες των κηπευτικών προκαλούν σημαντικές οικονομικές απώλειες παγκοσμίως. Ο βοτρύτης (*Botrytis cinerea*), ο περονόσπορος (*Phytophthora infestans*) και η βερτισιλλίωση (*Verticillium dahliae*) αποτελούν τρεις από τις πλέον σημαντικές ασθένειες που επηρεάζουν την καλλιέργεια των κηπευτικών υποβαθμίζοντας την ποιότητα και την ποσότητα των παραγόμενων τροφίμων. Οι δομές διαχείμασης, ο βιολογικός κύκλος και η επιδημιολογία των παραπάνω ασθενειών καθιστούν την διαχείριση τους εξαιρετικά δύσκολη υπόθεση. Η αντιμετώπιση των ασθενειών αυτών αναμένεται να γίνει ακόμη δυσκολότερη, με την επικείμενη απόσυρση αποτελεσματικών δραστικών χημικών ενώσεων.

Στα πλαίσια της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής αξιολογήθηκε η κατασταλτική δράση 173 ενδοφυτικών βακτηριακών στελεχών απομονωμένων από Κρητικά αλόφυτα έναντι των παθογόνων *B. cinerea, P. infestans και V. dahliae*. Ειδικότερα, πραγματοποιήθηκε μια προκαταρκτική *in-vitro* αξιολόγηση κατά την οποία επιλέχθηκαν τα 20 πιο αποτελεσματικά στελέχη για κάθε παθοσύστημα. Στη συνέχεια, ακολούθησε διεξοδικότερη *in-vitro* αξιολόγηση τόσο με δοκιμές αντιπαραβολής όσο και με δοκιμές πτητικών προκειμένου να ελεγχθεί η επίδραση των στελεχών στην ανάπτυξη, στη παραγωγή κονιδίων, στο πάχος υφών και στον σχηματισμό μυκηλιακών δομών των φυτοπαθογόνων. Τα πιο αποτελεσματικά στελέχη αξιολογήθηκαν σε *in-planta* ή/και *in-vivo* βιοδοκιμές προκειμένου να διερευνηθεί η φυτοπροστατευτική τους ικανότητα. Επιπρόσθετα, πραγματοποιήθηκε λήψη φασματικών δεδομένων με την

χρήση της υπερφασματικής κάμερας PhenoCheck ως μια επιπρόσθετη παράμετρος αξιολόγησης των ασθενειών του ενδιαφέροντος. Από τα φασματικά δεδομένα υπολογίστηκαν οι δείκτες βλάστησης NDVI, CVI, NPCI, GNDVI, PSRI, TVI και EVI, προκειμένου να εντοπιστούν τυχόν διαφορές μεταξύ των επεμβάσεων στους επιμέρους δείκτες.

Από τα αποτελέσματα της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής προέκυψε ότι για το παθογόνο *B. cinerea,* 30 στελέχη εμφάνισαν αποτελεσματική παρεμποδιστική δράση κατά την προκαταρκτική αξιολόγηση. Από την διεξοδικότερη *in-vitro* αξιολόγηση προέκυψε ότι 9 στελέχη είχαν κατασταλτική δράση, τα οποία επιλέχθηκαν και αξιολογήθηκαν περεταίρω σε *in-planta* βιοδοκιμές. Από τις *in-planta* βιοδοκιμές προέκυψε ότι 1 στέλεχος μείωσε σημαντικά την εκδήλωση των συμπτωμάτων του βοτρύτη σε φυτά ενώ 8 στελέχη παρείχαν αποτελεσματική προστασία σε καρπούς τομάτας. Το αποτέλεσμα αυτό επιβεβαιώθηκε και με την ανάλυση των φασματικών δεδομένων όπου η αποτελεσματική επέμβαση στα φυτά τομάτας (SAR128) επέδειξε στατιστικές διαφορές σε σύγκριση με το θετικό μάρτυρα και με τις μη αποτελεσματικές επεμβάσεις, σε 4 από τους δείκτες βλάστησης που εξετάστηκαν (NDVI, GNDVI, TVI και EVI). Όσον αφορά στο παθογόνο *P. infestans,* 61 στελέχη εμφάνισαν αποτελεσματική παρεμποδιστική δράση κατά την προκαταρκτική αξιολόγηση. Από την διεξοδικότερη *in-vitro* αξιολόγηση προέκυψε ότι 13 στελέχη είχαν κατασταλτική δράση, τα οποία επιλέχθηκαν να αξιολογηθούν σε *in-vivo* βιοδοκιμές. Από τις *in-vivo* βιοδοκιμές προέκυψε ότι 6 στελέχη μείωσαν την εκδήλωση συμπτωμάτων του περονοσπόρου σε φυλλάρια τομάτας. Τέλος, όσον αφορά στο παθογόνο *V. dahliae,* 66 βακτηριακά στελέχη εμφάνισαν σημαντική παρεμποδιστική δράση κατά την προκαταρκτική αξιολόγηση. Από την διεξοδικότερη *in-vitro* αξιολόγηση προέκυψε ότι 15 στελέχη είχαν κατασταλτική δράση, τα οποία επιλέχθηκαν να αξιολογηθούν σε *in-planta* βιοδοκιμές. Από τις *in-planta* βιοδοκιμές προέκυψε ότι 1 στέλεχος μείωσε την εκδήλωση συμπτωμάτων της βερτισιλλίωσης σε φυτά μελιτζάνας και 2 σε φυτά τομάτας. Τα αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν και από την ανάλυση των φασματικών δεδομένων καθώς η αποτελεσματική επέμβαση στα φυτά μελιτζάνας (SAR120) επέδειξε στατιστικές διαφορές σε 5 από τους δείκτες βλάστησης που αναλύθηκαν (GNDVI, NDVI, NPCI, PSRI και EVI). Στα φυτά τομάτας, οι αποτελεσματικές επεμβάσεις (SAR60 και SAR160) επέδειξαν στατιστικές διαφορές σε σύγκριση με τους θετικούς μάρτυρες και με τις μη αποτελεσματικές επεμβάσεις, σε 4 από τους δείκτες

βλάστησης που αναλύθηκαν (NDVI, NPCI, TVI, EVI).

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής αναδεικνύουν τα ενδοφυτικά βακτηριακά στελέχη ως ένα εναλλακτικό εργαλείο διαχείρισης των φυτοπαθογόνων των κηπευτικών καλλιεργειών. Ωστόσο, είναι απαραίτητο να πραγματοποιηθούν μελλοντικές μελέτες που να στοχεύουν στη διερεύνηση των μηχανισμών δράσης των κατασταλτικών στελεχών αλλά και στη δυνατότητά τους να παρέχουν αποτελεσματική προστασία στις καλλιέργειες υπό συνθήκες πεδίου.

ABSTRACT

Agricultural crops are affected by several biotic and abiotic factors, leading to significant economic losses. To protect annual production, large amounts of chemicals are commonly applied, resulting in adverse effects on both the environment and food safety. Furthermore, European legislation and restrictions on chemical use arise an urgent need for alternative disease management methods. Biological control emerges as an alternative, effective, and sustainable alternative strategy. A basic perspective of biological control involves the assessment of endophytic microbiome from halophytes, that can potentially provide sufficient resistance of crops against biotic and abiotic stresses. Therefore, numerous studies have explored the beneficial responses of endophytic microorganisms against major plant pathogens.

Vegetable diseases cause substantial economic losses worldwide. *Botrytis cinerea*, *Phytophthora infestans*, and *Verticillium dahliae* are three of the most significant pathogens affecting vegetable cultivation, compromising the production in terms of quality and quantity. The resistant resting structures, complicated disease cycle and epidemiology of these diseases along with the lack of effective chemical treatments make disease management extremely challenging. Their control is expected to become even more difficult with the further impending withdrawal of chemical formulations.

In the present study, the antagonistic activity of 173 endophytic bacterial strains isolated from Cretan halophytes against *B. cinerea*, *P. infestans*, and *V. dahliae* was evaluated preliminarily. Subsequently, *in-vitro* screening was conducted by selecting the 20 most effective bacterial strains in each pathosystem. In particular, a more thorough *in-vitro* evaluation was performed using both confrontation and volatiles assays to assess the effect of bacterial strains on pathogen growth rate, sporulation, hyphae width and formation of mycelial resting structures. The most effective bacterial strains were further evaluated in *in-planta* bioassays to evaluate their plant-protective capacity. Several disease (i.e. disease incidence, severity, relative AUDPC, pathogen biomass) and plant growth (i.e. plant height, fresh weight) parameters were taken into account. Additionally, hyperspectral data were collected using the PhenoCheck hyperspectral digital camera as an additional plant indicator. From hyperspectral data, vegetation indices such as NDVI, CVI, NPCI, GNDVI, PSRI, TVI, and EVI were

calculated and analyzed to identify differences between treatments.

The results of the present study indicate that 30 bacterial strains exhibited effective inhibition against *B. cinerea* in the preliminary assessment. Data derived from thorough *in-vitro* evaluation, showed that 9 bacterial strains had significant suppressive effect, thus, they were screened furtherly in *in-planta* bioassays. In the *in-planta* bioassays, 1 bacterial strain reduced Grey mold symptoms in tomato plants and 8 in tomato fruits. These findings are supported by the analysis of spectral data, with the effective treatment on tomato plants (SAR128) showing significant differences in 4 vegetation indices (NDVI, GNDVI, TVI and EVI) compared to the positive control and the non-effective treatments. Regarding *P. infestans*, 61 bacterial strains exhibited effective inhibition of mycelial growth in the preliminary *in-vitro* screening. From those, 13 bacterial strains were effective in thorough *in-vitro* evaluation, thus, they were used in thorough *in-vivo* bioassays. In *in-vivo* bioassays, 6 bacterial strains reduced late blight symptoms in tomato leaves. Finally, in respect of *V. dahliae*, 66 bacterial strains inhibited the fungus significantly *in-vitro* preliminarily, whereas 15 strains showed significant suppressive activity in thorough *in-vitro* assays. In the *in-planta* bioassays, 1 bacterial strain reduced verticillium wilt symptoms significantly in eggplant and 2 in tomato plants. These results are supported by the analysis of spectral data, with the effective treatments on eggplants (SAR120) showing significant differences in 5 vegetation indices (GNDVI, NDVI, NPCI, PSRI and EVI). Likewise, the effective treatments on tomato plants (SAR60 and SAR160) demonstrated significant differences in 4 vegetation indices (NDVI, NPCI, TVI, EVI) compared to the positive controls and the non-effective treatments.

In conclusion, results of the present study indicate that endophytic bacterial strains can be a sustainable solution to manage diseases of vegetable crops efficiently. However, future studies are needed to investigate the potential modes of action at the physiological and molecular level. Moreover, the most promising bacterial strains should also be screened under field conditions to test their plant protective activity in practice.

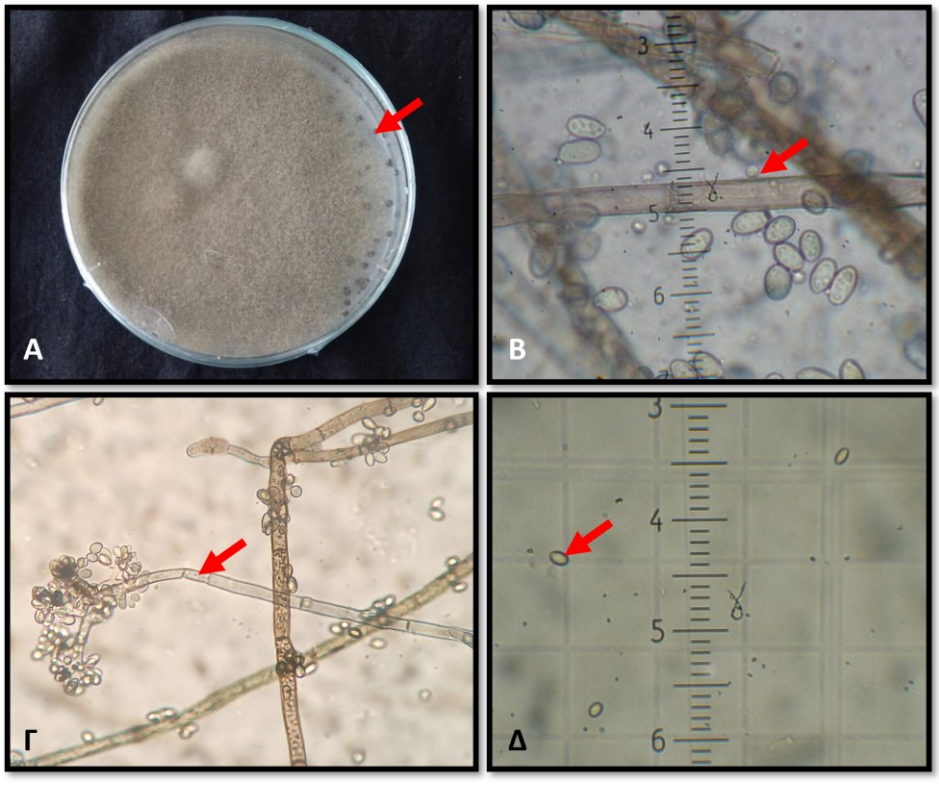
1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Ο μύκητας Botrytis cinerea

Ο **Βοτρύτης–τεφρά σήψη** (Gray mould) αποτελεί μια από τις πιο καταστροφικές ασθένειες των φυτών προκαλώντας σημαντικές οικονομικές απώλειες σε πληθώρα καλλιεργειών παγκοσμίως (Hua et al., 2018). Υπολογίζεται ότι οι ετήσιες απώλειες που προκαλούνται στις καλλιέργειες από το παθογόνο *Botrytis cinerea* κυμαίνονται από 10 έως 100 δισεκατομμύρια δολάρια-ΗΠΑ (Boddy 2015). Το είδος *B. cinerea* θεωρείται ως το δεύτερο πιο σημαντικό φυτοπαθογόνο στη μοριακή φυτοπαθολογία καθώς χρησιμοποιείται ως πρότυπος οργανισμός για την μελέτη ανθεκτικότητας στα μυκητοκτόνα, για τη διερεύνηση των αλληλεπιδράσεων παθογόνου-ξενιστή και για τη μελέτη της εξειδίκευσης σε ξενιστές (Amselem et al., 2011; Valero-Jimenez et al., 2019). Επιπλέον, έχει την ικανότητα να μολύνει τόσο προ-συλλεκτικά, υπαίθριες και θερμοκηπιακές καλλιέργειές, όσο και μετασυλλεκτικά, κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης των προϊόντων (Williamson et al., 2007).

Τα είδη του γένους *Botrytis* είναι από τα πιο διαδεδομένα παθογόνα στον πλανήτη και έχουν αναφερθεί σε όλες τις κλιματικές ζώνες, από τις τροπικές έως την έρημο και την αρκτική τούνδρα (Elad et al., 2016). Έως το 2023 έχουν καταγραφεί πάνω από 1606 ξενιστές, οι περισσότεροι από τους οποίους ανήκουν στα δικοτυλήδονα φυτά. Εκτός από τα δικοτυλήδονα, προσβάλει μεγάλη γκάμα φυτών που ανήκουν στα μονοκοτυλήδονα, αγγειόσπερμα, γυμνόσπερμα, πτεριδόφυτα αλλά και βρυόφυτα (Singh et al., 2024). Προσυλλεκτικά, προκαλεί σημαντικές οικονομικές απώλειες σε σημαντικές καλλιέργειες κηπευτικών (π.χ. τομάτα, αγγούρι, κολοκύθι, πιπεριά, μαρούλι, λάχανο, μπρόκολο κ.α.), σε βολβώδεις καλλιέργειες (π.χ. κρεμμύδι, σκόρδο), στο αμπέλι, σε φρούτα (π.χ. φράουλα, βατόμουρο, μήλο, ακτινίδιο), σε όσπρια (π.χ. ρεβύθι, φασόλι) καθώς και σε διάφορες ανθοκομικές καλλιέργειες (π.χ. τριανταφυλλιά, ζέρμπερα) (Droby and Licher 2004). Άλλες καλλιέργειες που μπορεί να προσβάλει είναι αυτή της μηδικής, του ηλίανθου, της βιομηχανικής κάνναβης (Williamson et al., 2007), του τσαγιού και του ροδιού (Alam et al., 2019).

Ο μύκητας *B. cinerea* (εγγενής μορφή *Botryotinia fuckeliana*) αναπτύσσει λευκές έως γκρίζες υφές όταν αναπτύσσεται σε θρεπτικό υπόστρωμα PDA (Potato Dextrose Agar). Οι υφές του παθογόνου είναι υαλώδεις και νηματοειδής. Το παθογόνο παράγει άφθονα μονοκύτταρα, υαλώδη κονίδια (ξηροσπόρια), με ωοειδές έως ελλειψοειδές σχήμα, διαστάσεων 10-12×8-10 μm. Τα κονίδια παράγονται στις διογκωμένες άκρες των διακλαδιζόμενων, εναέριων κονιδιοφόρων οι οποίοι έχουν τη μορφή 'βότρυ'. Επιπλέον, ο μύκητας σχηματίζει σκληρώτια με τα οποία διαχειμάζει σε αντίξοες συνθήκες (**Εικόνα 1**). Τα παραγόμενα σκληρώτια, τα οποία παρουσιάζουν μεγάλη παραλλακτικότητα, βρίσκονται προσκολλημένα μέσα στους μολυσμένους ιστούς ή και στα θρεπτικά υποστρώματα. Σε αρχικό στάδιο είναι λευκά και στη συνέχεια αποκτούν μαύρο χρώμα με διαστάσεις 2-4×1-2,5 mm (Βακαλουνάκης 2010). Αναφορικά με την ταξινόμηση του, ο μύκητας ανήκει στο φύλο Ascomycota, στην τάξη Leotiomycetes και στην οικογένεια Sclerotiniaceae (Singh et al., 2024).



Εικόνα 1. Μακροσκοπικά και μικροσκοπικά χαρακτηριστικά του μύκητα *B. cinerea*. **Α:** Κονιδιοποιημένη αποικία με σκληρώτια (κόκκινο βέλος) σε θρεπτικό υπόστρωμα PDA και μορφολογικά χαρακτηριστικά του παθογόνου υπό μεγέθυνση μικροσκοπίου, **Β:** υφή, **Γ:** κονιδιοφόρος με κονίδια, και **Δ:** κονίδια σε αιματοκυτταρόμετρο.

1.1.1 Συμπτωματολογία

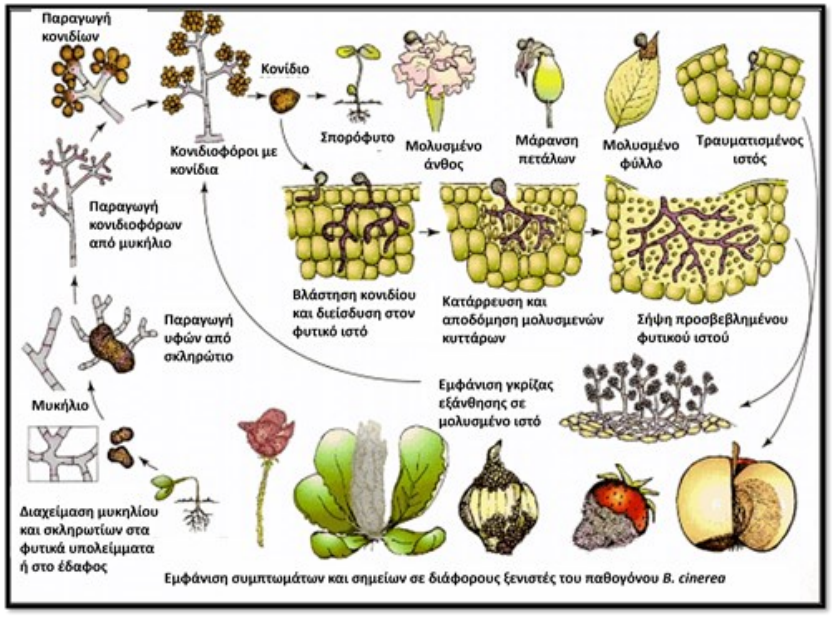
Το *B. cinerea* προκαλεί ένα ευρύ φάσμα συμπτωμάτων τα οποία εξαρτώνται από τις υπάρχουσες περιβαλλοντικές συνθήκες. Τα πιο τυπικά συμπτώματα της ασθένειας είναι οι μαλακές σήψεις που προκαλούνται από την κατάρρευση των ιστών του παρεγχύματος και η ταχεία εμφάνιση γκρίζων μαζών κονιδίων (γκρίζα εξάνθηση). Στις περισσότερες κηπευτικές καλλιέργειες, η μόλυνση ξεκινάει από τα γερασμένα άνθη προκαλώντας σήψη και στη συνέχεια εξαπλώνεται στους γειτονικούς αναπτυσσόμενους καρπούς. Για παράδειγμα, στη θερμοκηπιακή τομάτα, η μόλυνση εμφανίζεται τόσο στα κατώτερα φύλλα όσο και στα στελέχη πάνω σε πληγές κλαδέματος. Στο έλασμα των φύλλων παρατηρούνται πρασινοκίτρινες έως καστανές κηλίδες οι οποίες εξελίσσονται γρήγορα. Στο σημείο αυτό, οι φυτικοί ιστοί είναι μαλακοί. Στο στέλεχος εμφανίζονται έλκη πάνω στα οποία αναπτύσσεται πλούσια γκριζοκαστανή εξάνθηση (**Εικόνα 2**). Τέλος, στους καρπούς εκτός από το σύμπτωμα της μαλακής σήψης μπορεί να εκδηλωθεί το σύμπτωμα «κηλίδα φάντασμα» κατά το οποίο εμφανίζονται μικρές δακτυλιοειδείς κηλίδες, λευκού χρώματος με διάμετρο έως και 8 mm στο κέντρο των οποίων παρατηρείται ένα νεκρωτικό στίγμα (Παναγόπουλος 2000). Το σύμπτωμα αυτό είναι παθογνωμονικό και υποδηλώνει την επιτυχημένη άμυνα του ξενιστή, αν και ο καρπός είναι μη εμπορεύσιμος (Williamson et al., 2007).



Εικόνα 2. Συμπτώματα βοτρύτη σε καλλιέργεια τομάτας. **Α:** Γκρίζα εξάνθηση σε στέλεχος τομάτας, **Β:** έλκος και γκριζοκαστανή εξάνθηση σε στέλεχος τομάτας, **Γ:** συμπτώματα και σημεία στα φύλλα και **Δ:** «κηλίδες φάντασμα» σε καρπό τομάτας (Πηγή φωτογραφίας Δ: https://www.msstate.edu/).

1.1.2 Βιολογικός κύκλος και επιδημιολογία

Ο βιολογικός κύκλος του *B. cinerea* αποτελείται από την εγγενή (*Botryotinia fuckeliana*) και την αγενή (*Botrytis cinerea*) φάση. Όσον αφορά στην αγενή φάση, ένας ώριμος κονιδιοφόρος απελευθερώνει πληθώρα κονιδίων τα οποία αποτελούν το πρωτογενές μόλυσμα. Σε αντίξοες συνθήκες ο μύκητας διαχειμάζει με την μορφή σκληρωτίων (ή μυκηλίου) είτε σε υπολείμματα της καλλιέργειας είτε εντός των προσβεβλημένων φυτικών ιστών (**Εικόνα 3**). Τα σκληρώτια που αποτελούνται από β-γλυκάνες περικλείουν εσωτερικά τους το μυκήλιο προστατεύοντας το από την υπεριώδη ακτινοβολία αλλά και από την απώλεια υγρασίας. Σε ευνοϊκές περιβαλλοντικές συνθήκες τα σκληρώτια βλαστάνουν και παράγουν εγγενείς καρποφορίες, τα αποθήκια, τα οποία παράγουν ασκοσπόρια (εγγενή στάδιο). Ωστόσο, η εγγενής φάση δεν παρατηρείται συχνά στο φυσικό περιβάλλον (Amselem et al., 2011). Η παραγωγή των σκληρωτίων και των κονιδίων εξαρτάται από διάφορους περιβαλλοντικούς παράγοντες όπως είναι η ένταση του φωτός και το pH. Σε χαμηλές θερμοκρασίες και σε συνθήκες σκότους ο μύκητας τείνει να παράγει σκληρώτια ενώ παρουσία φωτός τείνει να παράγει κονίδια (Hua et al., 2018). Η διάδοση του παθογόνου πραγματοποιείται κυρίως με τον αέρα και το νερό αλλά και με τις δραστηριότητες του καλλιεργητή. Η μόλυνση ευνοείται από υψηλή σχετική υγρασία (>93%) σε εύρος θερμοκρασιών 12-30 ºC με βέλτιστο τους 15-20 ºC (Bika et al., 2021).



Εικόνα 3. Βιολογικός κύκλος του παθογόνου *B. cinerea* (Πηγή: Agrios 2006).

Ειδικότερα, η έναρξη της μόλυνσης προκαλείται όταν ένα κονίδιο έρθει σε επαφή με τα φυτικά κύτταρα του ξενιστή. Το κονίδιο προσκολλάται και βλαστάνει πάνω στη φυτική επιφάνεια. Οι βλαστικοί σωλήνες και οι επιμήκεις υφές που προκύπτουν μπορούν να διαφοροποιηθούν είτε σε απλές πλάκες συγκρατήσεως είτε σε συστάδες πλακών συγκρατήσεως (infection cushions - ICs), εξειδικευμένων δομών που επιτρέπουν τη διείσδυση του παθογόνου στα κύτταρα του ξενιστή (Bi et al,. 2023). Επιπλέον, τα ICs είναι πολυκύτταρες πλάκες συγκρατήσεως οι οποίες εκκρίνουν τελεστές όπως φυτοτοξίνες, δραστικές ομάδες οξυγόνου (Reactive Oxygen Species - ROS), πρωτεάσες, κουτινάσες και ένζυμα αποικοδόμησης του κυτταρικού τοιχώματος των φυτών, καθώς και πρωτεΐνες που προκαλούν τον θάνατο των φυτικών κυττάρων (Choquer et al., 2021). Επιπλέον, η διείσδυση του παθογόνου μπορεί να γίνει είτε μέσω φυσικών ανοιγμάτων είτε απευθείας από την επιδερμίδα μέσω βραχέων κονιδιακών βλαστικών σωλήνων (Veloso and Van kan 2018).

Ως νεκροτροφικός οργανισμός, το παθογόνο παράγει ένζυμα που αποδομούν τα φυτικά κυτταρικά τοιχώματα (Plant Cell Wall Degrading Enzymes – PCWDEs), πρωτεΐνες που επάγουν τον κυτταρικό θάνατο (Cell-Death Inducing-Proteins – CDIPs) και έχει την ικανότητα να εκμεταλλεύεται τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο (Programmed Cell Death – PCD) για να θανατώνει τα φυτικά κύτταρα (Govrin and Levine 2000). Το παθογόνο τελικώς νεκρώνεται από δευτερογενείς-αντιμικροβιακούς μεταβολίτες που παράγονται από τον ξενιστή κατά τη διαδικασία του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου των φυτικών κυττάρων. Σε αυτό το στάδιο, η επιβίωση του *B. cinerea* εξαρτάται από έναν αντι-αποπτωτικό μηχανισμό που ελέγχεται από το γονίδιο *BcBIR1* (ευαισθησία στη PCD) (Shlezinger et al., 2011). Η φάση αυτή είναι πολύ κρίσιμη για την σχέση παθογόνου-ξενιστή καθώς καθορίζει εάν η μόλυνση θα συνεχίσει ή θα σταματήσει στο σημείο εκείνο. Στην περίπτωση που ο μύκητας επεκταθεί στα γειτονικά κύτταρα, παράγει κονίδια προκειμένου να πραγματοποιηθούν οι δευτερογενείς μολύνσεις (Hua et al., 2018).

Η υψηλή μολυσματικότητα του παθογόνου οφείλεται αφενός στη μη εξειδίκευσή του ως προς τον ξενιστή και αφετέρου στην ικανότητα του να μολύνει εύρος φυτικών οργάνων. Πρόσφατα, συσχετίστηκε η υψηλή μολυσματικότητα του παθογόνου με ένα τερματικό επαναλαμβανόμενο ρετρο-μεταθετό στοιχείο (retro-transposon) που ονομάζεται *Boty* καθώς και με ένα μεταθετό στοιχείο που ονομάζεται

Flipper. Η συσχέτιση αυτή είχε ως αποτέλεσμα το διαχωρισμό του είδους σε τέσσερις γενετικά διαφορετικούς τύπους: 1. ***Boty*** εάν διαθέτει το συγκεκριμένο ρετρο-μεταθετό στοιχείο, 2. ***Flipper*** εάν διαθέτει το αντίστοιχο μεταθετό στοιχείο, 3. ***Trasposa*** εάν διαθέτει και τα δύο από τα προ-αναφερθέντα μεταθετά στοιχεία, και 4. ***Vacuma*** εάν δεν διαθέτει κανένα από αυτά. Οι μύκητες που διαθέτουν τα μετάθετα στοιχεία είναι περισσότερο μολυσματικοί καθώς έχουν την ικανότητα να απελευθερώνουν μικρά μόρια RNA (τελεστές) που εξουδετερώνουν τα γονίδια της άμυνα του φυτού (Plesken et al., 2021).

1.1.3 Αντιμετώπιση

Η παγκόσμια εξάπλωση σε συνδυασμό με την γενετική ποικιλότητα και την γρήγορη εξέλιξή του παθογόνου καθιστούν την διαχείριση της ασθένειας εξαιρετικά δύσκολη. Το γεγονός αυτό έχει ως αποτέλεσμα οι παραγωγοί να υιοθετούν πολλές μεθόδους ολοκληρωμένης διαχείρισης που συνδυάζουν καλλιεργητικά μέτρα, χημικές και βιολογικές πρακτικές (Chen et al., 2023). Ωστόσο, η εκτεταμένη χρήση αγροχημικών αποτελεί μείζων ζήτημα στην σύγχρονη γεωργία, στρέφοντας το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας στην εύρεση εναλλακτικών μεθόδων διαχείρισης της ασθένειας οι οποίες είναι περισσότερο φιλικές προς το περιβάλλον. Τέτοιες πρακτικές είναι η γενετική βελτίωση και η γενετική μηχανική (Tian et al., 2019).

Τα καλλιεργητικά μέτρα είναι η πρώτη γραμμή διαχείρισης της ασθένειας. Το *B. cinerea* μολύνει περισσότερο γερασμένους ιστούς επομένως η απομάκρυνση φυτικών υπολειμμάτων και η αφαίρεση νεκρών, τραυματισμένων και προσβεβλημένων φυτικών οργάνων είναι απαραίτητη για τη διαχείριση της ασθένειας (Hausbeck and Pennypacker 1991). Επιπλέον, οι καλλιεργητικές τεχνικές θα πρέπει να εφαρμόζονται με τρόπο τέτοιο έτσι ώστε να αποφεύγεται η διάδοση του μολύσματος καθώς το παθογόνο παράγει ξηροσπόρια. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η εναέρια άρδευση η οποία διευκολύνει τη διάδοση των κονιδίων του παθογόνου σε γειτονικά φυτά. Άλλη μια μέθοδος διαχείρισης είναι η βιολογική αντιμετώπιση με τη χρήση βιολογικών παραγόντων. Τα τελευταία χρόνια αξιολογείται πληθώρα βιολογικών παραγόντων έναντι του βοτρύτη αν και πολλά από αυτά δεν δείχνουν ενθαρρυντικά αποτελέσματα σε συνθήκες πεδίου. Χαρακτηριστικά παραδείγματα βιολογικών παραγόντων που

αξιολογούνται είναι μύκητες του γένους *Trichoderma* sp., και *Clonostachys* sp., βακτήρια του γένους *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp. καθώς και ζυμομύκητες όπως το *Exophiala jeanselmei* (Bika et al., 2021; Gao et al., 2018).

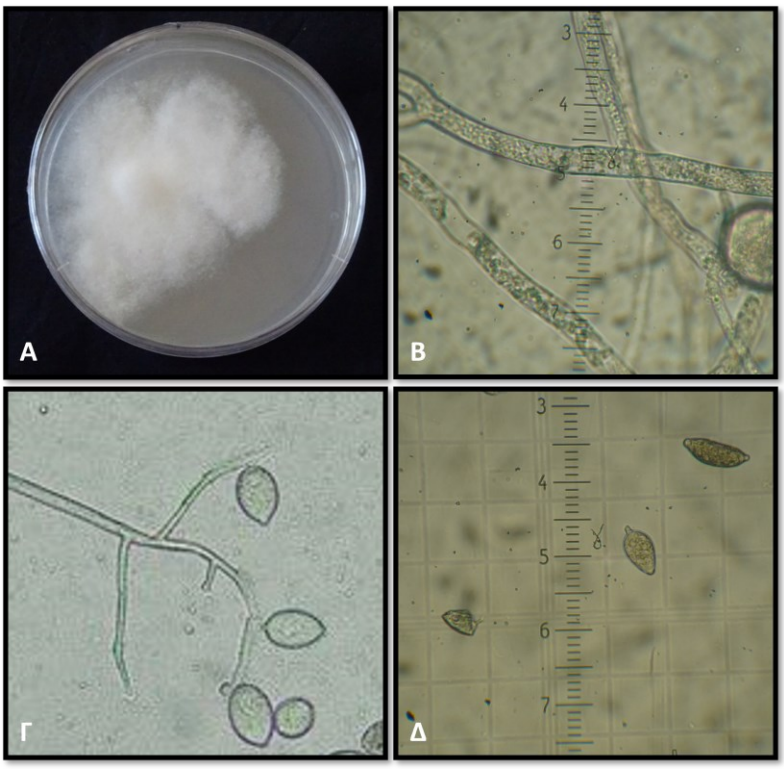
Οι τελευταίες προσπάθειες διαχείρισης της ασθένειας βασίζονται σε πιο πρόσφατα αναπτυγμένες μεθόδους όπως είναι η παρεμβολή RNA (RNA interference – RNAi) η οποία στοχεύει στη γονιδιακή σίγαση. Οι Wang et al., 2017, εφάρμοσαν την τεχνική αυτή σε φρούτα, λαχανικά και κομμένα άνθη με αποτέλεσμα τη μείωση της εξέλιξης της ασθένειας. Ειδικότερα, πραγματοποιήθηκε ψεκασμός μονόκλωνων και δίκλωνων RNA που στόχευαν στη σίγαση των πρωτεΐνες dicer, BcDCL1 και BcDL2 του παθογόνου. Οι Duanis-Assaf et al., 2022 χρησιμοποίησαν συνθετικά δίκλωνα RNA που στόχευαν τη βιοσύνθεση της εργοστερόλης μειώνοντας με αυτό τον τρόπο τη βλάστηση των κονιδίων και την ανάπτυξη του μυκηλίου του παθογόνου. Η διαχείριση της ασθένειας με SIGS (Spray Induced Gene Silencing - SIGS) είναι πολλά υποσχόμενη ωστόσο χρειάζεται περισσότερη μελέτη προκειμένου να βελτιωθούν διάφορα τεχνικά ζητήματα. Για παράδειγμα, η επίδραση των RNA διαρκεί μόνο λίγες ημέρες απαιτώντας επανεφαρμογή του dsRNA (double stranded RNA - dsRNA). Επιπλέον, οι μέθοδοι εφαρμογής μπορεί να μην επιτυγχάνουν το επιθυμητό αποτέλεσμα ενώ παράλληλά το κόστος κατασκευής των κατάλληλων μορίων RNA είναι πολύ υψηλό.

1.2 Ο ωομύκητας Phytophthora infestans

Ο **περονόσπορος** (Late blight) που οφείλεται στον φυτοπαθογόνο ωομύκητα *Phytophthora infestans* είναι μια ιδιαίτερα καταστροφική ασθένεια η οποία προσβάλει την καλλιέργεια της τομάτας και της πατάτας καθώς και αλλά είδη της οικογένειας Solanaceae (αυτοφυή και καλλωπιστικά). Η έξαρση του *P. infestans* και ο επακόλουθος Ιρλανδικός λιμός του 19^{ου} αιώνα αποτελούν ένα σημαντικό κεφάλαιο στην ανθρώπινη ιστορία, αποτυπώνοντας τις συνέπειες που μπορεί να έχει ένα φυτοπαθογόνο στην κοινωνία και στην ασφάλεια των τροφίμων (Leesutthiphonchai et al., 2018). Υπό ευνοϊκές περιβαλλοντικές συνθήκες μπορεί να προκαλέσει μεγάλες οικονομικές ζημιές στις καλλιέργειες μέσα σε 7-10 ημέρες (Panthee et al., 2024). Αναφέρεται ότι οι ετήσιες οικονομικές απώλειες που προκαλεί ανέρχονται σε 10 δισεκατομμύρια δολάρια (Haverkort et al., 2009).

Ο ωομύκητας σχηματίζει λευκές κοινοκύτταρες υφές σε θρεπτικό υπόστρωμα

PDA (**Εικόνα 4**). Από τις υφές παράγονται λεπτοί διακλαδιζόμενοι σποριαγγειοφόροι που φέρουν 2-4 διακλαδώσεις στην άκρη των οποίων παράγεται ένα λεμονοειδές σποριάγγειο με διαστάσεις 21×23 μm που μπορεί να φέρει ζωοσπόρια. Ο σποριαγγειοφόρος συνεχίζει να αναπτύσσεται μετά τη παραγωγή του σποριαγγείου με αποτέλεσμα το σποριάγγειο από ακραίο να γίνεται πλάγιο δημιουργώντας στο σημείο εκείνο μια διόγκωση, χαρακτηριστική για την αναγνώριση του παθογόνου. Επιπλέον, ο ωομύκητας είναι δυνατόν να παράγει δομές διαχείμασης, τα ωοσπόρια που φέρουν παχιά τοιχώματα και έχουν διάμετρο 21-35 μm (Παναγόπουλος 2000). Όσον αφορά στην ταξινόμηση, το παθογόνο ανήκει στο φύλο Oomycota, στην τάξη Peronosporales και στην οικογένεια Peronosporaceae (Erwin and Ribeiro 1996).

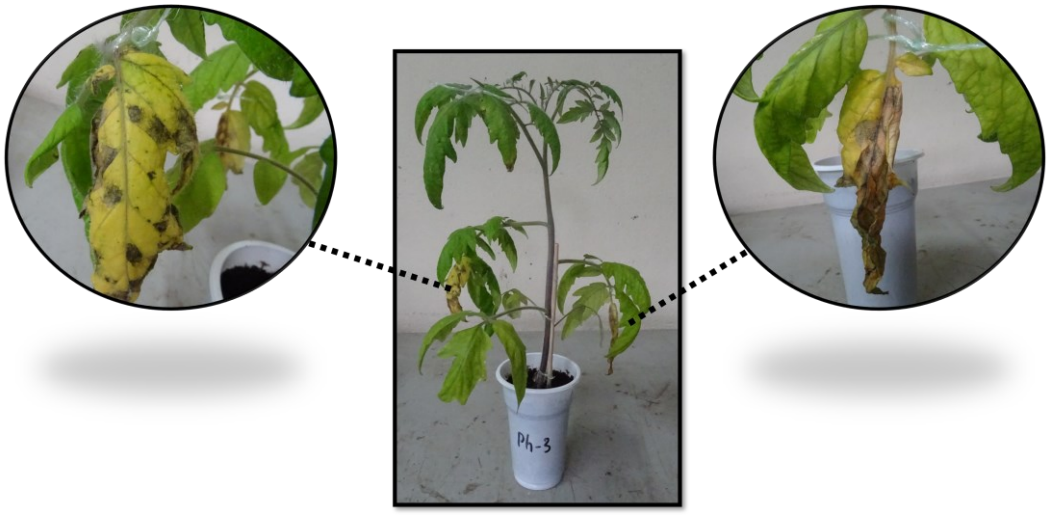


Εικόνα 4. Μορφολογικά χαρακτηριστικά του ωομύκητα *P. infestans*. **Α:** Καλλιέργεια σε θρεπτικό υπόστρωμα PDA, **Β:** υφή, **Γ:** σποριαγγειοφόρος με σποριάγεια και **Δ:** σποριάγγεια σε αιματοκυτταρόμετρο (Πηγή εικόνας Γ: https://content.ces.ncsu.edu/).

1.2.1 Συμπτωματολογία

Το παθογόνο προσβάλει όλα τα υπέργεια φυτικά όργανα σε όλα τα στάδια ανάπτυξης καθώς και τους κονδύλους της πατάτας. Τα πρώτα συμπτώματα της ασθένειας γίνονται ορατά στα κατώτερα φύλλα στα οποία εμφανίζονται υποκίτρινες έως λαδί κηλίδες χωρίς σαφή όρια (‘λαδιές’) οι οποίες με την εξέλιξη της ασθένειας

καλύπτουν όλη την επιφάνεια του ελάσματος και αποκτούν καστανό-μαύρο χρώμα (Mazumdar et al., 2021) (**Εικόνα 5**). Καστανές νεκρωτικές περιοχές εμφανίζονται και στα στελέχη των φυτών. Σε συνθήκες υψηλής υγρασίας παρατηρούνται λευκές εξανθήσεις (σποριαγγειοφόροι) στην κάτω επιφάνεια των φύλλων. Στους καρπούς της τομάτας, η μόλυνση εντοπίζεται στη περιοχή του ποδίσκου όπου σχηματίζονται καστανές, βυθισμένες κηλίδες οι οποίες επεκτείνονται σε όλο τον καρπό. Στους κονδύλους πατάτας παρατηρούνται επιφανειακά καστανές, βυθισμένες κηλίδες χωρίς σαφή όρια (Παναγόπουλος 2000).



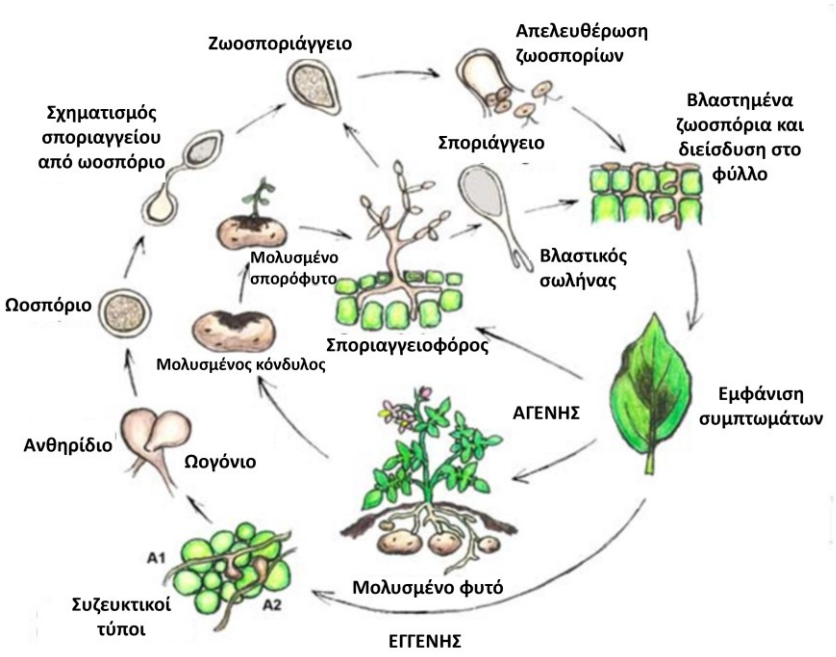
Εικόνα 5. Συμπτώματα περονόσπορου σε φύλλα τεχνητά μολυσμένων φυτών τομάτας.

1.2.2 Βιολογικός κύκλος και επιδημιολογία

Το παθογόνο *P. infestans* είναι ένα ημι-βιοτροφικό παθογόνο όπου κατά τη διάρκεια του βιολογικού του κύκλου αποτελείται από μια βιοτροφική και μια νεκροτροφική φάση (Perfect and Green 2001). Ο βιολογικός κύκλος του ωομύκητα περιλαμβάνει την αγενή φάση η οποία επιτρέπει την γρήγορη εξάπλωση και διασπορά του παθογόνου και την εγγενή φάση η οποία επιτρέπει την αυξημένη γενετική εξέλιξη που βοηθάει το παθογόνο να προσαρμόζεται στις διάφορες συνθήκες. Η εγγενή φάση εντοπίζεται εξαιρετικά σπάνια στην Ευρώπη (Fry 2008). Το παθογόνο κατατάσσεται ως ετερόθαλλος ωομύκητας με δύο συζευκτικούς τύπους, τον A1 και τον A2, οι οποίοι απαιτούνται για την εγγενή αναπαραγωγή (Goodwin et al., 1994).

Το παθογόνο διαχειμάζει με τη μορφή μυκηλίου στους μολυσμένους φυτικούς ιστούς, στο σπόρο της τομάτας και στους κονδύλους της πατάτας (**Εικόνα 6**). Εφόσον,

υπάρχουν και οι δύο συζευκτικοί τύποι (A1 & A2) το παθογόνο σχηματίζει ωοσπόρια με τα οποία μπορεί να διαχειμάσει στο έδαφος (Bengtsson 2013). Οι σποριαγγειοφόροι εξέρχονται από τα στομάτια των μολυσμένων φυτικών ιστών παράγοντας σποριάγγεια. Τα σποριάγγεια απελευθερώνονται και διασπείρονται στα γειτονικά υγιή φυτά τις πρωινές ώρες μέσω του ανέμου (Aylor 2003). Η μόλυνση ξεκινάει κατά τη διάρκεια της καλλιεργητικής περιόδου από σποριάγγεια τα οποία όταν έρθουν σε επαφή με τον ξενιστή, κάτω από ευνοϊκές συνθήκες (20-25 ^{o}C και ύπαρξη θρεπτικών συστατικών) βλαστάνουν. Υπό δυσμενείς για το παθογόνο συνθήκες (10-15 ^{o}C και έλλειψη θρεπτικών συστατικών), τα σποριάγγεια απελευθερώνουν 3-8 μονοπύρηνα ζωοσπόρια τα οποία κολυμπούν μέχρι τον ξενιστή όπου και σχηματίζουν πλάκες συγκράτησης και βλαστικούς σωλήνες (Fry 2008). Κάθε βλαστικός σωλήνας εισέρχεται στο εσωτερικό των φυτικών ιστών είτε διασπώντας το κυτταρικό τοίχωμα και την επιδερμίδα είτε μέσω των στομάτων. Το μυκήλιο αναπτύσσεται ενδο-μεσοκυττάρια με παράλληλο σχηματισμό εξειδικευμένων δομών που ονομάζονται μυζητήρες (Grenville-Briggs et al., 2005) (**Εικόνα 7**). Στους κόνδυλους της πατάτας, το παθογόνο εισέρχεται είτε από πληγές είτε από φυσικά ανοίγματα όπως είναι τα φακίδια.



Εικόνα 6. Βιολογικός κύκλους του παθογόνου *P. infestans* (Πηγή: Bengtsson 2013).

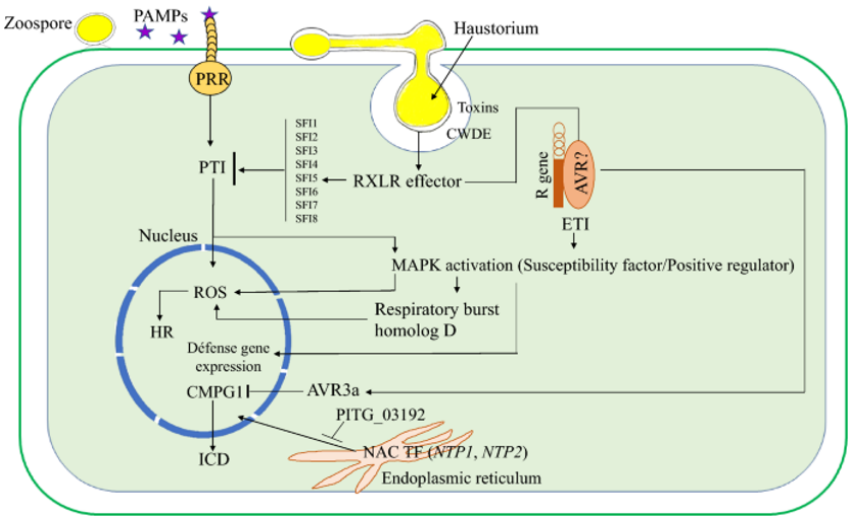
Το *P. infestans* αρχικώς διατηρεί βιώσιμα τα κύτταρα του ξενιστή του στοχεύοντας παράλληλα στην καταστολή των αμυντικών του λειτουργειών καθώς το

παθογόνο μπορεί να παραμένει ζωντανό μόνο σε ζωντανά φυτικά κύτταρα. Ωστόσο, τα φυτά διαθέτουν πολλά επίπεδα άμυνας προκειμένου να αντιμετωπίσουν την εισβολή παθογόνων. Ειδικότερα, τα φυτά έχουν αναπτύξει ένα παθητικό αμυντικό σύστημα που αποτελεί την πρώτη γραμμή άμυνας η οποία στηρίζεται σε ανατομικούς, φυσικούς και βιοχημικούς μηχανισμούς. Επιπλέον έχουν αναπτύξει ένα εγγενή ενεργητικό μηχανισμό άμυνας ο οποίος διακρίνεται στο βασικό ανοσοποιητικό σύστημα και στο ανοσοποιητικό σύστημα των γονιδίων ανθεκτικότητας (Jones and Dangl 2006). Τα φυτά αναγνωρίζουν τα παθογόνα από διατηρημένα μοριακά πρότυπα που ονομάζονται PAMPs (Pathogen Associated Molecular Patterns) όπως είναι η χιτίνη και οι πεπτιδογλυκάνες τα οποία αναγνωρίζονται από πρωτεϊνικούς υποδοχείς αναγνώρισης προτύπων PRRs (Pattern Recognition Receptors) οι οποίοι με την σειρά τους ενεργοποιούν την άμυνα που ενεργοποιείται από τα PAMPs (PAMP-triggered immunity – PTI). Η ενεργοποίηση της PTI πυροδοτεί την παραγωγή ενεργών ριζών οξυγόνου καθώς και την εναπόθεση καλόζης στα κυτταρικά τοιχώματα. Ωστόσο, τα παθογόνα μπορούν να εξουδετερώσουν την PTI εκκρίνοντας ειδικούς τελεστές. Οι τελεστές αναγνωρίζονται από πρωτεϊνικούς υποδοχείς αναγνώρισης που είναι πλούσιοι σε λευκίνη οι οποίοι δεσμεύουν νουκλεοτίδια και ονομάζονται NBS-LRR (Nucleotide Binging Site-Leucine-Rich-Repeat). Οι υποδοχείς αυτοί ενεργοποιούν την άμυνα που προκαλείται από τελεστές (Effector- triggered immunity – ETI) (Bhandari and Brandizzi 2024).

Το *P. infestans* έχει αναπτύξει στρατηγικές καταστολής των αμυντικών αποκρίσεων του ξενιστή. Κατά την βιοτροφική του φάση το παθογόνο διεισδύει στα κύτταρα του ξενιστή είτε με υφές είτε με εξειδικευμένες δομές (τους μυζητήρες) μέσω των οποίων προσλαμβάνει θρεπτικά συστατικά και απελευθερώνει τελεστές. Αυτοί οι πρωτεϊνικοί τελεστές μπορούν να απελευθερωθούν είτε εξωκυτταρικά (στον αποπλάστη) είτε ενδοκυτταρικά (κυτταροπλασματικοί) (Panstruga and Doddds 2009). Οι εξωκυτταρικοί τελεστές είναι δύο τύπων. Οι τελεστές του πρώτου τύπου συμβάλλουν στην καταστολή της άμυνας του ξενιστή καθώς και στη διαδικασία της μόλυνσης (π.χ. EPI1 και EPI10) (Tian et al., 2004). Οι τελεστές του δεύτερου τύπου διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην διαδικασία της μόλυνσης μέσω της παραγωγής ενζύμων PCWDEs και τοξινών (π.χ. NLPs) (Ottman et al., 2009). Επιπλέον, το παθογόνο παράγει ένζυμα όπως είναι γλυκοσιδικές υδρολάσες οι οποίες αποικοδομούν

τις φυτοαλεξίνες, ισοχορισματάσες που παρεμποδίζουν τη σηματοδότηση του σαλικυλικού οξέος, ένζυμα βερβερίνης που παρεμποδίζουν ολιγοσακχαρίτες να λειτουργήσουν ως DAMPs (Damage Associated Molecular Patterns) καθώς και αναστολείς ενζύμων όπως είναι η πρωτεάση κυστείνης EPIC1 που καταστέλλουν τη δράση αμυντικών ενζύμων του φυτού-ξενιστή. Η βιοτροφική ανάπτυξη περιορίζεται στον αποπλάστη, γεγονός που έχει ως αποτέλεσμα τη μη ανίχνευση του παθογόνου από τον ξενιστή. Επιπλέον, ως ωομύκητας στερείται χιτίνη, ένα από τα πιο σημαντικά PAMPs (Daniel et al., 2017; Liu et al., 2014; Raffaele et al., 2010).

Στην συνέχεια αφού επεκταθεί στους μεσοκυττάριους χώρους το παθογόνο εκκρίνει δύο κατηγορίες πρωτεϊνών, τις RXLRs και τις CRNs, οι οποίες μεταφέρονται στα φυτικά κύτταρα μέσω των μυζητήρων. Οι RXLRs προάγουν την ασθένεια καταστέλλοντας την άμυνα του ξενιστή και αυξάνοντας την ευαισθησία του καθώς αναγνωρίζονται και δρουν ως γονίδια αμολυσματικότητας (Avirulent genes – AVR genes) (Amaro et al., 2017). Οι CRNs έχουν την ικανότητα να δεσμεύουν φυτικές πρωτεΐνες και να επηρεάζουν την έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με την ευαισθησία (Boevink et al., 2016; Song et al., 2015). Προς το τέλος του βιολογικού κύκλου το παθογόνο εξαπλώνεται πέραν του αποπλάστη, σταματάει το σχηματισμό μυζητήρων και προκαλεί τελικά νέκρωση των κυττάρων του ξενιστή (Leesutthiphonchai et al., 2018).



Εικόνα 7. Μηχανισμός παθογένεσης του ωομύκητα *P. infestans* (Πηγή: Mazumdar et al., 2021).

1.2.3 Αντιμετώπιση

Η διαχείριση της ασθένειας στηρίζεται κατά κύριο λόγο σε καλλιεργητικά μέτρα, στη χρήση ανθεκτικών ποικιλιών καθώς και στα χημικά ωομυκητοκτόνα (Poudel et al., 2020). Τα καλλιεργητικά μέτρα αποτελούν την πρώτη γραμμή άμυνα των παραγωγών έναντι του παθογόνου και στοχεύουν στη μείωση της επιβίωσης, διασποράς, αναπαραγωγής και εγκατάστασης του παθογόνου. Όπως προαναφέρθηκε, το παθογόνο διαχειμάσει κατά κύριο λόγο στους μολυσμένους κονδύλους πατάτας, σε μολυσμένα φυτά καθώς και στο σπόρο τομάτας. Επομένως, η χρήση υγιούς πολλαπλασιαστικού υλικού και η αφαίρεση προσβεβλημένων φυτών και υπολειμμάτων είναι καθοριστικής σημασίας. Επιπλέον, η διατήρηση της υγείας των φυτών καθώς και ο τρόπος εφαρμογής των γεωργικών πρακτικών (π.χ. αρδεύσεις και λιπάνσεις) είναι σημαντικοί παράγοντες για τη διαχείριση της ασθένειας (Tsedaley 2014). Για παράδειγμα, η άρδευση με καταιονισμό θα πρέπει να εφαρμόζεται προσεκτικά καθώς μπορεί να συμβάλει στην εξάπλωση της ασθένειας. Η χρήση ανθεκτικών ποικιλιών είναι μια από τις πιο αποτελεσματικές μεθόδους διαχείρισης. Ωστόσο, δεν υπάρχουν άνοσες διαθέσιμες ποικιλίες τομάτας ή πατάτας αλλά ποικιλίες με διαβαθμιζόμενο βαθμό ανθεκτικότητας. Όσο υψηλότερος είναι ο βαθμός της ανθεκτικότητας τόσο χαμηλότερες είναι οι εισροές των ωομυκητοκτόνων που απαιτούνται στην καλλιέργεια (Popokova 1972). Ωστόσο, κύρια μέθοδο διαχείρισης αποτελεί η χρήση χημικών ωομυκητοκτόνων. Τα ωομυκητοκτόνα μπορούν να επιβραδύνουν ή και να αναστέλλουν την εξέλιξη της ασθένειας εφόσον η εφαρμογή τους γίνεται έγκαιρα (πριν την μόλυνση ή σε πολύ αρχικό στάδιο). Δεν έχουν την ικανότητα να θεραπεύουν την ασθένεια όταν αυτή έχει εξελιχθεί. Γενικότερα, υπάρχει η τάση διαχείρισης της ασθένειας στα πλαίσια της ολοκληρωμένης διαχείρισης που στοχεύει στη μειωμένη χρήση αγροχημικών με παράλληλη αύξηση της παραγωγής (Tsedaley 2014). Ωστόσο, σύμφωνα με τις οδηγίες της Ευρωπαϊκής Ένωσης θα πρέπει να μειωθεί η εκτεταμένη χρήση αγροχημικών με ταυτόχρονη στροφή σε βιώσιμες εναλλακτικές στρατηγικές ελέγχου. Μια τέτοια μέθοδος είναι και η χρήση βιολογικών παραγόντων. Παρά το γεγονός ότι έχει μελετηθεί πληθώρα μικροοργανισμών έναντι του *P. infestans*, υπάρχουν λίγοι μικροοργανισμοί τυποποιημένοι σε εμπορικά σκευάσματα που μπορούν να εφαρμοστούν. Γένη βιολογικών παραγόντων που έχουν αξιολογηθεί διεξοδικά τόσο σε *in-vitro* όσο και σε *in-planta* βιοδοκιμές έναντι του παθογόνου είναι τα *Trichoderma* spp., *Bacillus* sp.,

Streptomyces spp., *Pseudomonas* spp. κ.α (Hashemi et al., 2022).

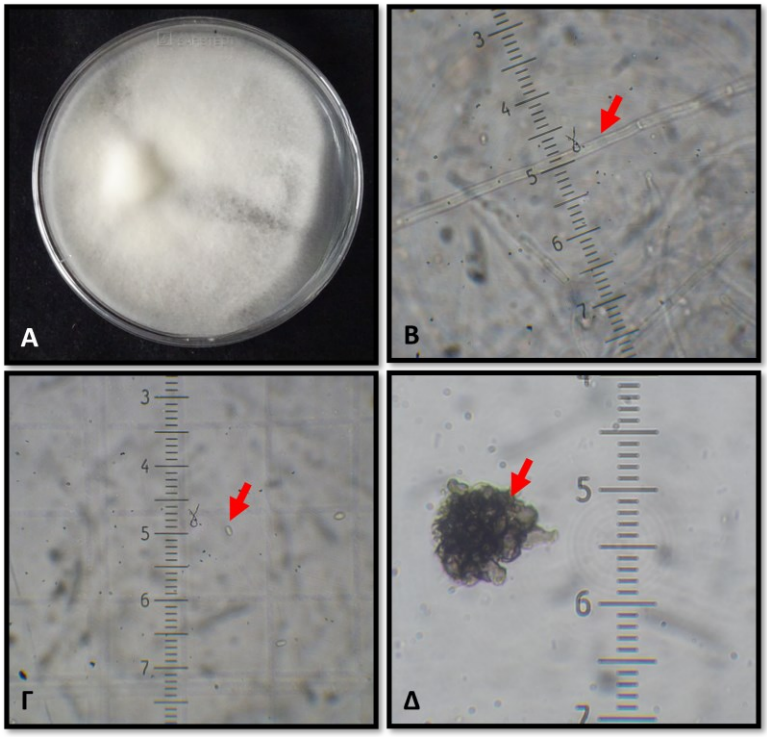
1.3 Ο μύκητας Verticillium dahliae

Η **Βερτισιλλίωση** (verticillium Wilt) αποτελεί επίσης μια ιδιαίτερα καταστροφική ασθένεια για τις καλλιέργειες των κηπευτικών. Η ασθένεια προκαλείται από μύκητες του γένους *Verticillium* που ανήκουν στην κατηγορία των αδρομυκώσεων, δηλαδή ασθενειών που το παθογόνο εισέρχεται από το ριζικό σύστημα, αποικίζει τα αγγεία του ξύλου και παρεμποδίζει την ανοδική κίνηση του νερού (Inderbitzin et al. 2011). Τα είδη που προκαλούν σημαντικές οικονομικές απώλειες στις καλλιέργειες των κηπευτικών είναι το *V. dahliae* και το *V. albo-atrum*. Τα δύο είδη διαφέρουν ως προς τον τρόπο διαχείμαση, το εύρος ξενιστών αλλά και την επιδημιολογία της ασθένειας (Domsch et al., 1980). Πιο συγκεκριμένα, όσον αφορά στο *V. dahliae,* διαχειμάζει με τη μορφή μικροσκληρωτίων, έχει ευρύ φάσμα ξενιστών ενώ η ανάπτυξη της ασθένειας ευνοείται σε εύρος θερμοκρασιών από 24 έως και 30 ^{o}C. Αντίθετα, όσον αφορά στο *V. albo-atrum,* διαχειμάζει με τη μορφή σκούρου διαχειμάζοντος μυκηλίου που φέρει παχιά τοιχώματα, προκαλεί σημαντικές οικονομικές απώλειες σε μικρότερο αριθμό ξενιστών και η ανάπτυξη της ασθένειας ευνοείται στους 21 ^{o}C (η ασθένεια δεν εξελίσσεται στους 30 ^{o}C).

Το *V. dahliae* είναι περισσότερο διαδεδομένο σε παγκόσμια κλίμακα και προκαλεί σημαντικές οικονομικές απώλειες σε χώρες της εύκρατης, υποτροπική και τροπικής ζώνης (Schnathorst 1981). Πρόκειται για ένα ημι-βιοτροφικό παθογόνο που προσβάλει περισσότερους από 400 ξενιστές και προκαλεί οικονομικές απώλειες δισεκατομμυρίων δολαρίων ετησίως (Inderbitzin and Subbarao 2014). Το συγκεκριμένο είδος έχει ένα ευρύ φάσμα ξενιστών καθώς προσβάλει τόσο δικοτυλήδονα (κηπευτικές, ανθοκομικές και δενδρώδεις καλλιέργειες) όσο και μονοκοτυλήδονα φυτά (φυτά μεγάλης καλλιέργειας, αυτοφυή φυτά) (Inderbitzin et al., 2011; Ligoxigakis et al. 2002).

Στην χώρα μας, η ασθένεια της βερτισιλλίωσης οφείλεται αποκλειστικά στο *V. dahliae.* Σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα PDA, το παθογόνο σχηματίζει λευκό βαμβακώδες μυκήλιο το όποιο αποκτά σκούρο χρώμα εξαιτίας της παραγωγής μικροσκληρωτίων (**Εικόνα 8**). Από τις υφές του παθογόνου σχηματίζονται υαλώδεις ανορθωμένοι και πολυκύτταροι κονιδιοφόροι οι οποίοι διακλαδίζονται σχηματίζοντας φιαλίδια πάνω στα οποία παράγονται τα κονίδια (φιαλιδοσπόρια) (Inderbitzin et al.,

2011). Τα κονίδια είναι υαλώδη, μονοκύτταρα και ωοειδή με διαστάσεις 2.5-8.0 × 1.4-3.2 μm. Επιπλέον, σε αντίξοες συνθήκες ο μύκητας παράγει μικροσκληρώτια, σκουρόχρωμες, σφαιρικές έως ακανόνιστες μυκηλιακές κατασκευές διαστάσεων 25-200μm, οι οποίες παράγονται από διογκωμένες υφές (Τζάμος 2004). Τέλος, σχετικά με την ταξινόμηση, ο μύκητας *V. dahliae* ανήκει στο βασίλειο των μυκήτων, στο φύλο Ascomycota, στην κλάση Sordariomycetes και στην οικογένεια Plectosphaerellaceae (CABI.org).



Εικόνα 8. Μορφολογικά χαρακτηριστικά του μύκητα *V. dahliae*. **Α:** καλλιέργεια σε θρεπτικό υπόστρωμα PDA, **Β:** υφή, **Γ:** κονίδια σε αιματοκυτταρόμετρο και **Δ.** μικροσκληρώτιο του παθογόνου υπό μεγέθυνση μικροσκοπίου.

1.3.1 Συμπτωματολογία

Στις κηπευτικές καλλιέργειες η ασθένεια εκδηλώνεται με την εμφάνιση μαραμένων φύλλων ή φυλλαρίων τα οποία διατηρούν το χρώμα τους χωρίς να διατηρούν την σπαργή τους («φύλλο σημαία») (**Εικόνα 9**). Στο έλασμα των φύλλων αυτών παρατηρούνται μεσονεύριες χλωρωτικές περιοχές οι οποίες στη συνέχεια κιτρινίζουν, νεκρώνονται προκαλώντας τελικά την πτώση του φύλλου (Klosterman et al., 2009). Η ένταση των συμπτωμάτων εξαρτάται από την ευπάθεια του ξενιστή. Επιπλέον, τα φυτά μπορεί να εμφανίζουν επιναστία των φύλλων και νανισμό (Fradin

and Thomma 2006). Τα παραπάνω συμπτώματα είναι τυπικά για πολλές βιοτικές και αβιοτικές καταπονήσεις καθιστώντας δύσκολη τη διάγνωση της ασθένειας. Ένα χαρακτηριστικό αλλά μη παθογνωμονικό σύμπτωμα της ασθένειας αποτελεί ο καστανός μεταχρωματισμός των αγγείων του ξύλου έπειτα από εγκάρσια τομή του στελέχους (Klosterman et al., 2009).

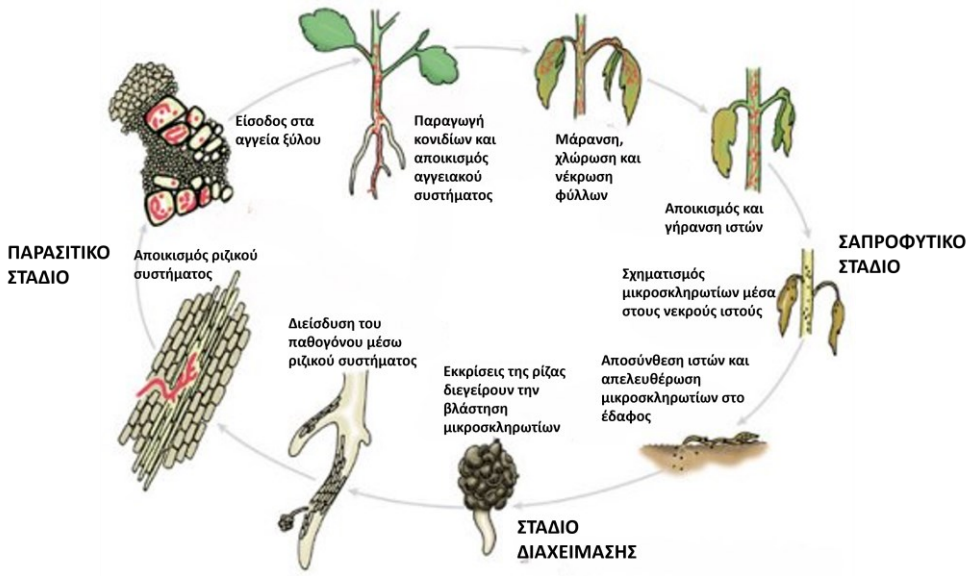


Εικόνα 9. Συμπτώματα της ασθένειας της βερτισιλλίωσης σε φυτά τομάτας. **Α:** μολυσμένη υπαίθρια καλλιέργεια, **Β:** "φύλλο σημαία", **Γ:** καστανός μεταχρωματισμός αγγείων του ξύλου και **Δ:** νεκρωτικές κηλίδες σε φύλλα τομάτας (Πηγή εικόνας Γ-Δ: https://content.ces.ncsu.edu/).

1.3.2 Βιολογικός κύκλος και επιδημιολογία

Η βερτισιλλίωση είναι μονοκυκλική ασθένεια. Ο βιολογικός κύκλος του μύκητα *V. dahliae* αποτελείται από τρεις φάσεις (**Εικόνα 10**). Πιο συγκεκριμένα, αποτελείται από τη φάση α) της επιβίωσης κατά την οποία ο μύκητας διαχειμάζει με την μορφή μικροσκληρωτίων στο έδαφος έως και για 14 χρόνια απουσία ξενιστών, β) την παρασιτική φάση κατά την οποία εισέρχεται στον ξενιστή, αποικίζει τα αγγεία του ξύλου προκαλώντας συμπτώματα και γ) τη σαπροφυτική φάση κατά την οποία το παθογόνο σχηματίζει μικροσκληρώτια εντός των φυτικών ιστών τα οποία απελευθερώνει στο έδαφος έπειτα από την αποσύνθεση του ξενιστή (Fradin and Thomma 2006). Τα βασικά στάδια της παθογένεσης είναι η βλάστηση των μικροσκληρωτίων, η διείσδυση των υφών στην επιδερμίδα της ρίζας, η εξάπλωση στην ενδοδερμίδα και ο αποικισμός των αγγείων του ξύλου (Zhao et al., 2014).

Όπως προαναφέρθηκε, ο μύκητας σε αντίξοες συνθήκες μπορεί να διαχειμάσει στο έδαφος απουσία ξενιστών με την μορφή μικροσκληρωτίων για έως και 14 χρόνια. Όταν τα μικροσκληρώτια βρεθούν κοντά στη ριζόσφαιρα ξενιστών, υπό ευνοϊκές συνθήκες, διεγείρονται από εκκρίσεις της ρίζας οι οποίες προκαλούν την βλάστηση τους. Οι υφές που προκύπτουν διεισδύουν μέσω μιας εξειδικευμένης δομής που ονομάζεται υποπόδιο (hypophodium) εντός του ριζικού συστήματος διασχίζοντας την ενδοδερμίδα (Kowalska 2021; Short et al., 2015). Στην συνέχεια, το παθογόνο παράγει κονίδια τα οποία μεταφέρονται με την ανοδική κίνηση του νερού (μέσω διαπνοής) στα υπέργεια μέρη αποικίζοντας με αυτό τον τρόπο το αγγειακό σύστημα (Fradin and Thomma 2006). Επειδή, το αγγειακό σύστημα είναι φτωχό σε θρεπτικά συστατικά, το παθογόνο αποικοδομεί με τη χρήση ενζύμων τα κυτταρικά τοιχώματα των αγγειακών κυττάρων προκειμένου να προσλάβει τα απαραίτητα θρεπτικά (Chen et al., 2016). Η μερική αποικοδόμηση των κυτταρικών τοιχωμάτων ενεργοποιεί την άμυνα του φυτού το οποίο παράγει υλικά για την τύλωση των αγγείων και άλλα βιο-μακρομόρια όπως ρητίνες και κόμμεα που λειτουργούν ως φυσικό φράγμα της εξάπλωσης του παθογόνου. Σε αυτό το στάδιο γίνονται ορατά τα συμπτώματα της ασθένειας (Yadeta and Thomma 2013). Καθώς ο ξενιστής νεκρώνεται, εντός των φυτικών ιστών σχηματίζονται τα μικροσκληρώτια τα οποία θα απελευθερωθούν στο έδαφος έπειτα από την αποσύνθεση του ξενιστή.



Εικόνα 10. Βιολογικός κύκλος του μύκητα *V. dahliae* (Πηγή εικόνας:https://www.apsnet.org/).

Τα παθογόνα παράγουν πληθώρα πρωτεϊνών οι οποίες διαδραματίζουν

σημαντικό ρόλο στην παθογένεση. Το *V. dahliae* παράγει περισσότερες από 700 πρωτεΐνες που συμβάλουν στην παθογένεση, του μικροβιώματος και του αμυντικού συστήματος του ξενιστή καθώς και στον ανταγωνισμό σε θρεπτικά (Chen et al., 2018; Zhang et al., 2022). Για να εγκατασταθεί το παθογόνο εντός των αγγείων του ξύλου θα πρέπει να περάσει το φράγμα των κυτταρικών τοιχωμάτων της ρίζας μέσω της παραγωγής ενζύμων CWDEs όπως είναι οι ενδογλυκανάσες VdEG1 και VdEG3 (Kubicek et al., 2014; Wang et al., 2021). Με την είσοδο του παθογόνου στα κύτταρα του ξενιστή, ενεργοποιούνται αμυντικές αποκρίσεις που οδηγούν στη παραγωγή ενεργών ριζών οξυγόνου. Το παθογόνο παράγει πρωτεΐνες που δεσμεύουν τις ROS (π.χ. δισμουτάση υπεροξειδίου -SOD) και τις εξουδετερώνουν, επιτρέποντας την επιτυχή εγκατάσταση και τον πολλαπλασιασμό (Chen et al., 2016; Tian et al., 2021). Για την επιτυχή μόλυνση το παθογόνο παράγει, στα πρώιμα στάδια της μόλυνσης, σειρά πρωτεϊνών-τελεστών που αναστέλλουν τις αμυντικές αποκρίσεις. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι το ένζυμο ισοχορισματική συνθάση (Vdlsci) το οποίο αδρανοποιεί το σαλικυλικό οξύ παρεμποδίζοντας με αυτό τον τρόπο την επίκτητη διασυστηματική αντοχή (SAR) (Liu et al., 2014). Τέλος, το παθογόνο παράγει σειρά πρωτεϊνών οι οποίες αφενός αποικοδομούν τα κυτταρικά τοιχώματα για την παραγωγή σακχάρων που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη διατροφή του μύκητα εντός των αγγείων του ξύλου και αφετέρου έχουν αντιμικροβιακή δράση επηρεάζοντας τη μικροχλωρίδα του ξενιστή προκειμένου να δημιουργηθούν κενές θέσεις εγκατάστασής του (π.χ. VdAve1 & VdAMP2) (Glass et al., 2017; Snelders et al., 2020).

1.3.3 Αντιμετώπιση

Η αντιμετώπιση της ασθένειας της βερτισιλλίωσης είναι ιδιαίτερα δύσκολη καθώς δεν υπάρχουν διαθέσιμα χημικά σκευάσματα. Χημικές ενώσεις που επιτρέπονται σε ορισμένες ευρωπαϊκές χώρες είναι το propamocarb, dazomet και metam (Kowalska 2021). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον στη διαχείριση της ασθένειας παρουσιάζουν τα προϊόντα υπεροξειδίου του υδρογόνου τα οποία αφενός έχουν ευρύ φάσμα δράσης και αφετέρου δεν σχηματίζουν τοξικά παραπροϊόντα. Η εφαρμογή προϊόντων υπεροξειδίου του υδρογόνου ήταν ικανή να μειώσει το διαθέσιμο μόλυσμα (κονίδια και μικροσκληρώτια) και να παρεμποδίσει την εμφάνιση συμπτωμάτων της ασθένειας στην ελιά (Gomez-Galvez et al., 2020). Ωστόσο, η έλλειψη χημικών σκευασμάτων στις περισσότερες

χώρες, η επιδημιολογία του παθογόνου σε συνδυασμό με την ανθεκτική δομή διαχείμασης και το μεγάλο εύρος ξενιστών καθιστούν τη διαχείριση της ασθένειας εξαιρετικά δύσκολη.

Η διαχείριση της ασθένειας βασίζεται κυρίως σε διάφορα καλλιεργητικά μέτρα που έχουν ως κύριο στόχο αφενός τη μείωση του μολύσματος και αφετέρου την παρεμπόδιση της διασποράς του. Τέτοια καλλιεργητικά μέτρα είναι η απομάκρυνση και η αφαίρεση προσβεβλημένων φυτών και υπολειμμάτων, η χρήση υγιούς πολλαπλασιαστικού υλικού, η χρήση ανθεκτικών ποικιλιών καθώς και η απομάκρυνση αυτοφυών φυτών που αποτελούν αποθήκες μολύσματος. Γενικότερα, στα καλλιεργητικά μέτρα κατατάσσονται όλες οι γεωργικές πρακτικές που βελτιώνουν την υγεία των φυτών (π.χ. λίπανση, σύστημα άρδευσης κ.α.). Η προσθήκη κομπόστ στο έδαφος είναι μια τεχνική διαχείρισης καθώς η αυξημένη ποσότητα οργανικής ουσίας που προσδίδει αυξάνει παράλληλα τη μικροβιακή δραστηριότητα η οποία είναι ικανή να καταστείλει την εξέλιξη της ασθένειας (Kowalska 2021; Markakis et al., 2016). Ωστόσο, έχει αναφερθεί ότι τα μικροσκληρώτια διατηρούνται ενεργά διερχόμενα από το πεπτικό σύστημα προβάτων που έχουν διατραφεί με μολυσμένη φυτική ύλη με αποτέλεσμα να ενσωματώνονται μέσω κοπράνων στα κόμποστ (Markakis et al., 2014). Μια αποτελεσματική μέθοδος διαχείρισης της ασθένειας είναι η ηλιοαπολύμανση. Η ηλιοαπολύμανση λαμβάνει χώρα κατά τους καλοκαιρινούς μήνες όπου πραγματοποιείται ερμητική κάλυψη του εδάφους με διαφανές πολυαιθυλενίου αφού προηγούμενος το έδαφος έχει ποτισθεί μέχρι κορεσμού και φρεζαριστεί. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της θερμοκρασίας του εδάφους έως και τους 52 ^{o}C (Alabouvette et al., 2006). Απολύμανση του εδάφους μπορεί να πραγματοποιηθεί και με άλλες μεθόδους όπως είναι ο υποκαπνισμός ή και ο βιο-υποκαπνισμός αλλά και η θέρμανση του εδάφους με ατμό (Kowalska 2021). Ο βιοκαπνισμός αποτελεί μια εναλλακτική λύση κατά την οποία διάφορα φυτά κυρίως της οικογένειας Brassicaceae απελευθερώνουν στο έδαφος βιολογικά ενεργές ενώσεις (π.χ. ισοθειοκυανικά) κατά την αποσύνθεση τους (Neubauer et al., 2015). Οι ενώσεις αυτές έχουν αντιμικροβιακή δράση και δρουν ως απολυμαντικό.

Παρ' όλα αυτά, τα τελευταία χρόνια, το ενδιαφέρον της επιστημονική κοινότητας έχει στραφεί στην βιολογική αντιμετώπιση της ασθένειας με τη χρήση βιολογικών παραγόντων (Abada et al., 2018; Lopez-Moral et al., 2021). Υπάρχουν

πολλές μελέτες αξιολόγησης της κατασταλτικής δράσεις διαφόρων βιολογικών παραγόντων έναντι της βερτισιλλίωσης. Τα πιο συνηθισμένα γένη βακτηρίων που αξιολογούνται έναντι του *V. dahliae* είναι το *Bacillus* spp., και το *Psedomonas* spp., ενώ τα πιο συνηθισμένα γένη μυκήτων είναι το *Trichoderma* spp., μη παθογόνα στελέχη *Fusarium* και το *Talaromyces flacus* (Kowalska 2021).

1.4 Βιολογική αντιμετώπιση

Η γεωργική παραγωγή ταλανίζεται από διάφορους βιοτικούς και αβιοτικούς παράγοντες οι οποίοι προκαλούν τόσο μείωση της παραγωγής όσο και υποβάθμιση της ποιότητας των παραγόμενων τροφίμων. Προκειμένου να διασφαλιστεί η ετήσια παραγωγή, οι γεωργοί εφαρμόζουν μεγάλες ποσότητες αγροχημικών. Ωστόσο, τα τελευταία χρόνια η Ευρωπαϊκή Ένωση έχει θεσπίσει περιορισμούς για τη χρήση των αγροχημικών καθώς και απόσυρση πολλών διαθέσιμων χημικών σκευασμάτων. Επομένως, είναι επιτακτική η ανάγκη εύρεσης εναλλακτικών μεθόδων διαχείρισης των βιοτικών και των αβιοτικών καταπονήσεων (Pal and McSpadden 2006). Στην φυτοπαθολογία, ο όρος βιολογική αντιμετώπιση αναφέρεται στη χρήση ζωντανών μικροοργανισμών για την καταστολή φυτοπαθογόνων που προκαλούν ασθένεια. Ένας εκτεταμένος ορισμός της βιολογικής αντιμετώπισης αφορά στη χρήση φυσικών ή τροποποιημένων μικροοργανισμών, γονιδίων ή προϊόντων γονιδίων για τον αποκλεισμό ή την παρεμπόδιση της επίδρασης των φυτοπαθογόνων, με σκοπό την αντιμετώπιση των ασθενειών που προκαλούν (Cook, 1985) Οι μικροοργανισμοί που χρησιμοποιούνται για τη καταστολή των ασθενειών ονομάζονται βιολογικοί παράγοντες-BCA (Biological Control Agents) (Kohl et al., 2019). Βακτηριακά γένη που έχουν μελετηθεί εκτενώς έναντι σημαντικών ασθενειών είναι τα *Psedomonas*, *Streptomyces*, *Bacillus*, *Xanthomonas*, *Rhizobium*, *Agrobacterium* και *Erwinia* sp.

Οι βιολογικοί παράγοντες καταστέλλουν την ανάπτυξη παθογόνων με διάφορους μηχανισμούς (Bonaterra et al., 2022). Οι μηχανισμοί δράσης διακρίνονται σε δύο κατηγορίες: α) τους έμμεσους (επαγωγή της άμυνα και ανταγωνισμός) και τους άμεσους (παραγωγή αντιβιοτικών και παρασιτισμός). Όσον αφορά στην επαγωγή της άμυνας, τα φυτά διαθέτουν πληθώρα αμυντικών μηχανισμών έναντι των παθογόνων. Οι επαγόμενοι αμυντικοί μηχανισμοί ενεργοποιούνται από ερεθίσματα (PAMPs) τα όποια αναγνωρίζονται από εξειδικευμένους υποδοχείς. Η επαγωγή της άμυνα έχει δύο

μονοπάτια, την Επίκτητη Διασυστηματική Αντοχή (Systemic Acquired Resistance – SAR) η οποία ενεργοποιείται έπειτα από ερέθισμα που προκαλείται από παθογόνα και οδηγεί στη παραγωγή σαλικυλικού οξέος, και την Επαγόμενη Διασυστηματική Αντοχή (Induced Systemic Resistance – ISR) η οποία ενεργοποιείται έπειτα από ερέθισμα από ένα ωφέλιμο μικροοργανισμό και οδηγεί στη παραγωγή ιασμονικού οξέος (Conrath et al., 2015). Προκειμένου να πραγματοποιηθεί μόλυνση, τα παθογόνα σε κάποια στάδια του βιολογικού τους κύκλου εξαρτώνται από εξωγενείς πηγές θρεπτικών συστατικών. Η εξάρτηση αυτή καθιστά τα μη βιοτροφικά παθογόνα ευάλωτα στον ανταγωνισμό. Οι βιολογικοί παράγοντες που δρουν μέσω ανταγωνισμού για χώρο και θρεπτικά πρέπει να αναπτύσσονται και να καταναλώνουν τα θρεπτικά σε σύντομο χρονικό διάστημα. Εκτός από σάκχαρα και άζωτο, πολλοί μικροοργανισμοί παράγουν σιδηροφόρα, ενώσεις χαμηλού μοριακού βάρους που δεσμεύουν το σίδηρο. Ο ανταγωνισμός μπορεί να περιορίσει το παθογόνο αλλά δεν το θανατώνει (Kohl et al., 2019). Στον παρασιτισμό, ένας μικροοργανισμός (παράσιτο) προσλαμβάνει θρεπτικά συστατικά από έναν άλλο μικροοργανισμό (υποπαράσιτο). Εάν ο ξενιστής είναι παράσιτο τότε ο μηχανισμός ονομάζεται υπερπαρασιτισμός. Στην περίπτωση αυτή το παράσιτο αναγνωρίζει τον ξενιστή, εκκρίνει ένζυμα CWDEs για λύση των κυτταρικών τοιχωμάτων του και σχηματίζει μια παρασιτική υφή η οποία εισέρχεται στα κύτταρα του ξενιστή. Τέλος, οι μικροοργανισμοί μπορούν να παράγουν αντιβιοτικά προκειμένου να καταστείλουν άλλους μικροοργανισμούς. Τα αντιβιοτικά είναι δευτερογενείς μεταβολίτες, χαμηλού μοριακού βάρους ενώσεις, οι οποίες παράγονται από έναν μικροοργανισμό σε μικρές ποσότητες οι οποίες είναι ικανές να επηρεάσουν την ανάπτυξη και τις μεταβολικές διαδικασίες ενός άλλου μικροοργανισμού (Thomashow et al., 1997).

Τα τελευταία χρόνια γίνεται χρήση μεγάλων ποσοτήτων νερού για τις ανάγκες άρδευσης των γεωργικών καλλιεργειών γεγονός που δημιουργεί σημαντικά προβλήματα. Ένα από αυτά τα προβλήματα είναι η υφαλμύριση των εδαφών η οποία έχει ως απόρροια την υποβάθμιση των εδαφών και τη μείωση των καλλιεργήσιμων εκτάσεων. Προηγούμενες μελέτες αναφέρουν ότι η καταπόνηση των φυτών από την αλατότητα, αυξάνει την ευαισθησία τους στα φυτοπαθογόνα (Gao et al., 2021). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα αλόφυτα, τα οποία είναι φυτά που έχουν αναπτύξει διάφορες στρατηγικές για να αντιστέκονται σε διάφορες βιοτικές και αβιοτικές καταπονήσεις όπως είναι η αλατότητα. Η αντοχή αυτή οφείλεται σε

διάφορους παράγοντες ένας από τους οποίους είναι το ενδοφυτικό μικροβίωμα (Santoyo et al., 2016). Τα ενδόφυτα δρουν με διάφορους μηχανισμούς. Ειδικότερα, μπορούν να παράγουν ωσμοφυτοπροστατευτικές ενώσεις, προωθούν την πρόσληψη θρεπτικών συστατικών και ρυθμίζουν τα επίπεδα φυτορμονών. Ωστόσο εκτός από την αλατότητα, ενίοτε δύνανται να προσδίδουν αντοχή και σε βιοτικές καταπονήσεις (Christakis et al., 2021). Τα ενδόφυτα, λόγω της θέσης τους εντός του φυτικού ιστού πλεονεκτούν έναντι των φυτοπαθογόνων καθώς δέχονται λιγότερες περιβαλλοντικές πιέσεις. Το χαρακτηριστικό τους αυτό τα έχει τοποθετήσει στο επίκεντρο της έρευνας για τη δυνατότητά τους να μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως βιολογικοί παράγοντες έναντι σημαντικών φυτοπαθογόνων. Τόσο ερευνητικά όσο και εμπορικά, ιδιαίτερη έμφαση έχει δοθεί στα βακτηριακά γένη *Bacillus* sp*, Streptomyces* sp*, Pseudomonas* sp και *Agrobacterium* sp. Πολλές μελέτες των τελευταίων ετών αναφέρουν ότι τα ενδοφυτικά βακτήρια που απομονώνονται από αλόφυτα θα μπορούσαν να αποτελέσουν ένα πολύτιμο και ταυτόχρονα φιλικό προς το περιβάλλον εργαλείο διαχείρισης των ασθενειών. Γι' αυτό υπάρχει αυξημένο ενδιαφέρον για τη διερεύνηση και της αξιοποίηση τους (Alhaddad et al., 2024; Bibi et al., 2018)

Η ανάπτυξη ενός εμπορικού σκευάσματος που έχει ως βάση βιολογικούς παράγοντες είναι μια εξαιρετικά δύσκολη, χρονοβόρα διαδικασία που απαιτεί υψηλό κόστος. Σε αρχικό στάδιο, οι ωφέλιμοι μικροοργανισμοί θα πρέπει να απομονωθούν από τα φυσικά τους περιβάλλοντα (φυλλόσφαιρα, ριζόσφαιρα) και να επιλεχθούν τα πιο αποτελεσματικά στελέχη με διάφορες μεθόδους διαλογής. Στην συνέχεια, ακολουθούν *in-vitro*, *in-planta* βιοδοκιμές καθώς και πειράματα αγρού προκειμένου να αξιολογηθεί η αποτελεσματικότητα τους έναντι κάποιου παθογόνου. Ταυτόχρονα, είναι αναγκαίος ο χαρακτηρισμός και η ταυτοποίησή τους με μοριακές μεθόδους. Επιπλέον, θα πρέπει να διερευνηθούν τρόποι μαζικής παραγωγής, η σύνθεση καθώς και οι συνθήκες εγκατάστασης του βιολογικού παράγοντα. Τέλος, για την εφαρμογή σε συνθήκες αγρού απαιτούνται τοξικολογικές και περιβαλλοντικές μελέτες προκειμένου να αξιολογηθεί η επίδραση του εκάστοτε στελέχους στο αγροοικοσύστημα (Bonaterra et al., 2022).

1.5 Ο Σύγχρονος ρόλος της Φασματοσκοπίας στην έγκαιρη ανίχνευση ασθενειών

Η έγκαιρη ανίχνευση των ασθενειών των φυτών αποτελεί μια από τις τρέχουσες προκλήσεις της επιστημονικής κοινότητας. Επί του παρόντος, οι γεωπόνοι και οι ασχολούμενοι με τη γεωργία διαχειρίζονται τις διάφορες ασθένειες έπειτα από την εκδήλωση των συμπτωμάτων, όταν η ασθένεια βρίσκεται ήδη σε αρκετά προχωρημένο στάδιο. Επιπλέον, τα Φυτοπαθολογικά εργαστήρια χρησιμοποιούν παραδοσιακές μεθόδους διάγνωσης των ασθενειών όπως είναι η μακροσκοπική και η μικροσκοπική παρατήρηση, οι συμβατικές μοριακές τεχνικές καθώς και οι μικροβιολογικές τεχνικές. Ωστόσο, η ανίχνευση των ασθενειών σε πρώιμο στάδιο θα παρείχε την ευκαιρία για έγκαιρη-στοχευμένη επέμβαση με χημικές ενώσεις (κατά συνέπεια μείωση της χρησιμοποιούμενης ποσότητας) και για λήψη των απαραίτητων προληπτικών και καλλιεργητικών μέτρων για τη παρεμπόδιση της περαιτέρω εξάπλωσης. Ως εκ τούτου, υπάρχει ανάγκη αντικατάστασης των παραδοσιακών μεθόδων με νέες, αυτοματοποιημένες, ακριβείς και ευαίσθητες μεθοδολογίες διάγνωσης (Lowe et al., 2017).

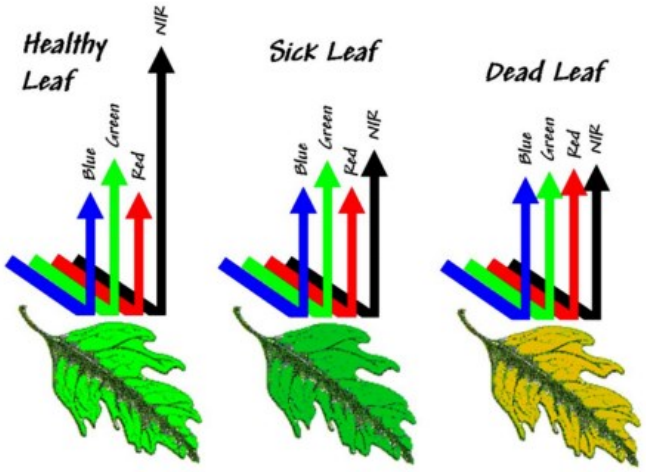
Μια τέτοια προσέγγιση είναι η λήψη και η αξιοποίηση των φασματικών δεδομένων. Οι φασματικές κάμερες παρέχουν πληροφορίες που βασίζονται στην αλληλεπίδραση του στόχου με την ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία (**Εικόνα 11**). Τα φυτά αλληλοεπιδρούν με το φως με τρεις τρόπους. Το φως μπορεί να μεταδίδεται μέσω των φύλλων, να απορροφάται από χημικές ενώσεις και συστατικά του φυτού (π.χ. χρωστικές, σάκχαρα, αμινοξέα, νερό κ.α.) και να ανακλάται από την φυτική επιφάνεια ή και από εσωτερικές δομές των φύλλων (π.χ. κηροί και κυτταρικό τοίχωμα αντίστοιχα) (Wan et al., 2022). Κάθε μεμονωμένος στόχος αλληλοεπιδρά με έναν μοναδικό τρόπο με την ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία. Ο συνδυασμός της απορροφούμενης ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας στα διάφορα μήκη κύματος ονομάζεται φασματική υπογραφή η οποία μπορεί να συμβάλλει στη διάκριση των επιμέρους στόχων (Φουντάς και Γέμτος 2015).

Δεδομένα από επιλεγμένα μήκη κύματος απ' όλη τη φασματική πληροφορία μπορούν να συνδυαστούν και να δώσουν μια τιμή η οποία να σχετίζεται με τις ιδιότητες ή και τα χαρακτηριστικά της βλάστησης. Οι τιμές αυτές είναι γνωστές ως «δείκτες βλάστησης» (Vegetation Index) (Φουντάς και Γέμτος 2015). Οι δείκτες βλάστησης

αποτελούν μια αριθμητική αναπαράσταση της σχέσης μεταξύ των διαφορετικών μηκών κύματος που ανακλώνται από την επιφάνεια του φυτού. Χρησιμοποιούνται για την παρακολούθηση διάφορων φυσιολογικών και μορφολογικών ιδιοτήτων των φυτών όπως είναι η περιεκτικότητα σε νερό, η θρεπτική κατάσταση, η κάλυψη της βιομάζας, η περιεκτικότητα του φυτού σε χρωστικές (χλωροφύλλη, καροτενοειδή και ανθοκυανίνες) κ.α. Επιπλέον, χρησιμοποιούνται για την παρακολούθηση των ασθενών φυτικών ιστών. Ο πιο κοινός δείκτης παρακολούθησης ασθενών ιστών είναι ο NDVI (Normalized Difference Vegetation Index) (Neupane et al., 2021; Wan et al., 2022). Τα τελευταία χρόνια έχει δημιουργηθεί πλήθος δεικτών βλάστησης οι οποίοι μπορούν να συνδυαστούν μεταξύ τους δίνοντας πληροφορίες για συγκεκριμένες ιδιότητες των φυτών (NV5 GEOSPATIAL 2024).

Η υπερφασματική τηλεπισκόπιση είναι γνωστή ως τηλεπισκόπιση υψηλής ανάλυσης. Ανάλυση 10^{-1}λ ορίζεται ως πολυφασματική ενώ 10^{-2}λ υπερφασματική. Ειδικότερα, οι υπερφασματικοί αισθητήρες οι οποίοι έχουν αναπτυχθεί παρέχουν φασματικές πληροφορίες με ταυτόχρονη χωρική ανάλυση του υπό εξέταση στόχου. Εκτός από το χρωματικό πρότυπο ερυθρού-πράσινου-κυανού (Red Green Blue – RGB), υπάρχουν αισθητήρες οι οποίοι μπορούν να καλύψουν το ορατό τμήμα της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας (400-700nm), ζώνη στο κοντινό υπέρυθρο (700-1000nm) αλλά και ζώνη υπέρυθρων βραχέων κυμάτων (1000-250nm) (Wan et al., 2022).

Η σχέση ξενιστή-παθογόνου συνοδεύεται από πολύπλοκες διεργασίες. Από αυτή τη σχέση προκαλούνται αλλαγές στην ανάκλαση της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας από το φυτό εξαιτίας της παθογένεσης. Με την εξέλιξη της εκάστοτε ασθένειας προκαλούνται αλλοιώσεις στα χημικά συστατικά των φυτικών οργάνων (π.χ. χλώρωση, νέκρωση, εμφάνιση σημείων των παθογόνων κ.α.). Κάθε αλληλεπίδραση ξενιστή-παθογόνου ακολουθεί συγκεκριμένες χωρικές και χρονικές μεταβολές (μοτίβα) που επηρεάζουν τις φασματικές ιδιότητες του ξενιστή σε διάφορα μήκη κύματος (Wan et al., 2022)



Εικόνα 11. Αλληλεπίδραση υγιούς, συμπτωματικού και νεκρού φύλλου με την ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία.

1.6 Σκοποί της παρούσας Εργασίας

Σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής είναι η αξιολόγηση της φυτοπροστατευτικής ικανότητας ενδοφυτικών βακτηριακών στελεχών, απομονωμένων από αλόφυτα της Κρήτης, έναντι των φυτοπαθογόνων (ωο)μυκήτων *B. cinerea, P. infestans* και *V. dahliae*.

Ειδικότερα, πραγματοποιήθηκε μια προκαταρκτική *in-vitro* αξιολόγηση προκειμένου από μία συλλογή 173 βακτηριακών στελεχών να επιλεχθούν τα 20 πιο αποτελεσματικά βακτηριακά στελέχη για καθένα από τα προαναφερθέντα παθογόνα. Έπειτα, πραγματοποιήθηκε διεξοδικότερη *in-vitro* αξιολόγηση προκειμένου να διερευνηθεί η επίδραση των επιλεγμένων βακτηριακών στελεχών σε διάφορες μυκητολογικές παραμέτρους (μυκηλιακή ανάπτυξη, πάχος υφών, κονιδιοποίηση ή/και σχηματισμός μυκηλιακών κατασκευών) των προαναφερθέντων παθογόνων. Τα πιο αποτελεσματικά βακτηριακά στελέχη αξιολογήθηκαν σε *in-planta* ή/και *in-vivo* βιοδοκιμές προκειμένου να διερευνηθεί η φυτοπροστατευτική τους ικανότητα έναντι των παθογόνων. Η φυτοπροστατευτική ικανότητα των στελεχών αξιολογήθηκε με εκτίμηση διαφόρων παραμέτρων ασθένειας στα φυτά (ένταση ασθένειας, σοβαρότητα ασθένειας, σχετική AUDPC, συχνότητα επαναπομόνωσης παθογόνου, ή/και ποσοτικοποίηση παθογόνου με Real Time PCR), καθώς και με εκτίμηση διαφόρων παραμέτρων φυτικής ανάπτυξης (αριθμός φύλλων, ύψος, νωπό βάρος φυτών). Επιπροσθέτως, λήφθηκαν φασματικά δεδομένα με την υπερφασματική κάμερα

PhenoCheck τα οποία αναλύθηκαν ως μια επιπρόσθετη παράμετρος για την εκάστοτε ασθένεια. Από τα δεδομένα εκτιμήθηκαν ορισμένοι δείκτες βλάστησης προκειμένου να συγκριθούν ή/και να επιβεβαιωθούν τα αποτελέσματα των *in-planta* και των *in-vivo* βιοδοκιμών.

2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Στερεά και υγρά θρεπτικά υποστρώματα καλλιέργειας μικροοργανισμών

2.1.1 Στερεό θρεπτικό υπόστρωμα πατάτας-δεξτρόζης-άγαρ (Potato-Dextrose-Agar, PDA)

Για την παρασκευή 1000 ml στερεού θρεπτικού υποστρώματος πατάτας-δεξτροζης-άγαρ (Potato-Dextrose-Agar, PDA) ζυγίστηκαν 200 gr αποφλοιωμένης και πλυμένης πατάτας η οποία τεμαχίστηκε σε μικρούς κύβους. Στη συνέχεια, η πατάτα μεταφέρθηκε σε κωνική φιάλη όγκου 2 λίτρων και προστέθηκε τριπλάσια ποσότητα απεσταγμένου νερού (~600ml). Η κωνική φιάλη καλύφθηκε με αλουμινόχαρτο και τοποθετήθηκε σε χύτρα με νερό όπου παρέμεινε για 45 λεπτά μετά την έναρξη του βρασμού και αναδεύονταν περιοδικά. Με το πέρας των 45 λεπτών, το περιεχόμενο της κωνικής διηθήθηκε με διπλό τούλι και ο ζωμός πατάτας μεταφέρθηκε σε ογκομετρικό κύλινδρο. Έπειτα, προστέθηκε ποσότητα απεσταγμένου νερού μέχρις ότου ο τελικός όγκος του ζωμού να φθάσει τα 1000 ml. Σε μια δεύτερη κωνική φιάλη 2 λίτρων προστέθηκαν 20 gr D- Glycose και 20 gr άγαρ. Στη συνέχεια το περιεχόμενο του ογκομετρικού κυλίνδρου μεταφέρθηκε στην κωνική φιάλη που περιείχε τη D- Glycose και το άγαρ και ακολούθησε έντονη ανάδευση έως ότου τα τελευταία να διαλυθούν πλήρως. Έπειτα το πώμα της κωνικής καλύφθηκε με βαμβάκι και αλουμινόχαρτο και ακολούθησε αποστείρωση στους 121 ºC, σε 1,2 atm για 30 λεπτά. Με το πέρας των 30 λεπτών, η φιάλη μεταφέρθηκε σε θάλαμο αναστρεφόμενης νηματικής ροής (Laminar Flow Cabinet) και το περιεχόμενο της μοιράστηκε σε τρυβλία Petri διαμέτρου 8,5 cm υπό ασηπτικές συνθήκες. Αφού στερεοποιήθηκε το υλικό, τα τρυβλία τοποθετήθηκαν σε ψυγείο στους 4 ºC έως ότου χρησιμοποιηθούν.

2.1.2 Οξινισμένο στερεό θρεπτικό υπόστρωμα πατάτας-δεξτρόζης-άγαρ (Acidified Potato-Dextrose-Agar, APDA)

Για τη παρασκευή 1 λίτρου APDA διενεργήθηκε ακριβώς η ίδια διαδικασία με

το PDA, όπως αυτή περιγράφεται στην ενότητα 2.2.1. Η μόνη διαφορά ήταν η προσθήκη 60 σταγόνων γαλακτικού οξέος 10% ανά 500 ml PDA, πριν το υλικό επιστρωθεί στα τρυβλία Petri.

2.1.3 Υγρό θρεπτικό υπόστρωμα πατάτας-δεξτρόζης (Potato-Dextrose-Broth, PDB)

Για την παρασκευή 1 λίτρου PDB ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία που περιγράφεται στο κεφάλαιο 2.2.1. Για το συγκεκριμένο θρεπτικό υπόστρωμα δεν χρησιμοποιήθηκε άγαρ. Ο ζωμός της πατάτας τοποθετήθηκε σε κωνικές που περιείχαν 20 gr D-glucose. Το στόμιο των κωνικών καλύφθηκε με βαμβάκι και αλουμινόχαρτο και ακολούθησε αποστείρωση στους 121 ºC, σε 1,2 atm για 30 λεπτά. Με το πέρας της αποστείρωσης, οι κωνικές τοποθετήθηκαν σε ψυγείο στους 4ºC μέχρι να εμβολιαστούν με το παθογόνο.

2.1.4 Υγρό θρεπτικό υπόστρωμα τριπτικασεΐνης-σόγιας (Trypticasein-Soy-Broth, TSB)

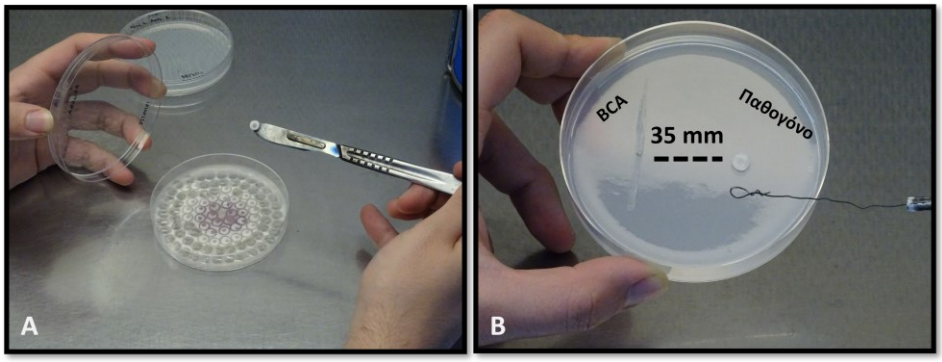
Για την παρασκευή 1 λίτρου υγρού θρεπτικού υποστρώματος τριπτικασεΐνης-σόγιας (Tripticasein Soy Broth, TSB Laboratorios Conda, S.A.), σε 1 λίτρο απεσταγμένου νερού διαλύθηκαν 30 gr εμπορικής σκόνης βάσει των οδηγιών της ετικέτας. Τέλος, ακολούθησε αποστείρωση στους 121 ºC, σε 1.2 atm για 15 λεπτά. Με το πέρας των 15 λεπτών, οι κωνικές τοποθετήθηκαν σε ψυγείου στους 4 ºC.

2.2 In-vitro βιοδοκιμές

2.2.1 Δοκιμές αντιπαραβολής

Οι **δοκιμές αντιπαραβολής** πραγματοποιήθηκαν προκειμένου να διερευνηθεί η παρεμποδιστική δράση των δυνητικών βιολογικών παραγόντων όταν αυτοί βρίσκονται σε άμεση αλληλεπίδραση με το εκάστοτε παθογόνο (Lahlali et al., 2007). Στις βιοδοκιμές αυτές το παθογόνο συγκαλλιεργήθηκε μαζί με τον υπό εξέταση βιολογικό παράγοντα στο ίδιο τρυβλίο που περιείχε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα PDA. Πιο συγκεκριμένα, δισκία **διαμέτρου 5 mm** φρέσκιας καλλιέργειας του εκάστοτε παθογόνου, εμβολιάστηκαν σε νέα τρυβλία με θρεπτικό υπόστρωμα PDA με τρόπο ώστε το δισκίο να απέχει 25 mm από το τοίχωμα του τρυβλίου. Στην συνέχεια, ο υπό

εξέταση βιολογικός παράγοντας εμβολιάστηκε με την μέθοδο της **γραμμικής διασποράς** (Streaking) με τη χρήση μικροβιολογικού βρόχου, χαράσσοντας μια γραμμή στην απέναντι πλευρά του τρυβλίου από την οποία είχε εμβολιαστεί το παθογόνο. Τόσο ο εμβολιασμός του παθογόνου όσο και ο εμβολιασμός του δυνητικού βιολογικού παράγοντα έγινε έτσι ώστε τα εμβόλια των δύο μικροοργανισμών **να απέχουν μεταξύ τους 35 mm** (Christakis et al., 2021) (**Εικόνα 12**). Αντίστοιχα, για τα τρυβλία του μάρτυρα, αντί του βακτηριακού στελέχους εμβολιάστηκαν δισκία αποστειρωμένου PDA. Τέλος, τα τρυβλία τοποθετήθηκαν σε επωαστικό θάλαμο στους 24 ºC και σε συνθήκες σκότους. Δοκιμές αντιπαραβολής πραγματοποιήθηκαν τόσο για τη **προκαταρκτική** όσο και για τη **διεξοδική *in-vitro* αξιολόγηση**. Η παραπάνω διαδικασία πραγματοποιήθηκε σε θάλαμο αναστρεφόμενης νηματικής ροής υπό ασηπτικές συνθήκες.

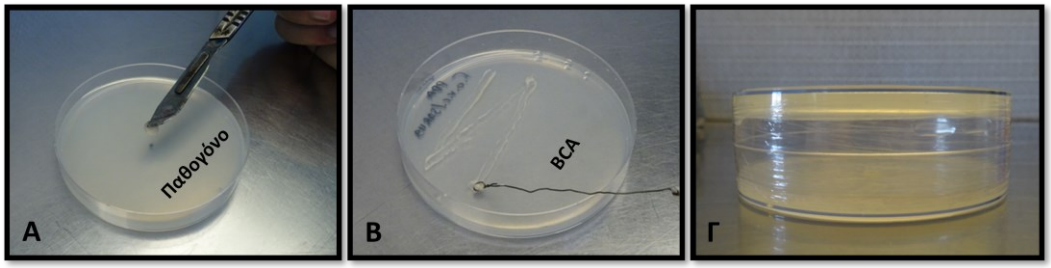


Εικόνα 12. Διαδικασία δοκιμών αντιπαραβολής: **A.** απόσπαση δισκίου φρέσκιας καλλιέργειας και **B.** εμβολιασμός παθογόνου και βιολογικού παράγοντα στο ίδιο τρυβλίο ώστε να απέχουν μεταξύ τους 35 mm.

2.2.2 Δοκιμές πτητικών

Οι **δοκιμές πτητικών** πραγματοποιήθηκαν προκειμένου να διερευνηθεί εάν οι πτητικές ενώσεις που μπορεί να εκλύουν οι υπό αξιολόγηση βιολογικοί παράγοντες επηρεάζουν την ανάπτυξη των φυτοπαθογόνων. Στις δοκιμές αυτές, ο παθογόνος μικροοργανισμός και το βακτηριακό στέλεχος εμβολιάζονται με τρόπο τέτοιο ώστε να μοιράζονται τον ίδιο εναέριο χώρο αλλά χωρίς να έρχονται σε άμεση επαφή (Chaurasia et al., 2005). Πιο συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν δύο τρυβλία με θρεπτικό υπόστρωμα PDA όπου στο ένα εμβολιάστηκε ο παθογόνο μικροοργανισμός (**δισκίο διαμέτρου 5 mm** φρέσκιας καλλιέργειας του εκάστοτε παθογόνου) (**Εικόνα 13Α**) ενώ στο άλλο εμβολιάστηκε το προς αξιολόγηση βακτηριακό στέλεχος με την μέθοδο της

γραμμικής διασποράς (επτά γραμμές ζιγκ–ζαγκ) (**Εικόνα 13Β**). Στη συνέχεια απομακρύνθηκαν τα καπάκια και οι βάσεις των τρυβλίων προσαρμόστηκαν και σταθεροποιήθηκαν με μεμβράνη (**Εικόνα 13Γ**). Τέλος, τα τρυβλία τοποθετήθηκαν σε επωαστικό θάλαμο στους 24 ^{o}C και σε συνθήκες σκότους. Δοκιμές πτητικών πραγματοποιήθηκαν **κατά την διεξοδική *in-vitro* αξιολόγηση.** Η παραπάνω διαδικασία πραγματοποιήθηκε σε θάλαμο αναστρεφόμενης νηματικής ροής υπό ασηπτικές συνθήκες.



Εικόνα 13. Διαδικασία εκτέλεσης *in-vitro* δοκιμών πτητικών: **Α.** εμβολιασμός παθογόνου, **Β.** εμβολιασμός βιολογικού παράγοντα και **Γ.** προσαρμογή τρυβλίων με τρόπο ώστε οι μικροοργανισμοί να μοιράζονται τον ίδιο εναέριο χώρο χωρίς να έρχονται σε άμεση επαφή.

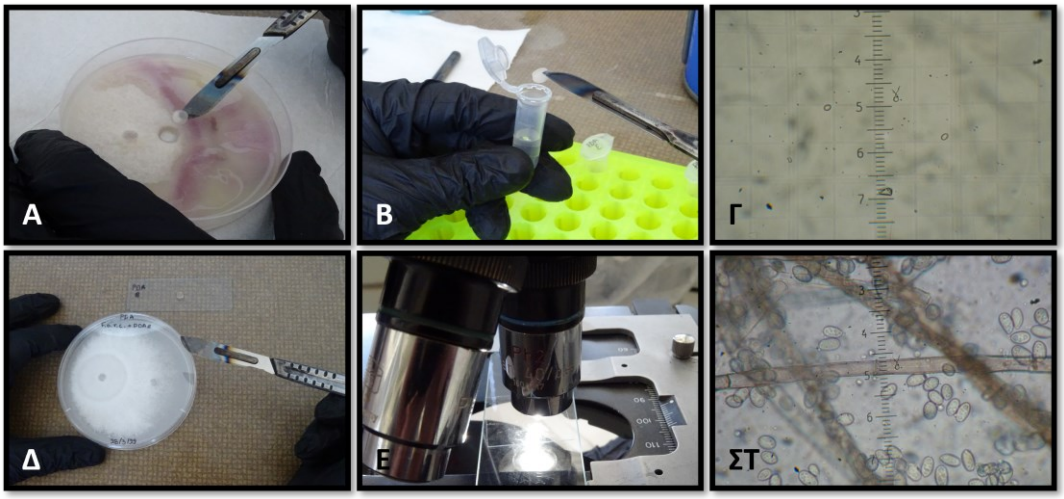
2.2.3 Καταγραφή μυκητολογικών παραμέτρων για τη διερεύνηση της επίδρασης των υπό εξέταση βακτηριακών στελεχών

Για να διερευνηθεί η επίδραση των υπό εξέταση βακτηριακών στελεχών στην ανάπτυξη των παθογόνων πραγματοποιήθηκαν καταγραφές διάφορων μυκητολογικών παραμέτρων. Οι παράμετροι που ελέγχθηκαν κατά την αξιολόγηση ήταν η **ακτινωτή ανάπτυξη του μυκηλίου του παθογόνου** (mm/ημέρα), **ο αριθμός των παραγόμενων κονιδίων (ή σποριαγγείων)** ανά δισκίο καλλιέργειας και το **πάχος των υφών** (μm). Επιπρόσθετα, για τα παθογόνα *V. dahliae* και *B. cinerea* λήφθηκαν καταγραφές που αφορούσαν στο **εμβαδόν των σχηματιζόμενων μικροσκληρωτίων (cm^2)** και στον **αριθμό των παραγόμενων σκληρωτίων,** αντίστοιχα. Κατά την προκαταρκτική αξιολόγηση λήφθηκαν μετρήσεις μόνο για την ακτινωτή ανάπτυξη του μυκηλίου του εκάστοτε παθογόνου ενώ κατά την διεξοδικότερη *in-vitro* αξιολόγηση πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις για όλες τις προαναφερθείσες μυκητολογικές παραμέτρους.

Αναφορικά με τις **καταγραφές του ρυθμού ανάπτυξης**, ανά τακτά χρονικά διαστήματα από τον εμβολιασμό, στις δοκιμές αντιπαραβολής μετρήθηκε το μήκος της ακτίνας του αναπτυσσόμενου μυκηλίου με κατεύθυνση προς το υπό εξέταση

βακτηριακό στέλεχος ενώ στις δοκιμές πτητικών μετρήθηκε το μήκος της ακτίνας του αναπτυσσόμενου μυκηλίου προς τέσσερις κατευθύνσεις και υπολογίστηκε ο μέσος όρος. Τα αποτελέσματα της ακτινωτής ανάπτυξης του μυκηλίου εκφράστηκαν σε **mm/ημέρα**. Τέλος, οι καταγραφές του ρυθμού ανάπτυξης στις δοκιμές αντιπαραβολής έληγαν όταν το αναπτυσσόμενο μυκήλιο ξεπερνούσε το δισκίο του αποστειρωμένου PDA στα τρυβλία του μάρτυρα ενώ στις δοκιμές πτητικών όταν το μυκήλιο κάλυπτε ολοκληρωτικά την επιφάνεια του τρυβλίου. Όσον **αφορά στις καταγραφές των παραγόμενων κονιδίων ή και σποριαγγείων**, με το πέρας των βιοδοκιμών αποκόπηκαν δισκία διαμέτρου 5 mm από την περιφέρεια του αναπτυσσόμενου μυκηλίου με τη χρήση φυλλοτρυπητήρα. Τα δισκία τοποθετήθηκαν σε σωληνάρια Eppendorf όγκου 1.5 ml τα οποία περιείχαν 1 ml απεσταγμένου νερού, ακολούθησε έντονη ανάδευση και πραγματοποιήθηκαν οι κατάλληλες αραιώσεις. Έπειτα, ακολούθησε η καταγραφή του αριθμού των παραγόμενων κονιδίων με τη χρήση αιματοκυτταρομέτρου υπό μεγέθυνση μικροσκοπίου (**Εικόνα 14Α, Β, Γ**). Παράλληλα, προετοιμάστηκαν μικροσκοπικά παρασκευάσματα από ένα αντιπροσωπευτικό τρυβλίο της κάθε επέμβασης από το οποίο καταγράφηκε **το πάχος τριάντα τυχαία επιλεγμένων υφών** υπό μεγέθυνση μικροσκοπίου (**Εικόνα 14Δ, Ε, ΣΤ**).

Επιπρόσθετα, στην περίπτωση του μύκητα *V. dahliae* διερευνήθηκε η επίδραση των υπό εξέταση βακτηριακών στελεχών στο **εμβαδόν των σχηματισθέντων μικροσκληρωτίων (cm^2)**. Με το πέρας των *in-vitro* βιοδοκιμών πραγματοποιήθηκε σάρωση των τρυβλίων (με το σαρωτή Samsung Xpress SL-M2875NP Laser Multifaction Printer) και ακολούθησε ανάλυση των εικόνων στο πρόγραμμα **ImageJ** προκειμένου να εκτιμηθεί ο συνολικός αριθμός των εικονοστοιχείων που αντιστοιχούσαν στη επιφάνεια των παραγόμενων μικροσκληρωτίων. Τέλος, στη περίπτωση του μύκητα *B. cinerea,* ο αριθμός των **παραγόμενων σκληρωτίων** εκτιμήθηκε μακροσκοπικά.



Εικόνα 14. Διερεύνηση της επίδρασης των υπό εξέταση βακτηριακών στελεχών στη παραγωγή κονιδίων και στο πάχος των υφών του μύκητα: **Α.** αποκοπή δισκίου καλλιέργειας του μύκητα, **Β.** μεταφορά δισκίου σε σωληνάριο Eppendorf όγκου 1.5 ml, **Γ.** καταγραφή αριθμού κονιδίων, **Δ.** προετοιμασία παρασκευάσματος και **Ε-ΣΤ.** καταγραφή πάχους υφών υπό μεγέθυνση μικροσκοπίου.

2.3 In-planta και in-vivo βιοδοκιμές

2.3.1 Φυτικό υλικό

Για τις *in-planta* και *in-vivo* βιοδοκιμές που πραγματοποιήθηκαν στα πλαίσια της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής χρησιμοποιήθηκαν φυτά τομάτας (υβρίδιο ***Belladona F1***), αποκομμένα φυλλάρια τομάτας (υβρίδιο ***Belladona F1***), βιολογικοί καρποί τομάτας (υβρίδιο ***Lobello F1***) καθώς και φυτά μελιτζάνας (ποικιλία ***Black Beauty***).

Για τη δημιουργία σπορόφυτων τομάτας και μελιτζάνας, οι σπόροι υποβλήθηκαν σε διαδικασία προβλάστησης μέσα σε γυάλινα τρυβλία τα οποία περιείχαν βρεγμένο διηθητικό χαρτί. Τα τρυβλία τοποθετήθηκαν σε συνθήκες σκότους στους 25 ^{o}C έως ότου πραγματοποιηθεί η βλάστηση των σπόρων. Οι σπόροι που βλάστησαν μεταφέρθηκαν σε δοχεία που περιείχαν υπόστρωμα βερμικουλίτη τα οποία τοποθετήθηκαν σε θάλαμο ελεγχόμενων συνθηκών στους 24 ^{o}C με φωτοπερίοδο 12 ωρών. Όταν τα φυτά έφθασαν στο επιθυμητό στάδιο ανάπτυξης μεταφυτεύτηκαν σε ποτήρια όγκου 100 ml που περιείχαν φυτόχωμα HuminSubstrat (Klasmann-3 Deilmann GmbH, Germany) και τοποθετήθηκαν εκ νέου στο θάλαμο ελεγχόμενων συνθηκών (**Εικόνα 15**).



Εικόνα 15. **Α.** Διαδικασία προβλάστησης σπόρων μελιτζάνας και τομάτας. **Β.** Αναπτυγμένα φυτάρια μελιτζάνας και **Γ.** τομάτας σε θάλαμο ελεγχόμενων συνθηκών.

2.3.2 Προέλευση βιολογικών παραγόντων

Τα βακτηριακά στελέχη που αξιολογήθηκαν στα πλαίσια της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής προήλθαν από τη βίο-τράπεζα του Ινστιτούτο Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας, Ίδρυμα Τεχνολογίας και Έρευνας (IMBB-ITE) και αποτελούν μια ευγενική προσφορά του Αναπληρωτή Καθηγητή Παναγιώτη Σαρρή. Τα βακτηριακά στελέχη απομονώθηκαν από τη **ριζόσφαιρα** και τη **φυλλόσφαιρα** επτά **αλοφύτων της Κρήτης** στα πλαίσια του προγράμματος «Βιώσιμες Λύσεις για την Βιολογική Αντιμετώπιση Επιβλαβών Μικροοργανισμών και την Επαγωγή της Αντοχής των Καλλιεργειών στην Αλατότητα, Ακρωνύμιο BIOCONTROL» και έχουν ταυτοποιηθεί σε επίπεδο γένους ή και είδους με αλληλούχιση του γονιδίου 16S του ριβοσωμικού rRNA (Πίνακες 2, 3, 4). Ειδικότερα, πραγματοποιήθηκαν απομονώσεις από τα αλόφυτα: 1. ***Euphorbia paralias*** (Ευφορβία η παράλιος), 2. ***Frankenia* sp**. (Φρανκένια) 3. ***Tetraena alba***, 4. ***Teucrium capitatum*** (Αγαποβότανο), 5. ***Thymus capitatus*** (Θυμάρι), 6. ***Atriplex halimus*** (Αλιμιά) και 7. ***Arthrocremnum macrostachyum***. Όλα τα παραπάνω στελέχη διατηρούνται σε διάλυμα γλυκερόλης 25% σε υπεκαταψύκτη στους -80 ^{o}C στο εργαστήριο μυκητολογίας του ΕΛΓΟ-ΔΗΜΗΤΡΑ.

2.3.3 Παθοσύστημα τομάτα-Botrytis cinerea

2.3.3.1 Προετοιμασία και εφαρμογή βιολογικών παραγόντων

Προκειμένου να διενεργηθούν οι εφαρμογές των επιλεγμένων βακτηριακών στελεχών, πραγματοποιήθηκε ανακαλλιέργεια τους σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα PDA. Με το πέρας τριών ημερών, πραγματοποιήθηκε εμβολιασμός κωνικών όγκου 500 ml που περιείχαν 200 ml υγρού θρεπτικού υποστρώματος TSB. Στην συνέχεια, οι κωνικές τοποθετήθηκαν σε περιστρεφόμενο επωαστηκό θάλαμο όπου και παρέμειναν

για 48 ώρες σε συνθήκες σκότους στους 24 ºC. Έπειτα, το περιεχόμενο των κωνικών τοποθετήθηκε ισόποσα σε σωληνάρια Falcon και φυγοκεντρήθηκε στις 3.000 rpm για 10 λεπτά. Ακολούθησε απομάκρυνση του υπερκείμενου υγρού και επαναιωρηματοποίηση του ιζήματος των βακτηριακών κυττάρων με την προσθήκη απεσταγμένου νερού. Για να υπολογιστεί η συγκέντρωση των βακτηριακών κυττάρων cfu/ml (colony-forming units) πραγματοποιήθηκε φωτομέτρηση του βακτηριακού αιωρήματος (σε αραίωση 1/10) στα 600 nm σε φασματοφωτόμετρο Η συγκέντρωση των βακτηριακών κυττάρων του εκάστοτε βακτηριακού στελέχους εκτιμήθηκε βάσει της απορρόφησης με την χρήση της ψηφιακής πλατφόρμας: http://www.labtools.us/bacterial-cell-number-od600/ και ρυθμίστηκε με τρόπο τέτοιο έτσι ώστε όλες οι συγκεντρώσεις να είναι της τάξης του **×10^{8} cfu/ml.** Στον Πίνακα 2, αναγράφονται όλες οι συγκεντρώσεις των βακτηριακών αιωρημάτων που χρησιμοποιήθηκαν καθώς και άλλες πληροφορίες σχετικές με τη ταυτοποίηση και τους ξενιστές προέλευσης των βακτηριακών στελεχών.

Στα πειράματα που χρησιμοποιήθηκαν φυτά τομάτας, η εφαρμογή των επιλεγμένων βακτηριακών στελεχών έγινε με εμβάπτιση των φυλλαρίων για δύο λεπτά στο βακτηριακό αιώρημα του εκάστοτε στελέχους (**Εικόνα 16Γ**). Για τις επεμβάσεις του αρνητικού (**Control-)** αλλά και του θετικού μάρτυρα (**B.c**.), πραγματοποιήθηκε εμβάπτιση των φυλλαρίων σε απεσταγμένο νερό. Τέλος, τα φυτά τομάτας τοποθετήθηκαν σε δικτυωτό πλέγμα μέσα σε κουτιά που περιείχαν βρεγμένο χαρτί προκειμένου να διατηρηθεί η υψηλή σχετική υγρασία στο εσωτερικό του κουτιού. Τα κουτιά κλείστηκαν και τοποθετήθηκαν σε θάλαμο ελεγχόμενων συνθηκών στους 24 ºC και σε φωτοπερίοδο 12 ωρών.

Στα πειράματα που χρησιμοποιήθηκαν καρποί τομάτας, πριν την εφαρμογή των βακτηριακών αιωρημάτων, οι καρποί ξεπλύθηκαν σε τρεχούμενο νερό βρύσης για 10 λεπτά, απολυμάνθηκαν για 4 λεπτά σε διάλυμα χλωρίνης 10% και ξεπλύθηκαν σε τρεχούμενο νερό βρύσης για άλλα 10 λεπτά. Η εφαρμογή των επιλεγμένων βακτηριακών στελεχών έγινε με εμβάπτιση των καρπών για δύο λεπτά στο βακτηριακό αιώρημα του εκάστοτε στελέχους (**Εικόνα 16Δ**). Για τις επεμβάσεις του αρνητικού (**Control-)** αλλά και του θετικού μάρτυρα (**B.c**.), πραγματοποιήθηκε εμβάπτιση των καρπών σε απεσταγμένο νερό. Τέλος, οι καρποί τομάτας τοποθετήθηκαν σε δικτυωτό πλέγμα μέσα σε κουτιά που περιείχαν βρεγμένο χαρτί προκειμένου να διατηρηθεί η

υψηλή σχετική υγρασία στο εσωτερικό του κουτιού. Τα κουτιά κλείστηκαν και τοποθετήθηκαν σε θάλαμο ελεγχόμενων συνθηκών στους 24 °C και σε φωτοπερίοδο 12 ωρών.

Πίνακας 2. Κωδικός, επιστημονική ονομασία, ξενιστής, τμήμα απομόνωσης βακτηριακών στελεχών και συγκεντρώσεις βακτηριακών αιωρημάτων που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα του παθοσυστήματος Τομάτα-*B. cinerea*

Κωδικός στελέχους	**Επιστημονική ονομασία στελέχους**	**Ξενιστής προέλευσης στελέχους**	**Τμήμα απομόνωσης στελέχους**	**Συγκεντρώσεις βακτηριακών αιωρημάτων (cfu/ml)**		
				Βιοδοκιμές σε φυτά τομάτας	**Βιοδοκιμές σε καρπούς τομάτας***	**Βιοδοκιμές σε καρπούς τομάτας****
SAR15	-	*Frankenia* sp.	Ριζόσφαιρα	2.50×10^8	5.60×10^8	3.72×10^8
SAR101	*Pseudomonas* sp.	*Thymus capitatus*	Ριζόσφαιρα	1.12×10^8	1.55×10^8	1.38×10^8
SAR103	*Pseudomonas* sp.	*Thymus capitatus*	Ριζόσφαιρα	1.86×10^8	3.20×10^8	1.22×10^8
SAR111	*Bacillus mobilis*	*Frankenia* sp.	Φυλλόσφαιρα	3.35×10^8	4.31×10^8	4.28×10^8
SAR118	*Bacillus amyloliquefaciens*	*Tetraena alba*	Φυλλόσφαιρα	1.74×10^8	3.51×10^8	2.34×10^8
SAR119	*Bacillus siamensis*	*Atriplex halimus*	Φυλλόσφαιρα	2.28×10^8	2.98×10^8	2.50×10^8
SAR121	*Pseudomonas migulae*	*Thymus capitatus*	Ριζόσφαιρα	4.02×10^8	3.06×10^8	2.93×10^8
SAR123	*Pseudomonas* sp.	*Thymus capitatus*	Ριζόσφαιρα	1.93×10^8	1.40×10^8	1.45×10^8
SAR128	*Kushneria marisflavi*	*Tetraena alba*	Φυλλόσφαιρα	1.74×10^8	3.25×10^8	3.96×10^8

* Η μόλυνση των καρπών τομάτας πραγματοποιήθηκε με δισκίο φρέσκιας καλλιέργεια του παθογόνου

** Η μόλυνση των καρπών τομάτας πραγματοποιήθηκε με σταγόνα κονιδιακού αιωρήματος

2.3.3.2 Προέλευση, προετοιμασία και τεχνητή μόλυνση με το παθογόνο Botrytis cinerea

Για την τεχνητή μόλυνση των φυτών και των καρπών τομάτας με τον μύκητα *B. cinerea* χρησιμοποιήθηκε η απομόνωση **B.14.9** η οποία χαρακτηρίζεται από υψηλή μολυσματικότητα στη τομάτας. Η συγκεκριμένη απομόνωση ανήκει στη συλλογή του εργαστηρίου μυκητολογίας του ΕΛΓΟ ΔΗΜΗΤΡΑ και απομονώθηκε από τον Δρ. Εμμανουήλ Μαρκάκη το 2020 από φυτά τομάτας, θερμοκηπιακής καλλιέργειας στην περιοχή του Τυμπακίου (Κόκκινος Πύργος) στον νομό Ηρακλείου Κρήτης, που έφεραν τυπικά συμπτώματα της ασθένειας (Malandrakis et al. 2022). Η απομόνωση διατηρείται σε διάλυμα γλυκερόλης 25% σε υπερκαταψύκτη στους -80°C.

Στα πειράματα που χρησιμοποιήθηκαν φυτά, η τεχνητή μόλυνση πραγματοποιήθηκε **τρεις ημέρες** μετά την εφαρμογή των βιολογικών παραγόντων. Πιο συγκεκριμένα, τα φυλλάρια τραυματίστηκαν με την χρήση αποστειρωμένης βελόνας

και στην συνέχεια πάνω στην οπή τοποθετήθηκε δισκίο φρέσκιας καλλιέργειας (**διαμέτρου 5 mm**) του μύκητα *B. cinerea* (**Εικόνα 17Α.1**). Στα φυλλάρια του αρνητικού μάρτυρα τοποθετήθηκαν πάνω στις οπές δισκία αποστειρωμένου PDA. Τέλος, τα φυτά τοποθετήθηκαν σε δικτυωτό πλέγμα μέσα σε κουτιά που περιείχαν βρεγμένο χαρτί τα οποία στην συνέχεια κλείστηκαν και τοποθετήθηκαν σε θάλαμο ελεγχόμενων συνθηκών στους 20 ^{o}C και σε φωτοπερίοδο 12 ωρών προκειμένου να ευνοηθεί η μόλυνση.

Στα πειράματα που χρησιμοποιήθηκαν καρποί, η τεχνητή μόλυνση πραγματοποιήθηκε με δύο μεθόδους, δύο ημέρες μετά την εφαρμογή των βιολογικών παραγόντων. Ειδικότερα, οι καρποί τρυπήθηκαν με τη χρήση αποστειρωμένης βελόνας και πάνω στην οπή εναποτέθηκε είτε **δισκίο διαμέτρου 5 mm φρέσκιας καλλιέργειας του μύκητα** είτε **20 μl σταγόνας κονιδιακού αιωρήματος συγκέντρωσης 3×10^{6} κονίδια/ml** (**Εικόνα 17Α.2, Α.3**). Για τη προετοιμασία του κονιδιακού αιωρήματος, δισκία διαμέτρου 5 mm φρέσκιας καλλιέργειας του μύκητα τοποθετήθηκαν σε σωληνάρια Eppendorf που περιείχαν 1 ml απεσταγμένο νερό. Ακολούθησε έντονη ανάδευση και στη συνέχεια υπολογίστηκε η συγκέντρωση του κονιδιακού αιωρήματος αιωρήματος στο αιματοκυτταρόμετρο υπό μεγέθυνση μικροσκοπίου. Στους καρπούς του αρνητικού μάρτυρα τοποθετήθηκαν πάνω στις οπές είτε δισκία αποστειρωμένου PDA είτε 20 μl σταγόνας αποστειρωμένου απεσταγμένου νερού, αντίστοιχα. Τέλος, οι καρποί τοποθετήθηκαν σε δικτυωτό πλέγμα μέσα σε κουτιά που περιείχαν βρεγμένο χαρτί τα οποία στην συνέχεια κλείστηκαν και τοποθετήθηκαν σε θάλαμο ελεγχόμενων συνθηκών στους 20^{o}C και σε φωτοπερίοδο 12 ωρών προκειμένου να ευνοηθεί η μόλυνση.

2.3.4 Παθοσύστημα τομάτας-Phytophthora infestans

2.3.4.1 Προετοιμασία και εφαρμογή βιολογικών παραγόντων

Για την προετοιμασία των βακτηριακών αιωρημάτων των υπό εξέταση βιολογικών παραγόντων ακολουθήθηκε η ίδια ακριβώς διαδικασία που περιγράφετε στο παθοσύστημα τομάτα-*B. cinerea* (Ενότητα 2.3.3.1). Στον Πίνακα 3, αναγράφονται όλες οι συγκεντρώσεις των βακτηριακών αιωρημάτων που χρησιμοποιήθηκαν καθώς και άλλες πληροφορίες σχετικές με τη ταυτοποίηση και τους ξενιστές προέλευσης των βακτηριακών στελεχών.

Όσον αφορά στην εφαρμογή των βιολογικών παραγόντων, τα φυλλάρια αφού αποκόπηκαν από τα φυτά τομάτας εμβαπτίστηκαν για δύο λεπτά μέσα σε ποτήρια που περιείχαν τα αραιωμένα βακτηριακά αιωρήματα των υπό αξιολόγηση βακτηριακών στελεχών (**Εικόνα 16Ε**). Για τις επεμβάσεις του αρνητικού (**Control-**) και του θετικού μάρτυρα (**P.i.**), τα φυλλάρια εμβαπτίστηκαν μέσα σε ποτήρια που περιείχαν αποστειρωμένο απεσταγμένο νερό. Έπειτα, τα φυλλάρια τοποθετήθηκαν με την κάτω επιφάνεια του φυλλαρίου προς τα πάνω, σε δικτυωτό πλέγμα μέσα σε κουτιά που περιείχαν βρεγμένο χαρτί και στη συνέχεια τα κουτιά κλείστηκαν και τοποθετήθηκαν σε θάλαμο ελεγχόμενων συνθηκών στους 24 °C και σε φωτοπερίοδο 12 ωρών για μια ημέρα.

Πίνακας 3. Κωδικός, επιστημονική ονομασία, ξενιστής, ιστός απομόνωσης βακτηριακών στελεχών και συγκεντρώσεις βακτηριακών αιωρημάτων που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα του παθοσυστήματος Τομάτα-*P. infestans*.

Κωδικός στελέχους	**Επιστημονική ονομασία στελέχους**	**Ξενιστής απομόνωσης στελέχους**	**Τμήμα απομόνωσης στελέχους**	**Συγκέντρωση βακτηριακού αιωρήματος (cfu/ml)**
				Βιοδοκιμές σε φυλλάρια τομάτας
SAR5	-	*Euphorbia paralias*	Ριζόσφαιρα	1.53×10^8
SAR8	*Moraxella osloensis*	*Euphorbia paralias*	Φυλλόσφαιρα	1.37×10^8
SAR9	*Pseudomonas* sp.	*Thymus capitatus*	Ριζόσφαιρα	1.58×10^8
SAR16	*Sphingobium olei*	*Euphorbia paralias*	Ριζόσφαιρα	2.82×10^8
SAR44	*Olivibacter soli*	*Tetraena alba*	Ριζόσφαιρα	1.09×10^8
SAR61	-	*Tetraena alba*	Ριζόσφαιρα	1.13×10^8
SAR81	-	*Thymus capitatus*	Ριζόσφαιρα	3.89×10^8
SAR83	*Curtobacterium flaccumfaciens*	*Thymus capitatus*	Ριζόσφαιρα	3.62×10^8
SAR118	*Bacillus amyloliquefaciens*	*Tetraena alba*	Φυλλόσφαιρα	3.41×10^8
SAR119	*Bacillus siamensis*	*Atriplex halimus*	Φυλλόσφαιρα	2.86×10^8
SAR121	*Pseudomonas migulae*	*Thymus capitatus*	Ριζόσφαιρα	1.62×10^8
SAR125	*Bacillus simplex*	*Thymus capitatus*	Ριζόσφαιρα	3.92×10^8
SAR160	*Metschnikowia* sp.	*Teucrium capitatum*	Φυλλόσφαιρα	4.35×10^8

2.3.4.2 Προέλευση, προετοιμασία και τεχνητή μόλυνση με το παθογόνο Phytophthora infestans

Για την τεχνητή μόλυνση των φυλλαρίων τομάτας με τον ωομύκητα *P. infestans* χρησιμοποιήθηκε η απομόνωση **90128** η οποία χαρακτηρίζεται από υψηλή μολυσματικότητα στη τομάτα (Song et al., 2009). Η συγκεκριμένη απομόνωση εισήχθη

από εργαστήριο του εξωτερικού (The Sainsbury Laboratory, UK) και είναι μια ευγενική προσφορά του Dr Sophien Kamoun. Για τη προετοιμασία του μολύσματος, δισκία διαμέτρου 5 mm φρέσκιας καλλιέργειας του ωομύκητα τοποθετήθηκαν σε σωληνάρια Eppendorf που περιείχαν 1 ml απεσταγμένο νερό. Ακολούθησε έντονη ανάδευση και στη συνέχεια υπολογίστηκε η συγκέντρωση του σπορειαγγειακού αιωρήματος στο αιματοκυτταρόμετρο υπό μεγέθυνση μικροσκοπίου.

Ειδικότερα, η τεχνητή μόλυνση πραγματοποιήθηκε εναποθέτοντας σε κάθε φυλλάριο τομάτας **3 σταγόνες** των **20 μl** σποριαγγειακού αιωρήματος **συγκέντρωσης 2.8×10^6 σποριάγγεια/ml** στην κάτω επιφάνεια του φυλλαρίου (**Εικόνα 17Β.1-Β.3**). Τέλος, τα φυλλάρια κλείστηκαν μέσα στα κουτιά και μεταφέρθηκαν στον θάλαμο ελεγχόμενων συνθηκών σε συνθήκες σκότους για 24 ώρες. Με το πέρας των 24 ωρών, ο θάλαμος ρυθμίστηκε στους 20 ^oC, με φωτοπερίοδο 12 ωρών προκειμένου να ευνοηθεί η εξέλιξη της ασθένειας.

2.3.5 Παθοσύστημα Μελιτζάνα-Verticillium dahliae και τομάτα Verticillium dahliae

2.3.5.1 Προετοιμασία και εφαρμογή βιολογικών παραγόντων

Για την προετοιμασία των βακτηριακών αιωρημάτων των υπό εξέταση βιολογικών παραγόντων ακολουθήθηκε η ίδια ακριβώς διαδικασία που περιγράφετε στο παθοσύστημα τομάτα-*B. cinerea* (Ενότητα 2.3.3.1). Στον Πίνακα 4, αναγράφονται όλες οι συγκεντρώσεις των βακτηριακών αιωρημάτων που χρησιμοποιήθηκαν καθώς και άλλες πληροφορίες σχετικές με τη ταυτοποίηση και τους ξενιστές προέλευσης των βακτηριακών στελεχών.

Η εφαρμογή των βιολογικών παραγόντων στα παθοσυστήματα μελιτζάνα-*V. dahliae,* και τομάτα-*V. dahliae* πραγματοποιήθηκε όταν τα φυτά μελιτζάνας ευρίσκονταν στο στάδιο του **$2^{ου}$-$3^{ου}$ πραγματικού φύλλου** και τα φυτά τομάτας στο στάδιο του **$1^{ου}$-$2^{ου}$ πραγματικού φύλλου**. Πιο συγκεκριμένα, το κάθε φυτό της κάθε επέμβασης ριζοποτήθηκε με **20 ml** του εκάστοτε βακτηριακού αιωρήματος του (**Εικόνα 16ΣΤ**) ενώ τα φυτά του αρνητικού (**Control-**) και του θετικού (**V.d.**) μάρτυρα ριζοποτήθηκαν με **20 ml** απεσταγμένου νερού. Τέλος, τα φυτά παρέμειναν σε θάλαμο ελεγχόμενων συνθηκών στους 24 ^oC και σε φωτοπερίοδο 12 ωρών.

Πίνακας 4 Κωδικός, επιστημονική ονομασία, ξενιστής, ιστός απομόνωσης βακτηριακών στελεχών και συγκεντρώσεις βακτηριακών αιωρημάτων που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα των παθοσυστημάτων Μελιτζάνα-*V. dahliae* και Τομάτα-*V. dahliae*

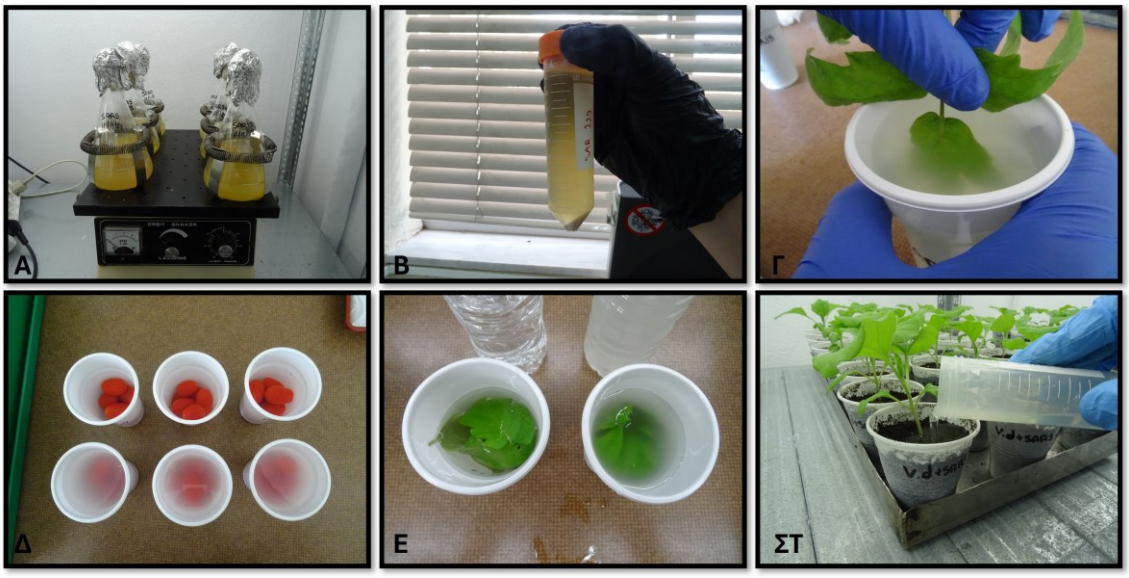
Κωδικός στελέχους	Επιστημονική ονομασία στελέχους	Ξενιστής απομόνωσης στελέχους	Ιστός απομόνωσης στελέχους	Συγκεντρώσεις βακτηριακών αιωρημάτων (cfu/ml)	
				Βιοδοκιμές σε φυτά μελιτζάνας	**Βιοδοκιμές σε φυτά τομάτας**
SAR5	-	*Euphorbia paralias*	Ριζόσφαιρα	1.59×10^8	1.70×10^8
SAR15	-	*Frankenia* sp.	Ριζόσφαιρα	3.10×10^8	3.03×10^8
SAR35	*Cronobacter turicensis*	*Frankenia* sp.	Ριζόσφαιρα	2.34×10^8	2.74×10^8
SAR36	-	*Frankenia* sp.	Ριζόσφαιρα	2.70×10^8	2.89×10^8
SAR59	*Pseudomonas frederiksbergensi*	*Tetraena alba*	Ριζόσφαιρα	3.42×10^8	4.67×10^8
SAR60	*Olivibacter soli*	*Tetraena alba*	Ριζόσφαιρα	5.11×10^8	5.08×10^8
SAR81	-	*Thymus capitatus*	Ριζόσφαιρα	4.23×10^8	4.08×10^8
SAR85	*Cytobacillus oceanisediminis*	*Atriplex halimus*	Ριζόσφαιρα	4.23×10^8	1.33×10^8
SAR101	*Pseudomonas sp.*	*Thymus capitatus*	Ριζόσφαιρα	1.66×10^8	2.36×10^8
SAR118	*Bacillus amyloliquefaciens*	*Tetraena alba*	Φυλλόσφαιρα	2.50×10^8	3.11×10^8
SAR119	*Bacillus siamensis*	*Atriplex halimus*	Φυλλόσφαιρα	2.16×10^8	3.73×10^8
SAR120	*Pseudomonas migulae*	*Teucrium capitatum*	Ριζόσφαιρα	2.17×10^8	2.85×10^8
SAR122	*Pseudomonas sp.*	*Thymus capitatus*	Ριζόσφαιρα	1.51×10^8	1.29×10^8
SAR125	*Bacillus simplex*	*Thymus capitatus*	Ριζόσφαιρα	1.50×10^8	4.70×10^8
SAR160	*Metschnikowia sp.*	*Teucrium capitatum*	Φυλλόσφαιρα	2.57×10^8	4.42×10^8

2.3.5.2 Προέλευση, προετοιμασία και τεχνητή μόλυνση με το παθογόνο Verticillium dahliae

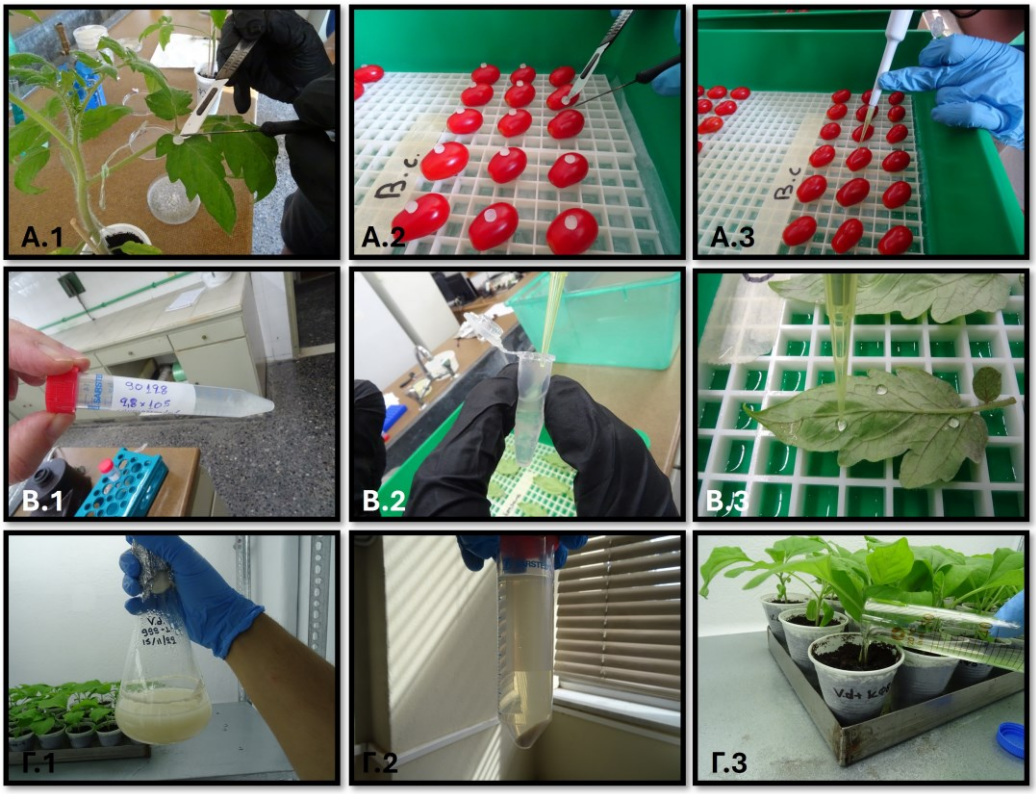
Για την τεχνητή μόλυνση φυτών μελιτζάνας και τομάτας με τον μύκητα *V. dahliae* χρησιμοποιήθηκε η απομόνωση **999-1** που χαρακτηρίζεται από υψηλή μολυσματική ικανότητα στη μελιτζάνα και στην τομάτα (Ligoxigakis and Markakis, 2012; Markakis et al., 2014). Η συγκεκριμένη απομόνωση ανήκει στη συλλογή του εργαστηρίου μυκητολογίας του ΕΛΓΟ ΔΗΜΗΤΡΑ και απομονώθηκε το 2000 από φυτά μελιτζάνας σε υπαίθρια καλλιέργεια, στην περιοχή του Οροπέδιού Λασιθίου, που έφεραν τυπικά συμπτώματα βερτισιλλίωσης (Papaioannou et al., 2013). Η απομόνωση διατηρείται σε διάλυμα γλυκερόλης 25% σε υπερκαταψύκτη στους -80ºC. Για τη προετοιμασία του μολύσματος του παθογόνου, πραγματοποιήθηκε εμβολιασμός νεαρής καλλιέργειας του μύκητα σε κωνικές όγκου 500 ml που περιείχαν 200 ml υγρό θρεπτικό υπόστρωμα PDB. Στην συνέχεια, οι κωνικές τοποθετήθηκαν σε περιστρεφόμενο

επωαστικό θάλαμο στις 160 rpm, στους 24 ºC, σε συνθήκες σκότους όπου και παρέμειναν για έξι ημέρες. Ακολούθως, το περιεχόμενο των κωνικών, διηθήθηκε από τετραπλό τούλι και στη συνέχεια τοποθετήθηκε ισόποσα σε σωλήνες Falcon. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 3.000 rpm για 10 λεπτά, απομάκρυνση του υπερκείμενου υγρού και επαναιωρηματοποίηση του ιζήματος των κονιδίων σε απεσταγμένο νερό. Η συγκέντρωση εκτιμήθηκε με την χρήση αιματοκυτταρομέτρου υπό μεγέθυνση μικροσκοπίου και ακολούθησαν οι κατάλληλες αραιώσεις προκειμένου να δημιουργηθεί κονιδιακό αιώρημα συγκέντρωσης **5×10^6 κονίδια/ml**.

Τόσο στο παθοσύστημα **μελιτζάνα-*V. dahliae*** όσο και στο **τομάτα-*V. dahliae*** η τεχνητή μόλυνση πραγματοποιήθηκε όταν τα φυτά ευρίσκονταν στο στάδιο του **3ου πραγματικού φύλλου**, **επτά ημέρες** μετά την εφαρμογή των βιολογικών παραγόντων. Πιο συγκεκριμένα, στο χώμα του κάθε φυτού δημιουργήθηκαν τρεις οπές με την χρήση ακροφυσίου έτσι ώστε αφενός να δημιουργηθούν πληγές στην ρίζα και αφετέρου να έρθει σε άμεση επαφή το κονιδιακό αιώρημα με το ριζικό σύστημα του φυτού. Κάθε φυτό ριζοποτήθηκε με **20 ml** κονιδιακού αιωρήματος συγκέντρωσης **5×10^6 κονίδια/ml** (**Εικόνα 17Γ.3**) ενώ τα φυτά του αρνητικού μάρτυρα ριζοποτήθηκαν με 20 ml απεσταγμένου νερού.



Εικόνα 16. Προετοιμασία και εφαρμογή των βιολογικών παραγόντων σε φύλλα, καρπούς ή/και φυτά. **Α:** επώαση των βακτηριακών στελεχών σε υλικό TSB, **Β:** Εμφάνιση ιζήματος βακτηριακών κυττάρων κατόπιν φυγοκέντρησης, **Γ:** Εμβάπτιση φύλλου τομάτας σε βακτηριακό αιώρημα**, Δ:** Εμβάπτιση καρπών τομάτας σε βακτηριακά αιωρήματα**, Ε:** Εμβάπτιση αποκομμένων φυλλαρίων τομάτας σε βακτηριακά αιωρήματα, και **ΣΤ:** Ριζοπότισμα βακτηριακού αιωρήματος σε φυτό μελιτζάνας.



Εικόνα 17. Πραγματοποίηση τεχνητών μολύνσεων σε φύλλα, φυλλάρια, καρπούς και φυτά. **Α.1:** Τεχνητή μόλυνση φύλλου τομάτας με *B. cinerea*, **Α2.** Τεχνητή μόλυνση καρπών τομάτας με εναπόθεση δισκίου φρέσκιας καλλιέργειας του *B. cinerea*, **Α.3.** Τεχνητή μόλυνση καρπών τομάτας με εναπόθεση σταγόνας κονιδιακού αιωρήματος του *B. cinerea*, **Β.1-Β.3.** Τεχνητή μόλυνση αποκομμένων φυλλαρίων τομάτας με εναπόθεση 3 σταγόνων σποριαγγειακού αιωρήματος του ωομύκητα *P. infestans* και **Γ.1-Γ.3**. Τεχνητή μόλυνση φυτών μελιτζάνας με ριζοπότισμα κονιδιακού αιωρήματος του μύκητα *V. dahliae*.

2.3.6 Καταγραφή παραμέτρων ασθένειας και φυτικής ανάπτυξης

Αναφορικά με τα πειράματα του παθοσυστήματος **τομάτα-*B. cinerea*,** η καταγραφή των συμπτωμάτων των τεχνητά μολυσμένων φυτών πραγματοποιήθηκε στις **1**, **2** και **3 ημέρες από τη μόλυνση** ενώ η καταγραφή των συμπτωμάτων των τεχνητά μολυσμένων καρπών πραγματοποιήθηκε στις **1**, **2**, **3**, **4**, **5** και **6 ημέρες από τη μόλυνση**. Αναφορικά με το πείραμα του παθοσυστήματος **τομάτα-*P. infestans*,** η καταγραφή των συμπτωμάτων των τεχνητά μολυσμένων φυλλαρίων πραγματοποιήθηκε στις **3**, **4**, **5**, **6** και **8 ημέρες από τη μόλυνση**. Και στα δύο παθοσυστήματα, η ένταση ασθένειας εκτιμήθηκε μετρώντας τη διάμετρο ανάπτυξης της σήψης ή/και της μυκηλιακής αποικίας που αναπτύχθηκε στις φυτικές επιφάνειες με την χρήση χάρακα (σε mm).

Αναφορικά με το παθοσύστημα **τομάτα-*V. dahliae*,** η καταγραφή των συμπτωμάτων των τεχνητά μολυσμένων φυτών πραγματοποιήθηκε στις **8**, **11**, **15**, **19**,

22, **25** και **28 ημέρες από τη μόλυνση** ενώ για το παθοσύστημα **μελιτζάνα-*V. dahliae*** στις **8**, **12**, **15** και **18 ημέρες από τη μόλυνση.** Η εκτίμηση της έντασης της ασθένειας του κάθε φυτού πραγματοποιήθηκε καταγράφοντας τον αριθμό των συμπτωματικών φύλλων προς το σύνολο των φύλλων του φυτού εκφράζοντας το ως ποσοστό επί τοις εκατό (%). Επιπρόσθετα, εκτός από τις παραμέτρους της ασθένειας καταγράφηκαν και παράμετροι φυτικής ανάπτυξης προκειμένου να εξεταστεί εάν τα υπό αξιολόγηση βακτηριακά στελέχη προάγουν την φυτική βιομάζα. Οι παράμετροι φυτικής ανάπτυξης καταγράφηκαν κατά την τελευταία καταγραφή των συμπτωμάτων. Πιο συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκαν καταγραφές που αφορούσαν τον **συνολικό αριθμό των φύλλων** (συμπτωματικών και μη), το **ύψος των φυτών (cm)** και το **νωπό βάρος (gr) του υπέργειου τμήματός τους**.

Από τα δεδομένα της έντασης της ασθένειας των παραπάνω παθοσυστημάτων υπολογίστηκε το **εμβαδόν κάτω από την καμπύλη εξέλιξης της ασθένειας (Area Under Disease Progress Curve, AUDPC**) σύμφωνα με την μέθοδο της τραπεζοειδούς ολοκλήρωσης (Campel and Madden, 1990). Στη περίπτωση των πειραμάτων με το *V. dahliae*, η ασθένεια εκφράστηκε ως ποσοστό επί του μεγαλύτερου εμβαδού που θα ορίζονταν αν επιτυγχανόταν η υψηλότερη δυνατή ασθένεια από την έναρξη έως την λήξη του πειράματος που αναφέρεται ως «**Σχετική AUDPC**» (Korolev et al., 2001). Η **σοβαρότητα της ασθένειας** υπολογίστηκε ως το ποσοστό των μολυσμένων φύλλων. Μολυσμένα από βερτισιλλίωση φυτά θεωρήθηκαν μόνο εκείνα όπου η τελική ένταση της ασθένειας ήταν **≥15%,** Τέλος, η **θνησιμότητα** εκτιμήθηκε ως το ποσοστό των νεκρών φυτών (φυτά με τελική ένταση ασθένειας **≥80%**).

2.3.7 Επαναπομονώση του παθογόνου Verticillium dahliae

Προκειμένου να επιβεβαιωθεί η παρουσία του *V. dahliae* εντός των αγγείων του ξύλου των φυτών μελιτζάνας και τομάτας, πραγματοποιήθηκαν επαναπομονώσεις σε τρυβλία με οξινισμένο στερεό θρεπτικό υπόστρωμα (APDA). Ειδικότερα, από το κάθε στέλεχος αφαιρέθηκαν τα φύλλα και στη συνέχεια ακολούθησε επιφανειακή απολύμανση με αιθανόλη. Τα στελέχη περάστηκαν τέσσερις φορές μέσα από φλόγα ώστε να γίνει απολύμανση της επιφάνειας τους από επιφυτικά σαπρόφυτα. Σε θάλαμο αναστρεφόμενης νηματικής ροής, υπό ασηπτικές συνθήκες, αφαιρέθηκε ο φλοιός του κάθε στελέχους με την χρήση απολυμασμένου νυστεριού και από κάθε στέλεχος

λήφθηκαν τρία τεμαχίδια αγγειώδους ιστού (από την βάση, την μέση και την κορυφή του εκάστοτε στελέχους) τα οποία τοποθετήθηκαν σε τρυβλία με APDA. Τέλος, τα τρυβλία επωάστηκαν στους 24 ^{o}C σε συνθήκες σκότους και ανά τακτά χρονικά διαστήματα λήφθηκαν μετρήσεις της συχνότητα επαναπομόνωσης του μύκητα από τα τεμαχίδια αγγειώδους ιστού.

2.3.8 Ποσοτικοποίηση του DNA του Verticillium dahliae με Real-Time PCR

Προκειμένου να διερευνηθεί εάν τα υπό αξιολόγηση βακτηριακά στελέχη μειώνουν τη βιομάζα του παθογόνου εντός των αγγείων του ξύλου πραγματοποιήθηκε **ποσοτικοποίηση του DNA του *V. dahliae* με Real–Time PCR**. Για τον σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκε **εξαγωγή ολικού DNA** τόσο από φυτά μελιτζάνας όσο και από φυτά τομάτας με την μέθοδο **CTAB** με την χρήση γουδιού και υγρού αζώτου (Murray and Thompson 1980) αφού πρώτα τα στελέχη ομαδοποιήθηκαν ανά τριάδες και ψιλοτεμαχίστηκαν. Εξαγωγή ολικού DNA πραγματοποιήθηκε σε φυτά μελιτζάνας των επεμβάσεων **Control-**, **V.d**, **V.d+SAR119** και **V.d+SAR120** και σε φυτά τομάτας των επεμβάσεων **Control-**, **V.d**, **V.d+SAR60**, **V.d+SAR101** και **V.d+SAR160**. Για τη ποσοτικοποίηση του DNA του παθογόνου με Real-Time PCR ενισχύθηκε τμήμα του **γονιδίου του εσωτερικού μεταγραφικού παράγοντα ITS** του *V. dahliae* με τη χρήση του ζεύγους εκκινητών ITS1-F 5'-CCGCCGGTCCATCAGTCTCTCTGTTTATAC-3' και ITS2-R 5'-CGCCTGCGGGACTCCGATGCGAGCTGTAAC-3' (Nazar et al. 1991). Ως εσωτερικό γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο της **ακτίνης** (actin gene) και η ενίσχυση του έγινε με τη χρήση του ζεύγους εκκινητών: SolACT-F 5'-TTCCGTTGCCCAGAGGTCCT-3' και SolACT-R 5'-TCGCCCTTTGAAATCCACATC-3' (Chen et al. 2007). Η μέθοδος $\mathbf{2^{-\Delta\Delta CT}}$ χρησιμοποιήθηκε προκειμένου να εκτιμηθεί η σχετική ποσότητα DNA του *V. dahliae* (Livak and Schmittgen 2001). Για την εκτέλεση της Real-Time PCR χρησιμοποιήθηκε το kit **PowerUp™ SYBR® Green Master Mix** (ThermoFisher, Waltham, USA) καθώς και η συσκευή **QuantStudio 3 Real-Time PCR System** (ThermoFisher, Waltham, USA). Ειδικότερα, το πρόγραμμα που εφαρμόστηκε για την ενίσχυση του DNA του *V. dahliae* περιλάμβανε ένα αρχικό στάδιο μετουσίωσης στους 95°C για 3 λεπτά, ακολουθούμενο από 40 κύκλους με τα στάδια μετουσίωσης, υβριδισμού και ενίσχυσης στους 95°C, 60°C και 72 °C, για 30, 30 και 30 δευτερόλεπτα αντίστοιχα Για την

ενίσχυση του γονίδιο SolACT πραγματοποιήθηκε έναρξη της αντίδρασης με ένα αρχικό στάδιο μετουσίωσης στους 95°C για 3 λεπτά, ακολουθούμενο από 40 κύκλους με τα στάδια μετουσίωσης, υβριδισμού και ενίσχυσης στους 95°C, 60°C και 72°C, για 30, 30 και 30 δευτερόλεπτα αντίστοιχα. Τα ενισχυμένα προϊόντα αξιολογήθηκαν παρατηρώντας τις καμπύλες μετουσιώσεως για κάθε δείγμα, ξεκινώντας από τους 60°C για 1 λεπτό και αυξάνοντας τη θερμοκρασία με ρυθμό 0.15°C ανά δευτερόλεπτο, έως τους 95°C. Οι μέσες τιμές Ct για κάθε γονίδιο υπολογίστηκαν με βάσει τα ανεξάρτητα βιολογικά δείγματα.

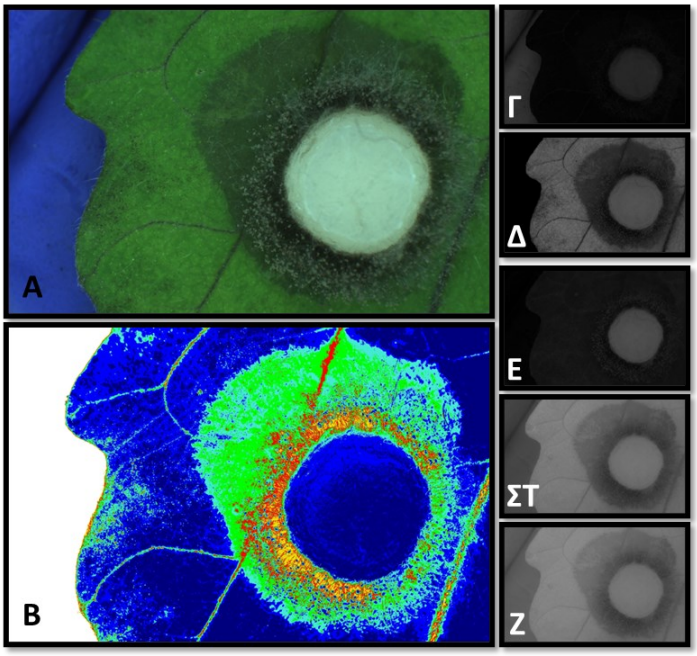
2.3.9 Λήψη φασματικών δεδομένων και υπολογισμός δεικτών βλάστησης

Παράλληλα με τη καταγραφή των συμπτωμάτων της ασθένειας των φυτών στα παθοσυστήματα **τομάτα-*B. cinerea***, **τομάτα-*V. dahliae*** και **μελιτζάνα-*V. dahliae***, ελήφθησαν φάσματα με την υπερφασματική κάμερα **PhenoCheck** της **QCELL** προκειμένου να εκτιμηθούν οι **δείκτες βλάστησης** της κάθε επέμβασης ανά τακτά χρονικά διαστήματα κατά την εξέλιξη της ασθένειας (**Εικόνα 18**). Από κάθε φυτό σημάνθηκε ένα ή και δύο φύλλα πάνω στα οποία ορίστηκε ένα συγκεκριμένο σημείο το οποίο χρησιμοποιήθηκε ως σημείο αναφοράς προκειμένου η λήψη των φασμάτων να πραγματοποιείται κάθε φορά στις ίδιες θέσεις. Επιπλέον, καταγράφηκε η συμπτωματολογική κατάσταση του εκάστοτε φύλλου με την χρήση **5-βάθμιας κλίμακας** όπου: **0:** Υγιές φύλλο, **1:** Μαραμένο φύλλο, **2:** Χλωρωτικό φύλλο, **3:** Κίτρινο φύλλο και **4:** Ξερό ή πεσμένο φύλλο.

Ειδικότερα, για το παθοσύστημα **τομάτα-*B. cinerea,*** η λήψη των φασμάτων από το σημείο αναφοράς, για όλες τις επιμέρους επαναλήψεις, πραγματοποιήθηκε στις **1, 2** και **3 ημέρες από τη μόλυνση.** Όσον αφορά στο παθοσύστημα **τομάτα-*V. dahliae*,** η λήψη των φασμάτων από το σημείο αναφοράς πραγματοποιήθηκε στις **2**, **4**, **6**, **11**, **13**, **15**, **17**, **22** και **25 ημέρες από τη μόλυνση για τα πρώτα δέκα φυτά** (2 φυλλάρια ανά φυτό) ενώ στο **μελιτζάνα-*V. dahliae*** πραγματοποιήθηκε στις **2**, **4**, **6**, **8**, **10** και **12 ημέρες από τη μόλυνση για τα πρώτα δέκα φυτά** (1 φύλλο ανά φυτό).

Για την ανάλυση και τη σύγκριση των δεικτών βλάστησης του κάθε πειράματος χρησιμοποιήθηκαν τα φάσματα των φυτών του αρνητικού και του θετικού μάρτυρα, των αποτελεσματικών επεμβάσεων καθώς και τα φάσματα μιας μη αποτελεσματικής επέμβασης. Πιο συγκεκριμένα, για το παθοσύστημα **τομάτα-*B. cinerea*** αναλύθηκαν τα

φάσματα των επεμβάσεων **α.** Control-, **β.** B.c. **γ.** B.c.+SAR119 και **δ.** B.c.+SAR128 που λήφθησαν στις **1, 2** και **3 ημέρες από την μόλυνση.** Για το παθοσύστημα **μελιτζάνα-*V. dahliae*** αναλύθηκαν τα φάσματα των επεμβάσεων: **α.** Control-, **β.** V.d. **γ.** V.d.+SAR35 και **δ.** V.d.+SAR120 που ελήφθησαν στις **4**, **8** και **12 ημέρες από τη μόλυνση** ενώ για το **παθοσύστημα τομάτα-*V. dahliae*** αναλύθηκαν τα φάσματα των επεμβάσεων: **α.** Control-, **β.** V.d. **γ.** V.d.+SAR60, **δ.** V.d.+SAR101 και **ε.** V.d.+SAR160 τα οποία ελήφθησαν στις **11**, **15** και **25 ημέρες από τη μόλυνση**, χρονικές στιγμές οι οποίες αντιστοιχούσαν στην έναρξη των συμπτωμάτων, στην εκθετική αύξηση των συμπτωμάτων και στην τελική ένταση των συμπτωμάτων που καταγράφηκαν κατά το πέρας των βιοδοκιμών. Τα παραπάνω φασματικά δεδομένα αναλύθηκαν με το λογισμικό **PhenoCheck_VI_export** προκειμένου να υπολογιστούν οι δείκτες βλάστησης των φυτών των διαφορετικών επεμβάσεων στα διάφορα χρονικά σημεία του πειράματος. Ειδικότερα, υπολογίστηκαν οι δείκτες **NDVI** (Normalized Difference Vegetation Index), **CVI** (Chlorophyll Vegetation Index), **NPCI** (Normalized Pigment Chlorophyll Index), **GNDVI** (Green Normalized Difference Vegetation Index), **PSRI** (Plant Senescence Reflectance Index), **TVI** (Triangular Vegetation Index) και **EVI** (Enhanced Vegetation Index) (NV5 GEOSPATIAL 2023).



Εικόνα 18. Φασματικά δεδομένα αντιπροσωπευτικού φυλλαρίου τομάτας που λήφθηκαν με την πολυφασματική κάμερα PhenoCheck, **Α.** έγχρωμη εικόνα (color), **Β.** υπερφασματικός χάρτης GNDVI, και φάσματα στα **Γ.** 460 nm, **Δ.** 540 nm, **Ε.** 640 nm, **ΣΤ.** 780 nm και **Ζ.** 880 nm από ένα ασθενές φυλλάριο τομάτας τεχνητά μολυσμένο με *B. cinerea*.

2.4 Πειραματικός σχεδιασμός και στατιστική ανάλυση

Για τη διερεύνηση της κατασταλτικής δράσης των **173 βακτηριακών στελεχών** έναντι των φυτοπαθογόνων ***B. cinerea*** (B.c.), ***P. infestans*** (P.i.) και ***V. dahliae*** (V.d.), πραγματοποιήθηκε μια **προκαταρκτική *in-vitro* αξιολόγηση** (1 επανάληψη/βακτηριακό στέλεχος/παθογόνο) βάσει της οποία επιλέχθηκαν **τα 20 πιο αποτελεσματικά,** προκειμένου να αξιολογηθούν περαιτέρω. Πιο συγκεκριμένα, για τα 20 πιο αποτελεσματικά βακτηριακά στελέχη ανά παθογόνο, πραγματοποιήθηκε **διεξοδικότερη *in-vitro* αξιολόγηση** (5 επαναλήψεις/βακτηριακό στέλεχος/παθογόνο) τόσο με **δοκιμές αντιπαραβολής** όσο και με **δοκιμές πτητικών,** προκειμένου να διερευνηθεί η επίδραση των βακτηριακών στελεχών στο ρυθμό ανάπτυξης, στη παραγωγή κονιδίων ή/και σποριαγγείων, στο πάχος των υφών και στη παραγωγή σύνθετων μυκηλιακών κατασκευών των φυτοπαθογόνων. Τέλος, τα πιο αποτελεσματικά βακτηριακά στελέχη του εκάστοτε παθοσυστήματος επιλέχθηκαν προκειμένου να αξιολογηθεί η φυτοπροστατευτική τους ικανότητα σε *in-vivo* ή/και σε *in-planta* βιοδοκιμές.

Για την αξιολόγηση της κατασταλτικής δράσης των αποτελεσματικών βακτηριακών στελεχών έναντι του ***B. cinerea*** πραγματοποιήθηκαν **4 ανεξάρτητα πειράματα.** Τα 2 πρώτα πειράματα περιλάμβαναν επεμβάσεις σε φυτά, ενώ τα 2 επόμενα σε καρπούς τομάτας. Το κάθε πείραμα περιλάμβανε επεμβάσεις σε φυτά ή καρπούς τομάτας στα οποία εφαρμόστηκε απεσταγμένο νερό που αποτέλεσαν τους **αρνητικούς μάρτυρες (Control-),** επεμβάσεις σε φυτά ή καρπούς τα οποία μολύνθηκαν τεχνητά με τον μύκητα *B.cinerea* χωρίς την εφαρμογή κάποιου βακτηριακού στελέχους που αποτέλεσαν τους **θετικούς μάρτυρες (B.c.),** καθώς και επεμβάσεις με φυτά ή καρπούς τα οποία μολύνθηκαν τεχνητά με τον μύκητα *B.cinerea* αφού είχαν προηγουμένως δεχθεί εφαρμογή με τα επιλεγμένα βακτηριακά στελέχη που προέκυψαν από τις *in-vitro* βιοδοκιμές. Πιο συγκεκριμένα, τα υπό αξιολόγηση βακτηριακά στελέχη ήταν: **SAR15**, **SAR101**, **SAR103**, **SAR111**, **SAR118**, **SAR119**, **SAR121**, **SAR123**, **SAR128**. Κάθε επέμβαση αποτελούνταν από 20 φυλλάρια σε φυτά και 21 αποκομμένους καρπούς τομάτας.

Για την αξιολόγηση της κατασταλτικής δράσης των αποτελεσματικών βακτηριακών στελεχών έναντι του ***P. infestans*** πραγματοποιήθηκε **ένα πείραμα σε αποκομμένα φυλλάρια τομάτας**. Το πείραμα περιλάμβανε συνολικά 15 επεμβάσεις: **α)**

Φυλλάρια τομάτας στα οποία εναποτέθηκαν σταγόνες αποστειρωμένου απεσταγμένου νερού στην κάτω επιφάνεια των φύλλων τα οποία αποτέλεσαν την επέμβαση του αρνητικού μάρτυρα (**Control-**), **β)** Φυλλάρια τομάτας που εναποτέθηκαν σταγόνες σποριαγγειακού αιωρήματος του ωομύκητα *P. infestans* (**P.i.**) στην κάτω επιφάνεια χωρίς την εφαρμογή οποιουδήποτε βακτηριακού στελέχους τα οποία αποτέλεσαν την επέμβαση του θετικού μάρτυρα και **γ)** Φυλλάρια τομάτας τα οποία μολύνθηκαν με σταγόνες σπορειαγγειακού αιωρήματος του ωομύκητα *P. infestans* στην κάτω επιφάνεια αφού προηγουμένως είχαν δεχθεί εφαρμογή (εμβάπτιση) με τα βακτηριακά αιωρήματα των στελεχών που επιλέχθηκαν από τις *in-vitro* βιοδοκιμές. Πιο συγκεκριμένα, τα υπό αξιολόγηση βακτηριακά στελέχη ήταν: **SAR5**, **SAR8**, **SAR9**, **SAR16**, **SAR44**, **SAR61**,**.SAR81**, **SAR83**, **SAR118**, **SAR119**, **SAR121**, **SAR125** και **SAR160**. Χρησιμοποιήθηκαν 10 φυλλάρια τομάτας ανά επέμβαση όπου σε 3 διαφορετικές θέσεις στην κάτω επιφάνεια του εκάστοτε φυλλαρίου εναποτέθηκε 1 σταγόνα μολύσματος (30 επαναλήψεις/επέμβαση).

Για την αξιολόγηση της κατασταλτικής δράσης των αποτελεσματικών βακτηριακών στελεχών έναντι του ***V. dahliae*** πραγματοποιήθηκαν **δύο ανεξάρτητα πειράματα,** ένα σε φυτά τομάτας και ένα σε φυτά μελιτζάνας. Το κάθε πείραμα περιλάμβανε: **α)** Φυτά μελιτζάνας ή τομάτας που ριζοποτήθηκαν με νερό και αποτέλεσαν τον αρνητικό μάρτυρα (**Control-**), **β)** Φυτά τα οποία μολύνθηκαν με το κονιδιακό αιώρημα του μύκητα *V. dahliae* χωρίς την εφαρμογή οποιουδήποτε βακτηριακού στελέχους τα οποία αποτέλεσαν την επέμβαση του θετικού μάρτυρα (**V.d.**), και **γ)** Φυτά τα οποία μολύνθηκαν με κονιδιακό αιώρημα του μύκητα *V. dahliae* αφού προηγουμένως είχαν δεχθεί εφαρμογή (ριζοπότισμα) με τα βακτηριακά αιωρήματα των στελεχών που επιλέχθηκαν από τις *in-vitro* βιοδοκιμές. Πιο συγκεκριμένα, τα υπό εξέταση βακτηριακά στελέχη ήταν: **SAR5**, **SAR15**, **SAR35**, **SAR36**, **SAR59**, **SAR60**, **SAR81**, **SAR85**, **SAR101**, **SAR118**, **SAR119**, **SAR120**, **SAR122**, **SAR125** και **SAR160**. Και στα δύο πειράματα η κάθε επέμβαση αποτελούνταν από 21 φυτά (21 επαναλήψεις/επέμβαση).

Για την στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε ανάλυση διακύμανσης της διασποράς (Analysis of Variance, **ANOVA**) προκειμένου να εκτιμηθεί η σημαντικότητα των επιμέρους επεμβάσεων στις *in-vitro, in-vivo* και *in-planta* βιοδοκιμές. Όπου οι μεταβλητές δεν ακολούθησαν την κανονική κατανομή, τα

δεδομένα μετασχηματίστηκαν σύμφωνα με την μετατροπή του τόξου ημιτόνιο (arcsin) πριν από την εφαρμογή της μεθόδου ανάλυσης της διασποράς. Επίσης, πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων για τον εντοπισμό στατιστικών διαφορών μεταξύ των επεμβάσεων χρησιμοποιώντας τη στατιστική δοκιμασία του ***F*** **(*p≤0.05*)**. Εφόσον διαπιστώθηκαν στατιστικές διαφορές, τα αποτελέσματα υποβλήθηκαν σε διαχωρισμό των μέσων όρων σύμφωνα με τη στατιστική δοκιμασία του ***Tukey***. Τέλος, υπολογίστηκαν οι μέσοι όροι (Mean), οι τυπικές αποκλίσεις (Standard Deviation) και τα τυπικά σφάλματα (Standard Error) των μετρήσεων.

3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

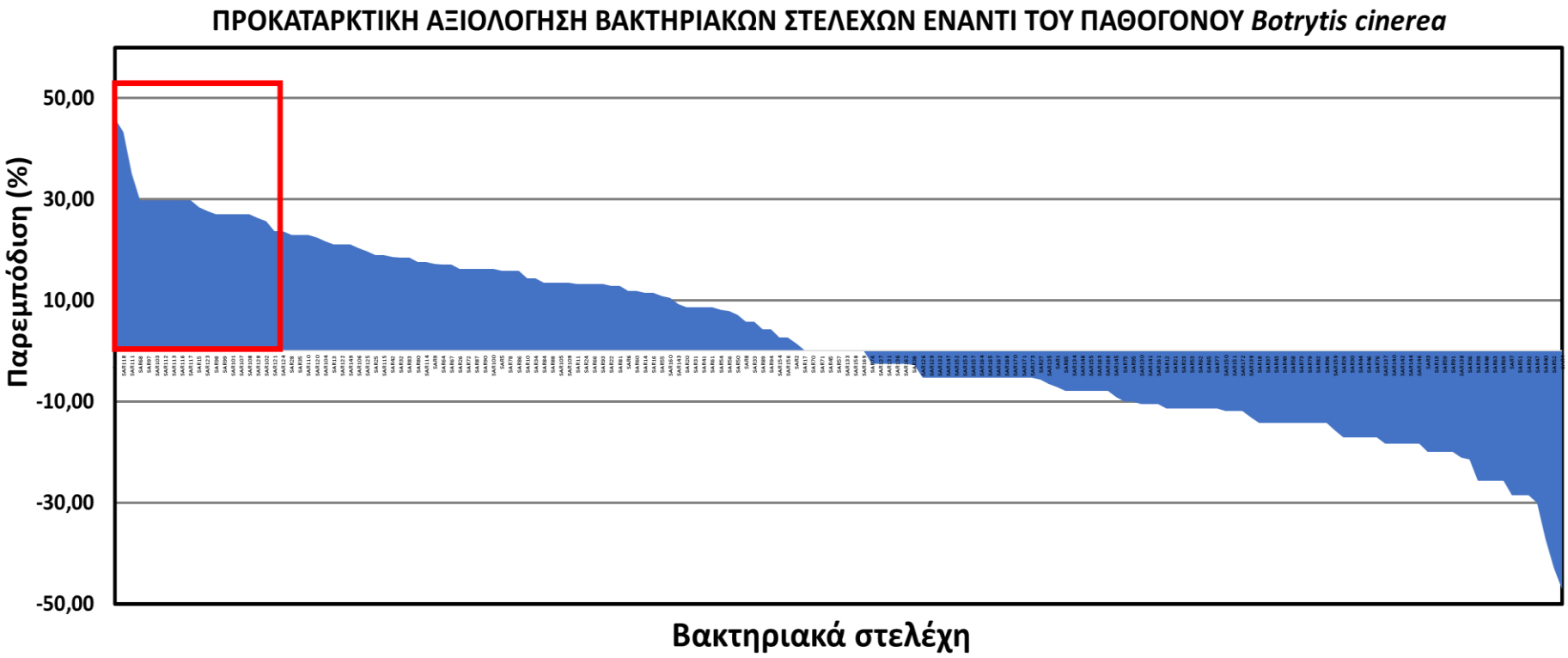
3.1 Αποτελέσματα αξιολόγησης βακτηριακών στελεχών έναντι του μύκητα Botrytis cinerea

3.1.1 Αποτελέσματα in-vitro βιοδοκιμών

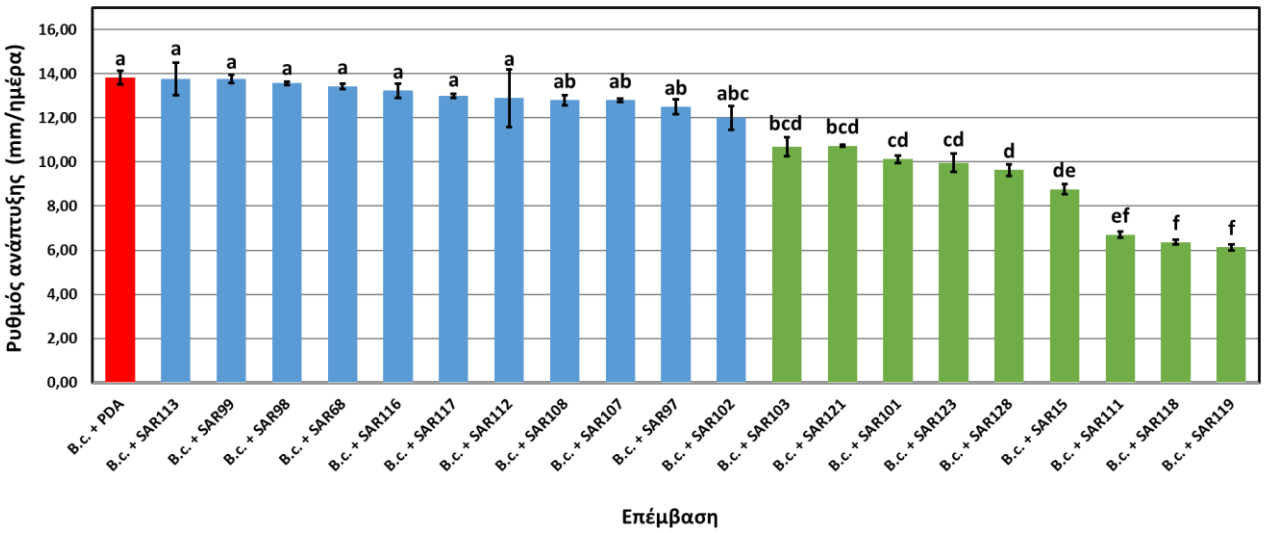
Από τα αποτελέσματα της **προκαταρκτικής αξιολόγησης** των 173 βακτηριακών στελεχών έναντι του μύκητα ***B. cinerea*** (απομόνωση Β.14.9) προέκυψε ότι **30 βακτηριακά στελέχη** εμφάνισαν αποτελεσματική παρεμποδιστική δράση (≥20%) (**Γράφημα 1**). Εξ' αυτών, επιλέχθηκαν τα 20 πιο αποτελεσματικά βακτηριακά στελέχη τα οποία αξιολογήθηκαν περαιτέρω σε διεξοδικές *in-vitro* βιοδοκιμές.

Όσον αφορά στα αποτελέσματα των **δοκιμών αντιπαραβολής** προκύπτει ότι **9 βακτηριακά στελέχη** (SAR15, SAR101, SAR103, SAR111, SAR118, SAR119, SAR121, SAR123 και SAR128**)** εμφάνισαν στατιστικά σημαντική μείωση του ρυθμού της μυκηλιακής ανάπτυξης (**Γράφημα 2**, **Εικόνα 19**) και **12 βακτηριακά στελέχη (**SAR15, SAR68, SAR99, SAR101, SAR102, SAR111, SAR116, SAR118, SAR119, SAR121, SAR123 και SAR128) επέφεραν στατιστικά σημαντική μείωση του πάχους των υφών του παθογόνου σε σύγκριση με τον μάρτυρα. Ωστόσο **κανένα** από τα υπό εξέταση βακτηριακά στελέχη δεν επέφερε στατιστικά σημαντικές μεταβολές στον αριθμό των παραγόμενων κονιδίων και σκληρωτιών (**Πίνακας 5**).

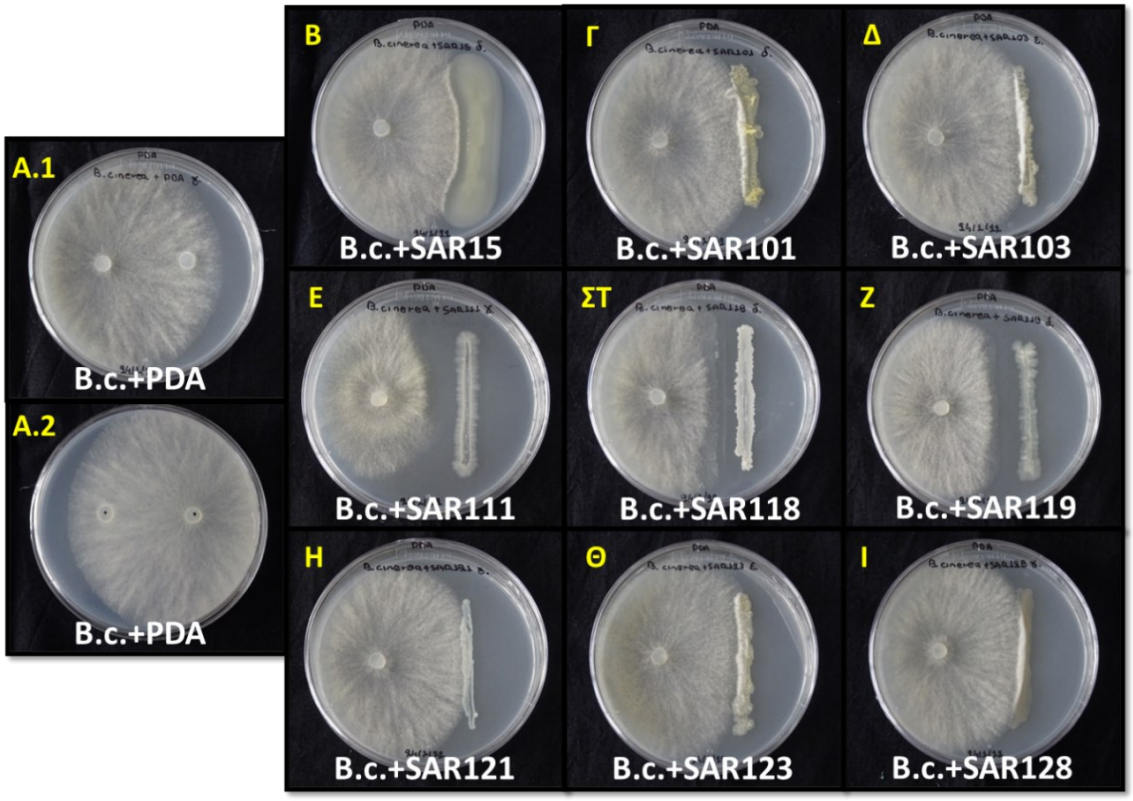
Όσον αφορά στα αποτελέσματα των **δοκιμών με πτητικά** προκύπτει ότι **6 βακτηριακά στελέχη** (SAR15, SAR103, SAR111, SAR118, SAR119, και SAR121) επέφεραν στατιστικά σημαντική μείωση του ρυθμού της μυκηλιακής ανάπτυξης (**Γράφημα 3**, **Εικόνα 20**) και **5 βακτηριακά στελέχη** (SAR111, SAR118, SAR119, SAR121 και SAR123) επέφεραν στατιστικά σημαντική μείωση του πάχους των υφών του παθογόνου, σε σύγκριση με το μάρτυρα. Τέλος, **κανένα** από τα υπό εξέταση βακτηριακά στελέχη δεν επέφερε στατιστικά σημαντικές μεταβολές στον αριθμό των παραγόμενων κονιδίων και μικροσκληρωτίων του παθογόνου (**Πίνακας 6**).



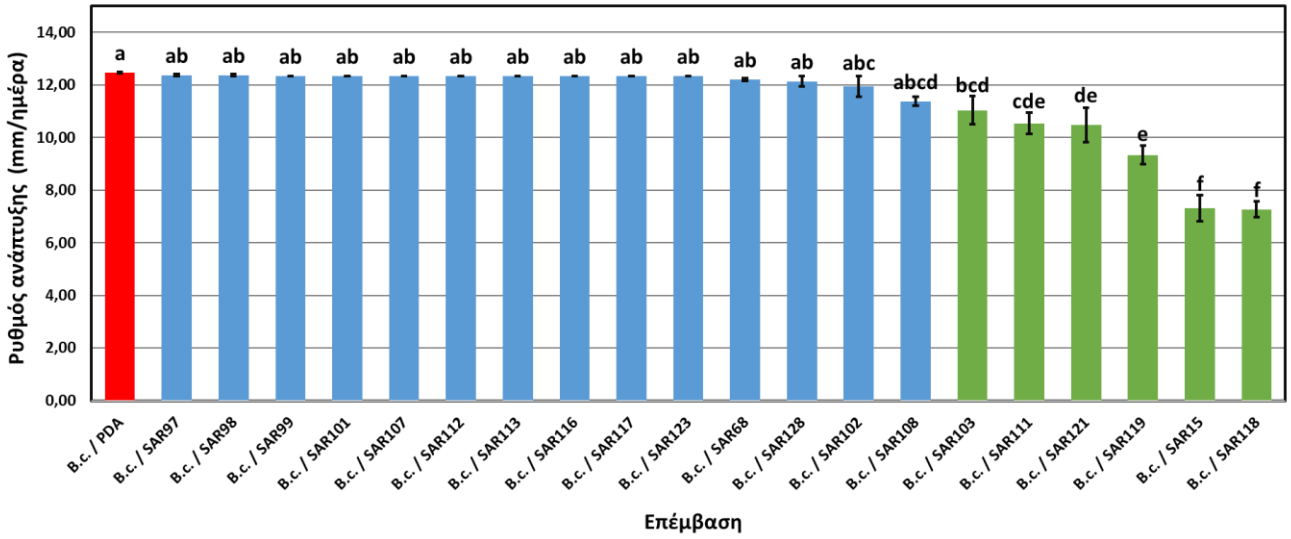
Γράφημα 1. Παρεμπόδιση (%) του ρυθμού της μυκηλιακής ανάπτυξης (mm/ημέρα) του παθογόνου ***B. cinerea*** (απομόνωση Β.14.9) από τα 173 βακτηριακά στελέχη, σε τυπικές δοκιμές αντιπαραβολής, στο πλαίσιο προκαταρκτικής αξιολόγησης. Στο κόκκινο πλαίσιο περιλαμβάνονται τα 20 πιο αποτελεσματικά βακτηριακά στελέχη τα οποία εξετάστηκαν περαιτέρω σε διεξοδικές *in-vitro* βιοδοκιμές.



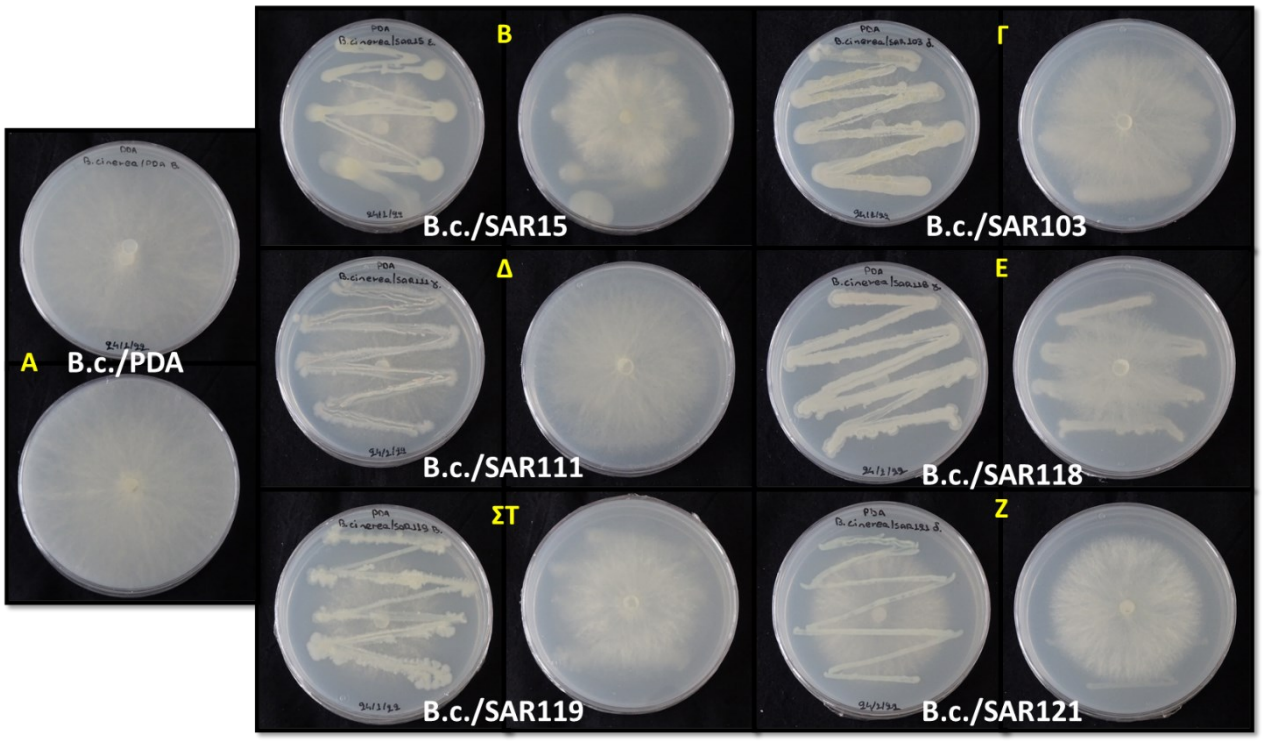
Γράφημα 2. Ρυθμός μυκηλιακής ανάπτυξης (mm/ημέρα) του μύκητα ***B. cinerea*** (απομόνωση Β.14.9) υπό την επίδραση των 20 πιο αποτελεσματικών βακτηριακών στελεχών σε **τυπικές δοκιμές αντιπαραβολής** (φθίνουσα κατάταξη). Η κόκκινη στήλη αντιπροσωπεύει τον μάρτυρα ενώ οι πράσινες στήλες τα βακτηριακά στελέχη που επέφεραν στατιστικά σημαντική μείωση του ρυθμού ανάπτυξης. Οι τιμές οι οποίες ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σύμφωνα με τη δοκιμασία *Tukey HSD* με $P \leq 0.05$.



Εικόνα 19. Αντιπροσωπευτικά τρυβλία των **δοκιμών αντιπαραβολής** όπου απεικονίζονται τα βακτηριακά στελέχη που επέδειξαν στατιστικά σημαντική μείωση στο ρυθμό μυκηλιακής ανάπτυξης του μύκητα ***B. cinerea***. **Α.1, Α.2)** Επάνω και κάτω όψη του μάρτυρα (Control) καθώς και οι επεμβάσεις με τα βακτηριακά στελέχη **Β)** SAR15, **Γ)** SAR101, **Δ)** SAR103, **Ε)** SAR111, **ΣΤ)** SAR118, **Ζ)** SAR119, **Η)** SAR121, **Θ)** SAR123 και **Ι)** SAR128.



Γράφημα 3. Ρυθμός μυκηλιακής ανάπτυξης (mm/ημέρα) του μύκητα ***B. cinerea*** (απομόνωση Β.14.9) υπό την επίδραση των 20 πιο αποτελεσματικών βακτηριακών στελεχών σε **δοκιμές πτητικών** (φθίνουσα κατάταξη). Η κόκκινη στήλη αντιπροσωπεύει το μάρτυρα ενώ οι πράσινες στήλες τα βακτηριακά στελέχη που επέφεραν στατιστικά σημαντική μείωση του ρυθμού ανάπτυξης. Οι τιμές οι οποίες ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σύμφωνα με τη δοκιμασία *Tukey HSD* με $P \leq 0.05$.



Εικόνα 20. Αντιπροσωπευτικά τρυβλία των **δοκιμών με πτητικά** όπου απεικονίζονται οι επεμβάσεις με τα βακτηριακά στελέχη που επέδειξαν στατιστικά σημαντική μείωση στο ρυθμό μυκηλιακής ανάπτυξης του μύκητα ***B. cinerea***. **Α)** ο μάρτυρας (Control) καθώς και οι επεμβάσεις με τα βακτηριακά στελέχη **Β)** SAR15, **Γ)** SAR103, **Δ)** SAR111, **Ε)** SAR118, **ΣΤ)** SAR119 και **Ζ)** SAR121.

Πίνακας 5. Μέσοι όροι και τυπικά σφάλματα (±) των μετρήσεων των μυκητολογικών παραμέτρων σε τυπικές **δοκιμές αντιπαραβολής** που προέκυψαν από την αξιολόγηση της αντιμικροβιακής δράσης των 20 πιο αποτελεσματικών βακτηριακών στελεχών έναντι του μύκητα ***B. cinerea***

Τύπος βιοδοκιμών	**Επέμβαση**	**Μυκητολογικοί παράμετροί**			
		Ρυθμός ανάπτυξης (mm/ημέρα)	**Αριθμός κονιδίων ($\times 10^5$)/ δισκίο διαμέτρου 5 mm**	**Πάχος υφών (μm)**	**Αριθμός σκληρωτίων**
Δοκιμές Αντιπαραβολής (Confrontation test)	**B.c. + PDA**	13.8±0.3 a	10.1±1.0 ab	10.4±0.3 a	7.0±1.4 ab
	B.c. + SAR15	8.8±0.2 de	6.0±1.1 ab	8.7±0.3 bcd	4.0±0.7 ab
	B.c. + SAR68	13.4±0.1 a	12.8±2.8 ab	9.0±0.2 bc	9.4±2.4 ab
	B.c. + SAR97	12.5±0.3 ab	8.9±1.0 ab	9.1±0.2 abc	20.0±6.0 a
	B.c. + SAR98	13.6±0.1 a	3.8±0.6 ab	9.1±0.3 abc	12.6±1.4 ab
	B.c. + SAR99	13.8±0.2 a	6.0±1.1 ab	8.6±0.3 bcd	10.0±2.3 ab
	B.c. + SAR101	10.1±0.2 cd	9.0±2.1 ab	8.8±0.3 bc	10.0±2.5 ab
	B.c. + SAR102	12.0±0.5 abc	7.2±1.7 ab	8.8±0.3 bc	5.0±2.2 ab
	B.c. + SAR103	10.7±0.4 bcd	13.3±3.5 ab	9.2±0.3 abc	9.2±2.7 ab
	B.c. + SAR107	12.8±0.1 ab	6.7±2.0 ab	9.3±0.3 abc	15.6±5.9 ab
	B.c. + SAR108	12.8±0.2 ab	8.8±2.1 ab	9.3±0.3 abc	12.6±3.0 ab
	B.c. + SAR111	6.7±0.1 ef	5.2±1.4 ab	7.4±0.3 d	1.2±0.6 b
	B.c. + SAR112	12.9±1.3 a	20.5±9.7 a	9.1±0.3 abc	14.8±4.1 ab
	B.c. + SAR113	13.8±0.7 a	10.6±2.0 ab	9.1±0.3 abc	12.2±3.2 ab
	B.c. + SAR116	13.2±0.3 a	7.3±3.3 ab	8.7±0.3 bcd	7.6±2.8 ab
	B.c. + SAR117	13.0±0.1 a	8.1±1.0 ab	9.6±0.3 ab	10.6±3.1 ab
	B.c. + SAR118	6.4±0.1 f	1.0±0.5 b	8.5±0.2 bcd	0.0±0.0 b
	B.c. + SAR119	6.1±0.1 f	0.8±0.3 b	8.3±0.2 bcd	0.2±0.2 b
	B.c. + SAR121	10.7±0.0 bcd	17.4±11.3 ab	8.2±0.3 cd	19.2±5.0 a
	B.c. + SAR123	10.0±0.4 cd	5.1±1.5 ab	9.0±0.3 bc	8.2±2.6 ab
	B.c. + SAR128	9.6±0.3 d	3.1±0.8 ab	8.6±0.2 bcd	7.2±3.8 ab

* Εντός των στηλών, οι τιμές οι οποίες ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σύμφωνα με τη δοκιμασία *Tukey HSD* με $P \leq 0.05$.

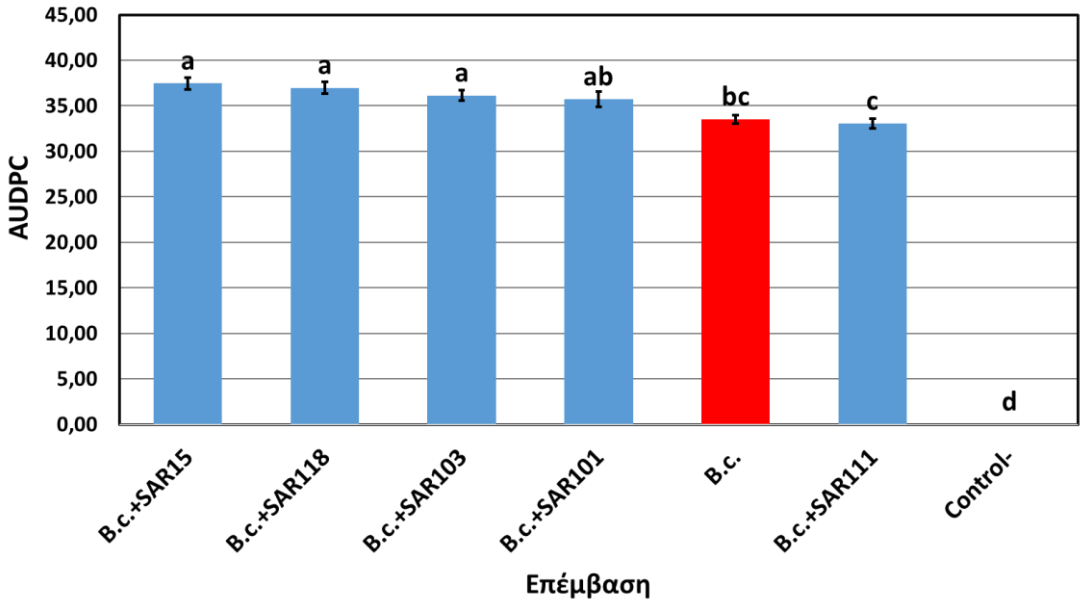
Πίνακας 6. Μέσοι όροι και τυπικά σφάλματα (±) των μετρήσεων των μυκητολογικών παραμέτρων σε **δοκιμές με πτητικά** που προέκυψαν από την αξιολόγηση της αντιμικροβιακής δράσης των 20 πιο αποτελεσματικών βακτηριακών στελεχών έναντι του μύκητα ***B. cinerea***

Τύπος βιοδοκιμών	Επέμβαση	Μυκητολογικοί παράμετροι			
		Ρυθμός ανάπτυξης (mm/ημέρα)	Αριθμός κονιδίων ($\times 10^5$)/ δισκίο διαμέτρου 5 mm	Πάχος υφών (μm)	Αριθμός σκληρωτίων
Δοκιμές πτητικών (Volatile test)	**B.c. / PDA**	12.5±0.0 a	5.4±2.5 a	8.3±0.3 abc	0.0±0.0 a
	B.c. / SAR15	7.3±0.5 f	0.1±0.1 a	8.1±0.2 bcd	0.0±0.0 a
	B.c. / SAR68	12.2±0.1 ab	0.1±0.1 a	9.7±0.4 a	0.0±0.0 a
	B.c. / SAR97	12.4±0.0 ab	3.8±3.8 a	9.5±0.3 ab	0.0±0.0 a
	B.c. / SAR98	12.4±0.0 ab	0.4±0.2 a	8.8±0.3 ab	0.0±0.0 a
	B.c. / SAR99	12.3±0.0 ab	0.6±0.5 a	9.1±0.2 ab	0.0±0.0 a
	B.c. / SAR101	12.3±0.0 ab	0.3±0.3 a	8.2±0.2 bcd	0.0±0.0 a
	B.c. / SAR102	11.9±0.4 abc	3.3±3.1 a	8.1±0.3 bcd	0.0±0.0 a
	B.c. / SAR103	11.0±0.5 bcd	0.0±0.0 a	9.7±0.4 a	0.0±0.0 a
	B.c. / SAR107	12.3±0.0 ab	8.3±3.2 a	8.9±0.2 ab	0.0±0.0 a
	B.c. / SAR108	11.4±0.2 abcd	0.0±0.0 a	9.5±0.3 ab	0.0±0.0 a
	B.c. / SAR111	10.5±0.4 cde	0.0±0.0 a	6.7±0.2 de	0.0±0.0 a
	B.c. / SAR112	12.3±0.0 ab	0.1±0.1 a	8.9±0.3 ab	0.0±0.0 a
	B.c. / SAR113	12.3±0.0 ab	2.8±2.1 a	9.7±0.3 a	0.0±0.0 a
	B.c. / SAR116	12.3±0.0 ab	7.0±4.3 a	7.1±0.3 cde	0.0±0.0 a
	B.c. / SAR117	12.3±0.0 ab	0.8±0.5 a	9.3±0.2 ab	0.0±0.0 a
	B.c. / SAR118	7.3±0.3 f	0.0±0.0 a	5.2±0.3 fg	0.0±0.0 a
	B.c. / SAR119	9.3±0.3 e	0.9±0.6 a	6.1±0.3 efg	0.0±0.0 a
	B.c. / SAR121	10.5±0.7 de	0.0±0.0 a	4.8±0.2 f	0.0±0.0 a
	B.c. / SAR123	12.3±0.0 ab	0.5±0.5 a	6.5±0.4 ef	0.0±0.0 a
	B.c. / SAR128	12.1±0.2 ab	0.5±0.5 a	9.3±0.3 ab	0.0±0.0 a

* Εντός των στηλών, οι τιμές οι οποίες ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σύμφωνα με τη δοκιμασία *Tukey HSD* με $P \leq 0.05$.

3.1.2 Αποτελέσματα in-planta βιοδοκιμών σε φυτά τομάτας

Αναφορικά με τα αποτελέσματα του 1ου πειράματος των *in-planta* βιοδοκιμών του παθοσυστήματος **τομάτας-*B. cinerea*, κανένα από τα υπό αξιολόγηση βακτηριακά στελέχη** δεν ήταν ικανό να μειώσει την συμπτωματολογία της ασθένειας του βοτρύτη στα φύλλα της τομάτας. Αντίθετα, **ένα βακτηριακό στέλεχος** (SAR15) επέφερε στατιστικά μεγαλύτερη τιμή της τελικής διαμέτρου της αναπτυσσόμενης κηλίδας στις 3 ημέρες από τη μόλυνση ενώ **3 βακτηριακά στελέχη** (SAR15, SAR103 και SAR118) επέφεραν στατιστικά υψηλότερες τιμές της AUDPC σε σύγκριση με το θετικό μάρτυρα (**Γράφημα 4**, **Πίνακας 7** και **Εικόνα 21**).

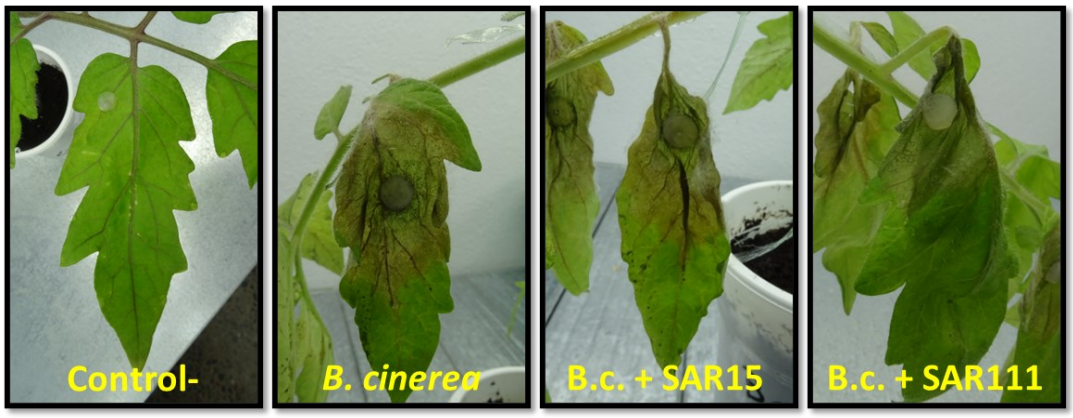


Γράφημα 4. AUDPC σε φυλλάρια τομάτας των επεμβάσεων του αρνητικού (Control-) και του θετικού μάρτυρα (B.c.) καθώς και των επεμβάσεων με τα πέντε υπό αξιολόγηση βακτηριακά στελέχη. Η κόκκινη μπάρα αντιπροσωπεύει την επέμβαση του θετικού μάρτυρα. Οι τιμές οι οποίες ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σύμφωνα με τη δοκιμασία *Tukey HSD* με $P \leq 0.05$.

Πίνακας 7. Μέσες τιμές και τυπικά σφάλματα (±) των μετρήσεων των παραμέτρων της ασθένειας του βοτρύτη σε φυλλάρια τομάτας

	Παράμετροι ασθένειας	
Επέμβαση	**Τελική διάμετρος κηλίδας (mm)**	**AUDPC**
Control-	0.0±0.0 c	0.0±0.0 d
B.c.	21.6±0.4 b	33.5±0.5 bc
B.c.+SAR15	24.7±1.0 a	37.5±0.6 a
B.c.+SAR101	22.3±0.5 b	35.7±0.8 ab
B.c.+SAR103	22.4±0.6 b	36.1±0.6 a
B.c.+SAR111	21.6±0.4 b	33.0±0.5 c
B.c.+SAR118	22.0±0.5 b	37.0±0.6 a

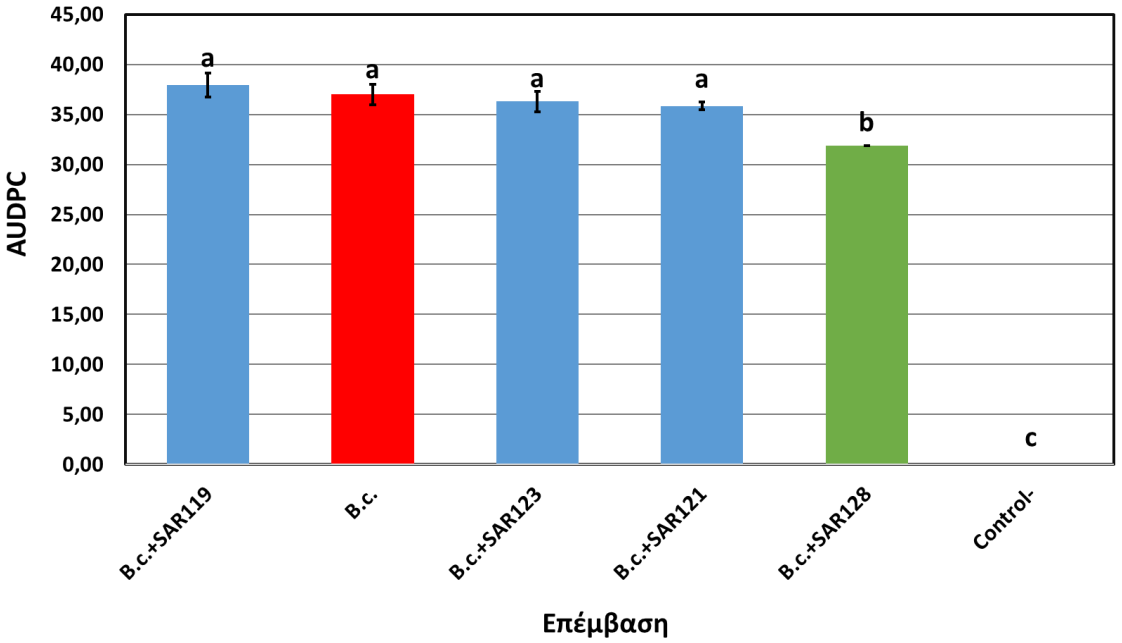
*Εντός των στηλών, οι τιμές οι οποίες ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σύμφωνα με τη δοκιμασία *Tukey HSD* με $P \leq 0.05$.



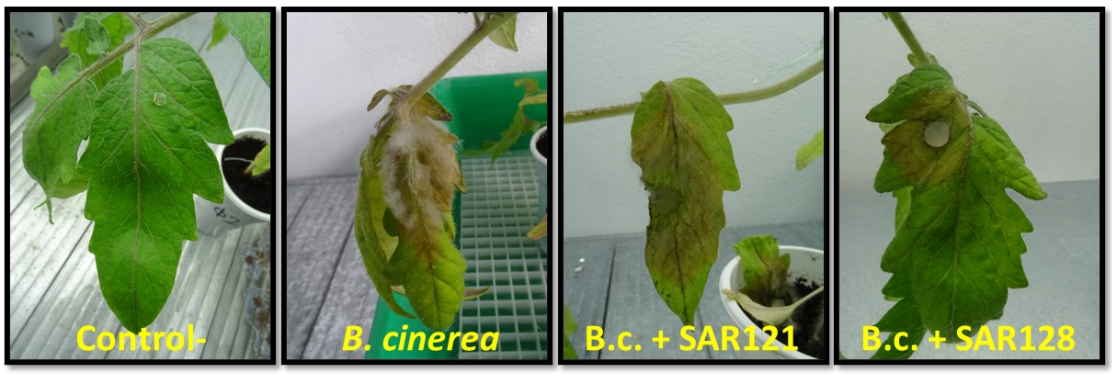
Εικόνα 21. Συμπτώματα του βοτρύτη σε φυλλάρια τομάτας των επεμβάσεων **Control-**, ***B.cinerea*, B.c.+SAR15** και **B.c.+SAR111,** στις 3 ημέρες από την μόλυνση.

Αναφορικά με τα αποτελέσματα του 2ου πειράματος των *in-planta* βιοδοκιμών του παθοσυστήματος **τομάτας-*B. cinerea*, 1 βακτηριακό στέλεχος (SAR128)** φαίνεται ότι είναι ικανό να μειώνει τα συμπτώματα της ασθένειας του βοτρύτη στα φύλλα της τομάτας, καθώς επέφερε σημαντικά στατιστικές διαφορές σε σύγκριση με το θετικό μάρτυρα τόσο στη τελική διάμετρο της κηλίδας (mm) όσο και στη AUDPC. Όλες οι υπόλοιπες στατιστικές διαφορές παρατηρούνται μεταξύ του αρνητικού μάρτυρα και των λοιπών επεμβάσεων (**Γράφημα 5**, **Πίνακας 8** και **Εικόνα 22**).

Από την ανάλυση των φασματικών δεδομένων εντοπίστηκαν στατιστικές διαφορές μεταξύ της αποτελεσματικής επέμβασης (SAR128) και του θετικού μάρτυρα στους εξής δείκτες: **GNDVI** (στις 1, 2 και 3 ημέρες από την μόλυνση), **NDVI** (στις 1, 2 και 3 ημέρες από την μόλυνση), **TVI** (στις 1 και 3 ημέρες από τη μόλυνση) και **EVI** (στις 1, 2 και 3 ημέρες από την μόλυνση). Στην περίπτωση του δείκτη **CVI**, παρατηρούνται τιμές πάνω από το ανώτατο όριο (+1). Αυτό πιθανόν να οφείλεται στον φωτισμό κατά την διάρκεια της λήψης ο οποίος επέφερε κορεσμό στους χάρτες που σχηματίστηκαν (**Γράφημα 6**).



Γράφημα 5. AUDPC σε φυλλάρια τομάτας των επεμβάσεων του αρνητικού (Control-) και του θετικού μάρτυρα (B.c.) καθώς και των επεμβάσεων με τα τέσσερα υπό αξιολόγηση βακτηριακά στελέχη. Οι τιμές οι οποίες ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σύμφωνα με τη δοκιμασία *Tukey HSD* με $P \leq 0.05$.

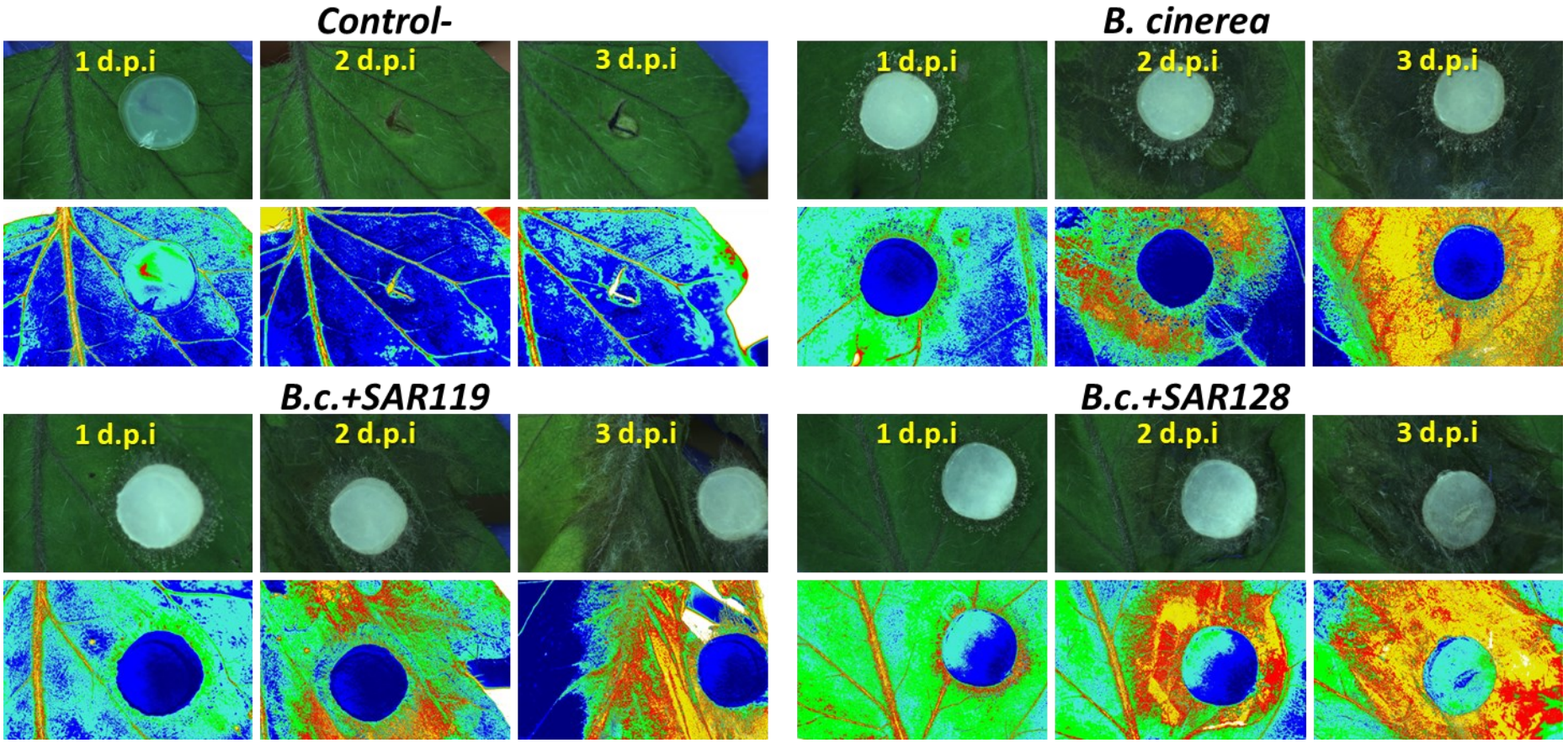


Εικόνα 22. Συμπτώματα της ασθένειας του βοτρύτη σε φυλλάρια τομάτας των επεμβάσεων **Control-**, ***B.cinerea*, B.c.+SAR121** και **B.c.+SAR128**, στις 3 ημέρες από την μόλυνση.

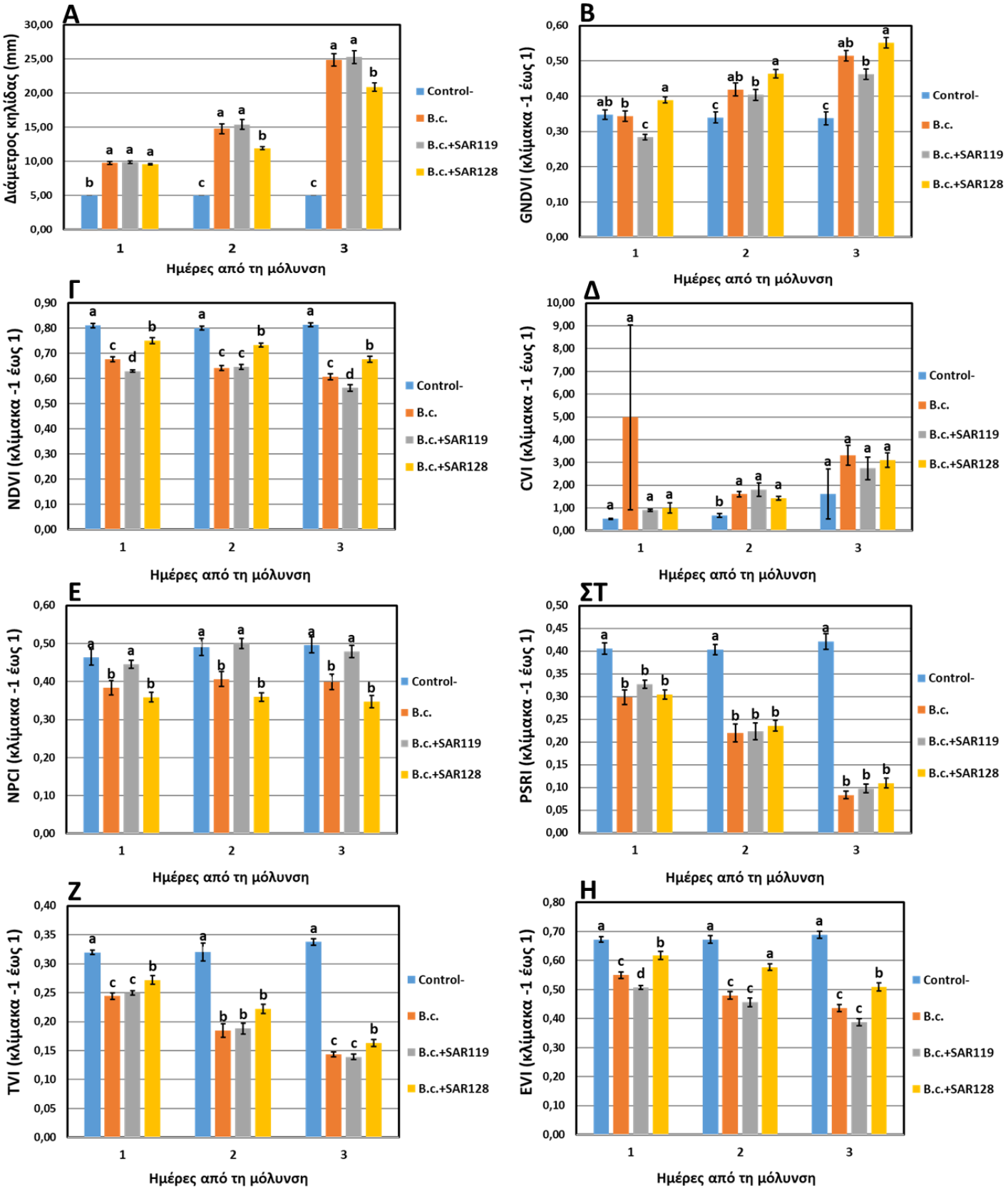
Πίνακας 8. Μέσες τιμές και τυπικά σφάλματα (±) των μετρήσεων των παραμέτρων της ασθένειας του βοτρύτη σε φυλλάρια τομάτας.

	Παράμετροι ασθένειας	
Επέμβαση	**Τελική διάμετρος κηλίδας (mm)**	**AUDPC**
Control-	0.0±0.0 c	0.0±0.0 c
B.c.	24.9±0.9 a	37.0±1.2 a
B.c.+SAR119	25.3±1.0 a	37.9±1.2 a
B.c.+SAR121	23.7±0.9 ab	35.8±1.0 a
B.c.+SAR123	24.2±1.1 a	36.3±1.0 a
B.c.+SAR128	20.9±0.6 b	31.9±0.4 b

*Εντός των στηλών, οι τιμές οι οποίες ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σύμφωνα με τη δοκιμασία *Tukey HSD* με $P \leq 0.05$.



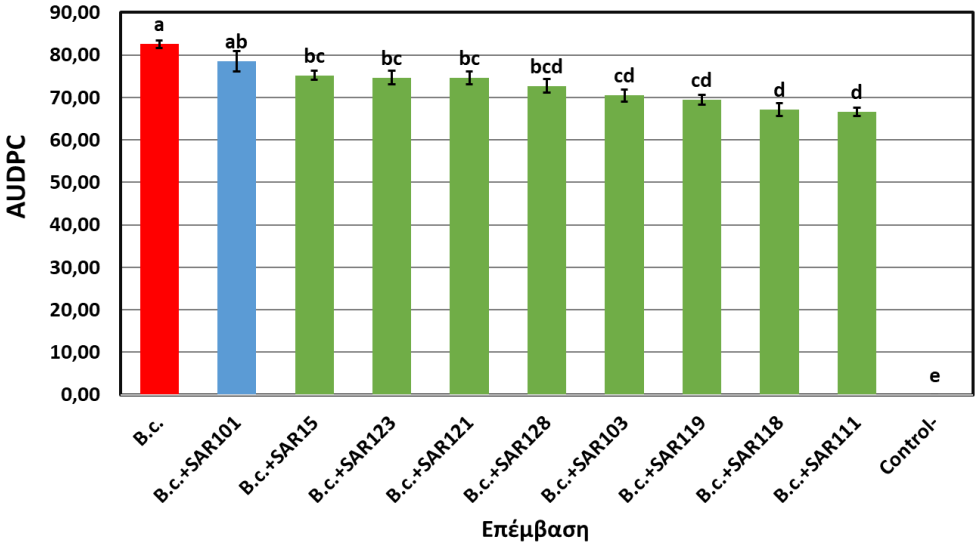
Εικόνα 23. Φάσματα αντιπροσωπευτικών φυλλαρίων των επεμβάσεων **Control-**, **B.c.**, **B.c.+SAR119** και **B.c.+SAR128** που ελήφθησαν στις 1, 2 και 3 ημέρες από τη μόλυνση με το μύκητα *B. cinerea*. **Πάνω**: Έγχρωμες εικόνες (color) και **Κάτω**: Υπερφασματικός χάρτης του δείκτη βλάστησης GNDVI.



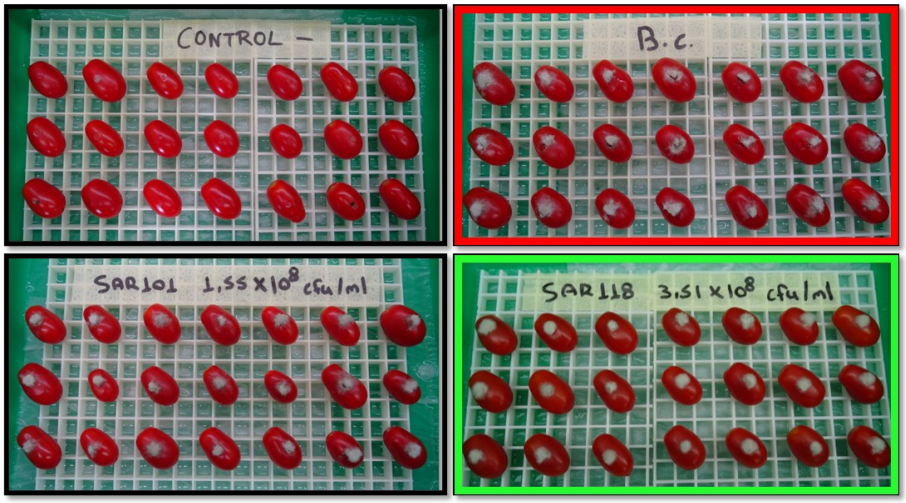
Γράφημα 6. Αποτελέσματα συμπτωμάτων και δεικτών βλάστησης σε σημασμένα φυλλάρια τομάτας των επεμβάσεων **Control-**, **B.c.**, **B.c.+SAR119** και **B.c.+SAR128** που ελήφθησαν στις 1, 2 και 3 ημέρες από τη μόλυνση με το μύκητα *B. cinerea*. **Α.** Ένταση ασθένειας και δεδομένα των δεικτών βλάστησης **Β.** GNDVI, **Γ.** NDVI, **Δ.** CVI, **Ε.** NPCI, **ΣΤ.** PSRI, **Ζ.** TVI και **Η.** EVI.

3.1.3 Αποτελέσματα in-vivo βιοδοκιμών σε καρπούς τομάτας

Αναφορικά με τα αποτελέσματα του 1ου πειράματος των *in-vivo* βιοδοκιμών του παθοσυστήματος **τομάτα-*B. cinerea*** (μόλυνση με δισκίο φρέσκιας καλλιέργειας του παθογόνου), **8 βακτηριακά στελέχη** (SAR15, SAR103, SAR111, SAR118, SAR119, SAR121, SAR123 και SAR128) επέφεραν στατιστικά σημαντική μείωση των τιμών της AUDPC στους καρπούς της τομάτας σε σύγκριση με το θετικό μάρτυρα. Ωστόσο από αυτά τα στελέχη, μόνο το **SAR118** και το **SAR119** επέφεραν σημαντικές στατιστικές διαφορές στη τελική διάμετρο της κηλίδα στις 3 ημέρες από τη μόλυνση (**Γράφημα 7**, **Πίνακας 9** και **Εικόνα 24**).



Γράφημα 7. AUDPC σε καρπούς τομάτας των επεμβάσεων του αρνητικού (Control-) και του θετικού μάρτυρα (B.c.) καθώς και των επεμβάσεων με τα εννέα υπό αξιολόγηση βακτηριακά στελέχη. Οι τιμές οι οποίες ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σύμφωνα με τη δοκιμασία *Tukey HSD* με $P \leq 0.05$.



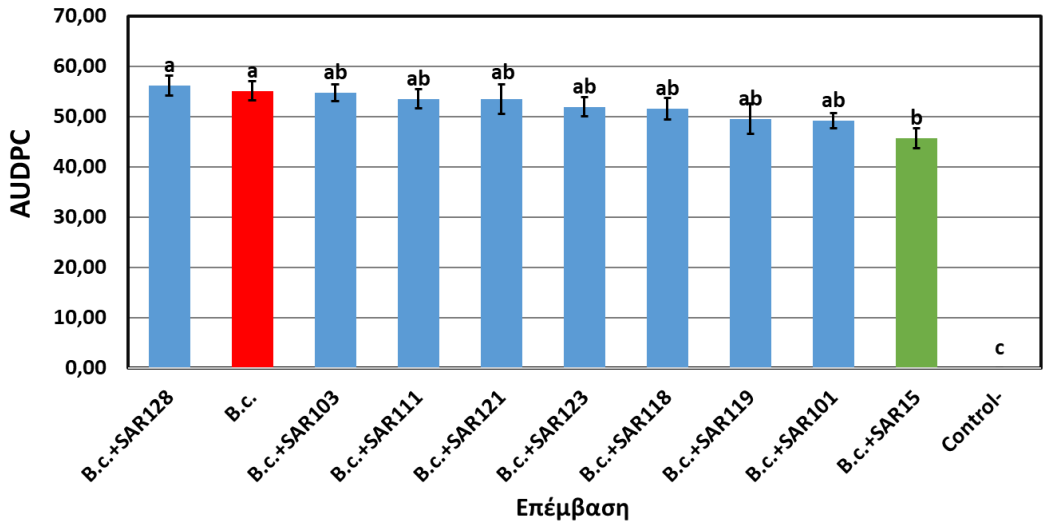
Εικόνα 24. Συμπτώματα της ασθένειας του βοτρύτη σε καρπούς τομάτας των επεμβάσεων **Control-**, ***B. cinerea*, B.c.+SAR101** και **B.c.+SAR118,** στις 6 ημέρες από τη μόλυνση.

Πίνακας 9. Μέσες τιμές και τυπικά σφάλματα (±) των μετρήσεων των παραμέτρων της ασθένειας του βοτρύτη σε καρπούς τομάτας που μολύνθηκαν τεχνητά με δισκίο φρέσκιας καλλιέργειας του παθογόνου

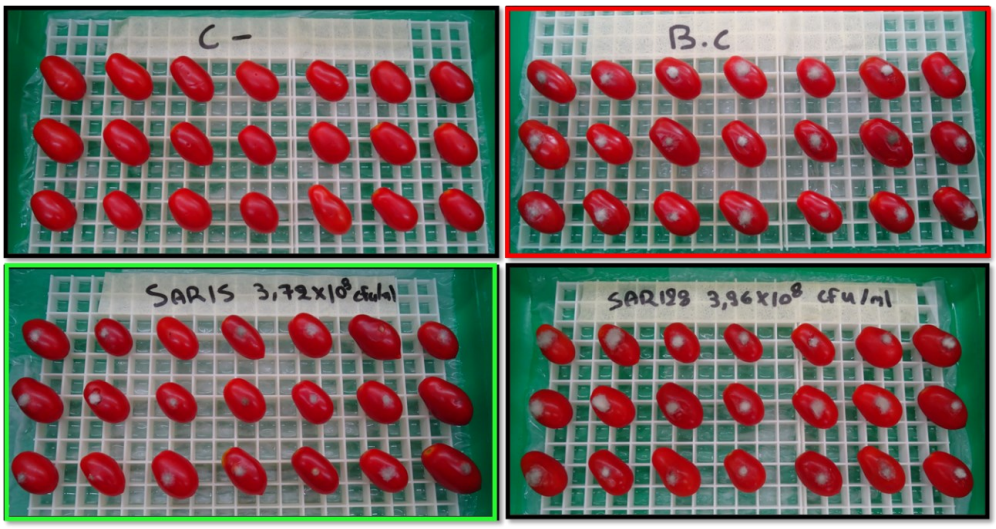
	Παράμετροι ασθένειας	
Επέμβαση	**Τελική διάμετρος κηλίδας (mm)**	**AUDPC**
Control-	0.0±0.0 d	0.0±0.0 e
B.c.	24.2±0.4 ab	82.6±0.9 a
B.c.+SAR15	21.0±0.5 bc	75.2±1.1 bc
B.c.+SAR101	24.4±1.2 a	78.5±2.4 ab
B.c.+SAR103	22.0±1.0 abc	70.5±1.4 cd
B.c.+SAR111	20.9±0.6 bc	66.6±1.0 d
B.c.+SAR118	19.5±0.7 c	67.1±1.6 d
B.c.+SAR119	20.6±0.8 c	69.4±1.2 cd
B.c.+SAR121	21.2±0.7 abc	74.6±1.5 bc
B.c.+SAR123	21.3±0.5 abc	74.7±1.5 bc
B.c.+SAR128	21.3±0.6 abc	72.7±1.7 bcd

*Εντός των στηλών, οι τιμές οι οποίες ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σύμφωνα με τη δοκιμασία *Tukey HSD* με $P \leq 0.05$.

Όσον αφορά στα αποτελέσματα του 2ου πειράματος των *in-vivo* βιοδοκιμών του παθοσυστήματος **τομάτας-*B. cinerea*** (μόλυνση με κονιδιακό αιώρημα του παθογόνου), **ένα βακτηριακό στέλεχος** (SAR15) επέδειξε στατιστικά σημαντικές διαφορές στη AUDPC σε σύγκριση με τον θετικό μάρτυρα. Ωστόσο, **κανένα** από τα υπό αξιολόγηση βακτηριακά στελέχη δεν επέδειξε στατιστικές διαφορές στη τελική διάμετρο της αναπτυσσόμενης κηλίδας και οι μόνες διαφορές που παρατηρούνται είναι αυτές μεταξύ των επεμβάσεων του *B. cinerea* με τον αρνητικό μάρτυρα (**Γράφημα 8**, **Πίνακας 10** και **Εικόνα 25**).



Γράφημα 8. AUDPC σε καρπούς τομάτας των επεμβάσεων του αρνητικού (Control-) και του θετικού μάρτυρα (B.c.) καθώς και των επεμβάσεων με τα εννέα υπό αξιολόγηση βακτηριακά στελέχη. Η πράσινη μπάρα αντιπροσωπεύει την επέμβαση που επέφερε στατιστικές διαφορές σε σύγκριση με τον θετικό μάρτυρα (κόκκινη μπάρα) σύμφωνα με την στατιστική δοκιμασία του *Tukey*.



Εικόνα 25. Συμπτώματα της ασθένειας του βοτρύτη σε καρπούς τομάτας των επεμβάσεων **Control-, *B. cinerea*, B.c.+SAR15** και **B.c.+SAR128,** στις 6 ημέρες από την μόλυνση.,

Πίνακας 10. Μέσες τιμές και τυπικά σφάλματα (±) των μετρήσεων των παραμέτρων της ασθένειας του βοτρύτη σε καρπούς τομάτας που μολύνθηκαν τεχνητά με σταγόνα κονιδιακού αιωρήματος του παθογόνου

	Παράμετροι ασθένειας	
Επέμβαση	**Τελική διάμετρος κηλίδας (mm)**	**AUDPC**
Control-	2.0±0.0 b	0.0±0.0 c
B.c.	18.7±1.1 a	55.1±1.9 a
B.c.+SAR15	14.9±1.2 a	45.6±2.0 b
B.c.+SAR101	16.2±0.8 a	49.1±1.5 ab
B.c.+SAR103	17.9±0.9 a	54.7±1.7 ab
B.c.+SAR111	18.1±1.0 a	53.5±1.9 ab
B.c.+SAR118	17.2±1.0 a	51.5±2.2 ab
B.c.+SAR119	15.0±1.1 a	49.5±3.0 ab
B.c.+SAR121	17.4±1.2 a	53.5±3.0 ab
B.c.+SAR123	17.0±0.9 a	51.9±1.9 ab
B.c.+SAR128	19.0±1.0 a	56.1±1.9 a

*Εντός των στηλών, οι τιμές οι οποίες ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σύμφωνα με τη δοκιμασία *Tukey HSD* με $P \leq 0.05$.

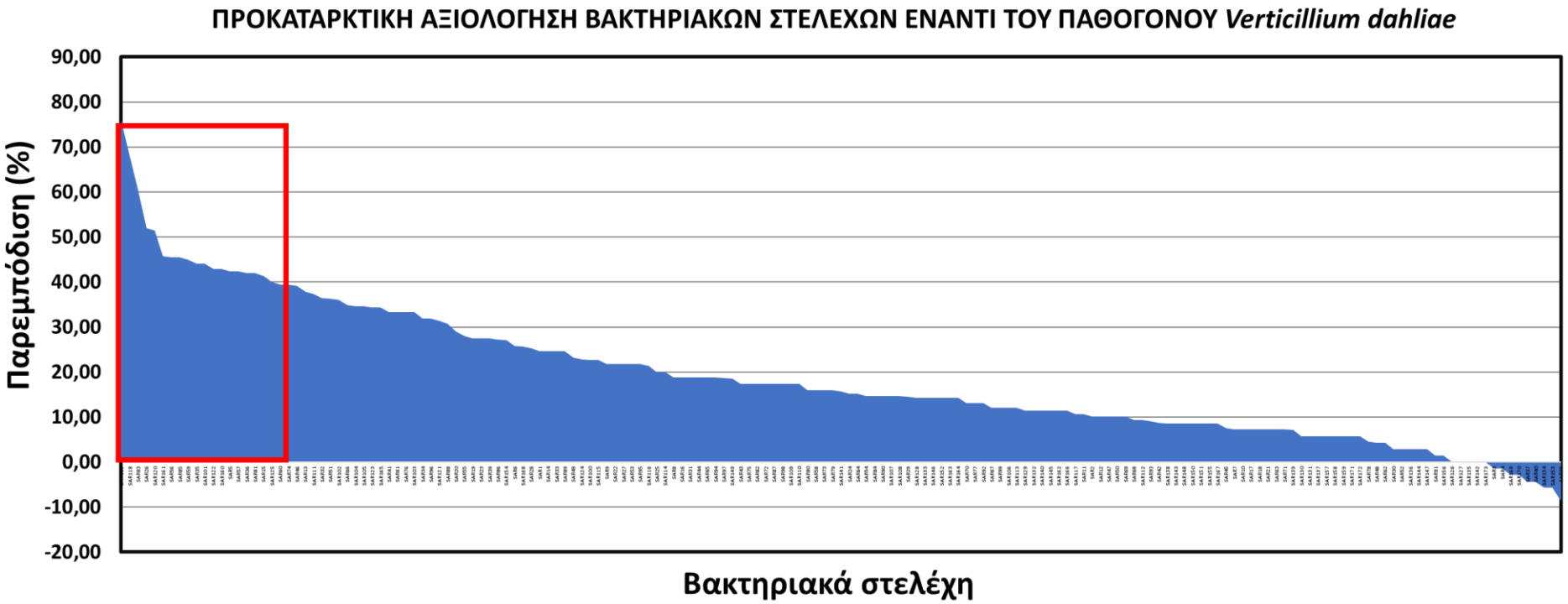
3.2 Αποτελέσματα αξιολόγησης βακτηριακών στελεχών έναντι του μύκητα Verticillium dahliae

3.2.1 Αποτελέσματα in-vitro βιοδοκιμών

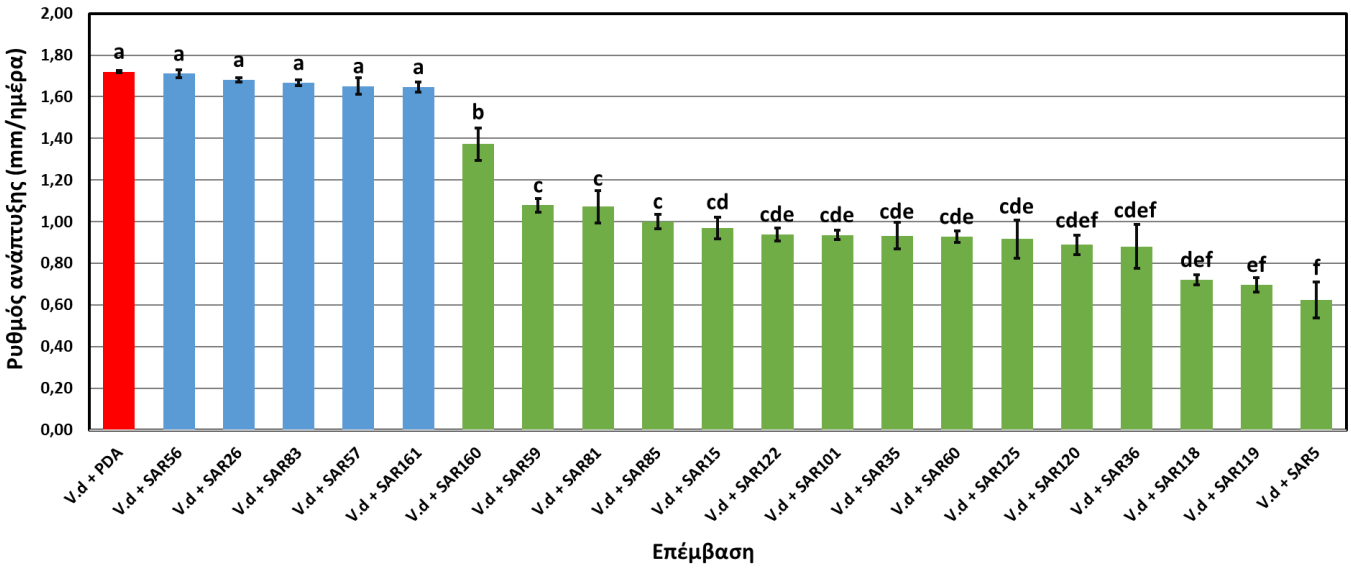
Από τα αποτελέσματα της **προκαταρκτικής αξιολόγησης** των 173 βακτηριακών στελεχών έναντι του μύκητα ***V. dahliae*** (απομόνωση 999-1) προέκυψε ότι **66 βακτηριακά στελέχη** επέφεραν αποτελεσματική παρεμποδιστική δράση (≥20%) (**Γράφημα 9**). Εξ' αυτών, επιλέχθηκαν τα 20 πιο αποτελεσματικά βακτηριακά στελέχη τα οποία αξιολογήθηκαν περαιτέρω σε διεξοδικές *in-vitro* βιοδοκιμές.

Όσον αφορά στα αποτελέσματα των **δοκιμών αντιπαραβολής** προέκυψε ότι **15 βακτηριακά στελέχη** (SAR5, SAR15, SAR35, SAR36, SAR59, SAR60, SAR81, SAR85, SAR101, SAR118, SAR119, SAR120, SAR122, SAR125 και SAR160) προκάλεσαν στατιστικά σημαντική μείωση του ρυθμού της μυκηλιακής ανάπτυξης (**Γράφημα 10**, **Εικόνα 26**), **12 βακτηριακά στελέχη** (SAR35, SAR36, SAR60, SAR81, SAR85, SAR101, SAR118, SAR119, SAR120, SAR122, SAR125, και SAR160) επέφεραν στατιστικά σημαντική μείωση στο πάχος των υφών και **16 βακτηριακά στελέχη** (SAR5, SAR15, SAR35, SAR36, SAR59, SAR60, SAR81, SAR83, SAR85, SAR101, SAR118, SAR119, SAR120, SAR122, SAR125 και SAR160) επέφεραν στατιστικά σημαντική μείωση του εμβαδού των παραγόμενων μικροσκληρωτίων. Τέλος, **κανένα** από τα υπό εξέταση βακτηριακά στελέχη δεν επέφερε στατιστικά σημαντικές μεταβολές στον αριθμό των παραγόμενων κονιδίων (**Πίνακας 11**).

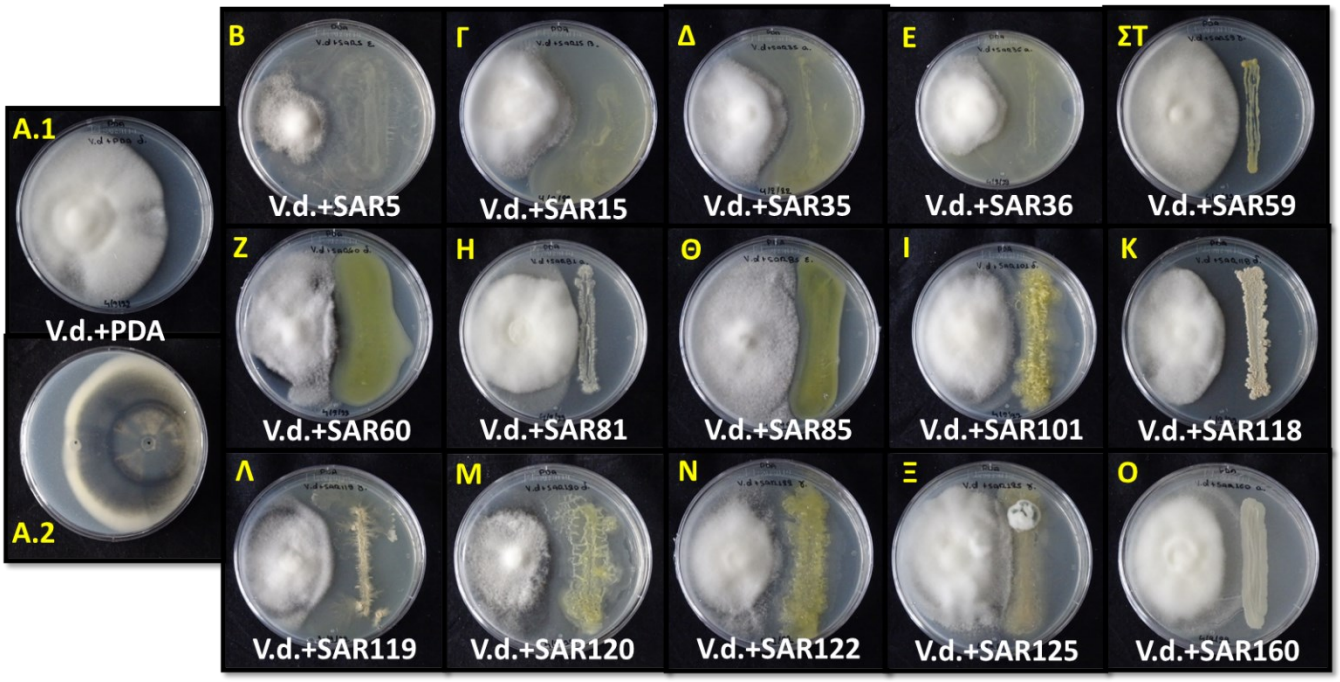
Όσον αφορά στα αποτελέσματα των **δοκιμών με πτητικά** προέκυψε ότι **8 βακτηριακά στελέχη** (SAR15, SAR60, SAR101, SAR118, SAR119, SAR120, SAR125 και SAR160) εμφάνισαν στατιστικά σημαντική μείωση του ρυθμού της μυκηλιακής ανάπτυξης (**Γράφημα 11**, **Εικόνα 27**), **3 βακτηριακά στελέχη** (SAR60, SAR118 και SAR119) επέφεραν στατιστικά σημαντική μείωση του πάχους των υφών και **2 βακτηριακά στελέχη** (SAR118 και SAR119) επέφεραν στατιστικά σημαντική μείωση στον αριθμό των παραγόμενων κονιδίων. Ωστόσο, **κανένα** από τα υπό εξέταση βακτηριακά στελέχη δεν επέφερε στατιστικά σημαντικές μεταβολές στο εμβαδόν των παραγόμενων μικροσκληρωτίων (**Πίνακας 12**).



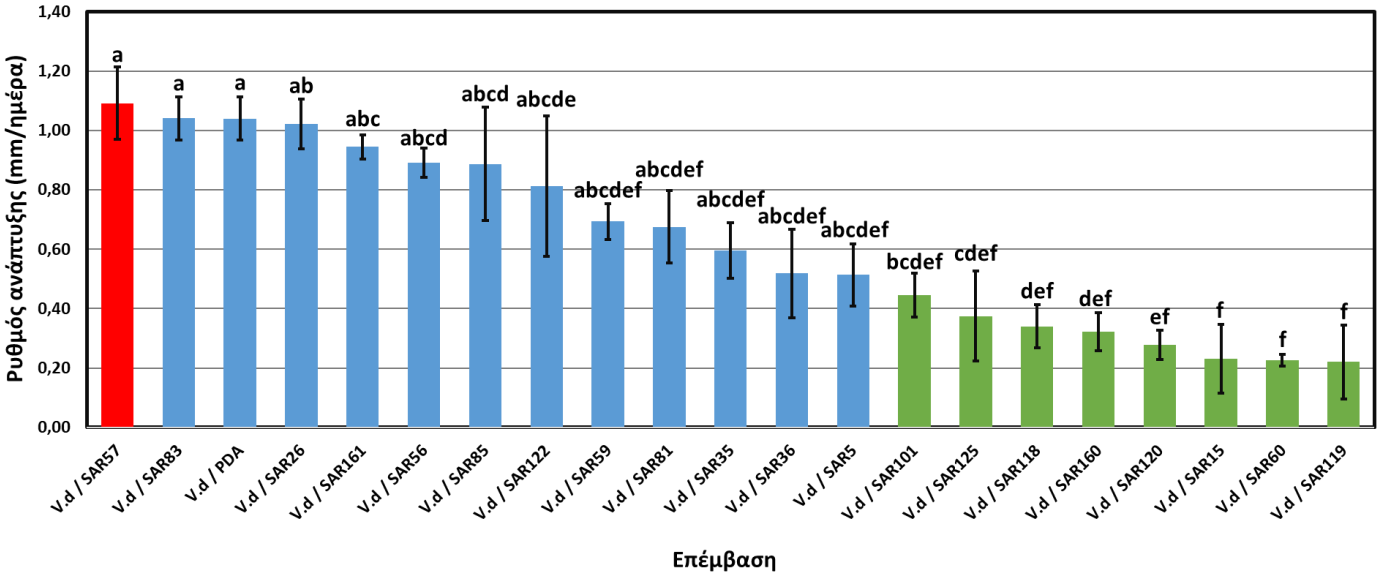
Γράφημα 9. Παρεμπόδιση (%) του ρυθμού της μυκηλιακής ανάπτυξης (mm/ημέρα) του παθογόνου ***V. dahliae*** (απομόνωση 999-1) από τα 173 βακτηριακά στελέχη σε τυπικές δοκιμές αντιπαραβολής, στο πλαίσιο της προκαταρκτικής αξιολόγησης. Στο κόκκινο πλαίσιο περιλαμβάνονται τα 20 πιο αποτελεσματικά βακτηριακά στελέχη τα οποία εξετάστηκαν περαιτέρω σε διεξοδικές *in-vitro* βιοδοκιμές.



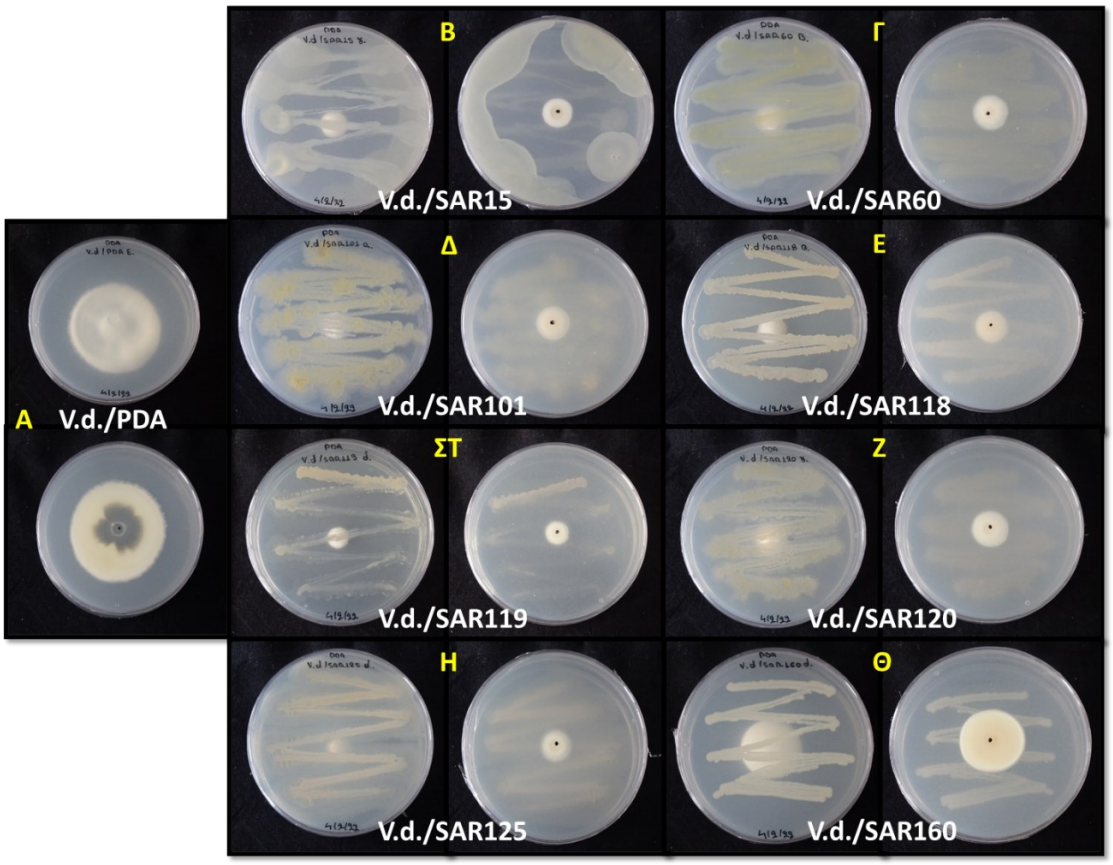
Γράφημα 10. Ρυθμός μυκηλιακής ανάπτυξης (mm/ημέρα) του μύκητα ***V. dahliae*** (απομόνωση 999-1) υπό την επίδραση των 20 πιο αποτελεσματικών βακτηριακών στελεχών σε **τυπικές δοκιμές αντιπαραβολής** (φθίνουσα κατάταξη). Η κόκκινη στήλη αντιπροσωπεύει τον μάρτυρα ενώ οι πράσινες τις επεμβάσεις με τα βακτηριακά στελέχη που επέφεραν στατιστικά σημαντική μείωση του ρυθμού ανάπτυξης. Οι τιμές οι οποίες ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σύμφωνα με τη δοκιμασία *Tukey HSD* με $P \leq 0.05$.



Εικόνα 26. Αντιπροσωπευτικά τρυβλία των **δοκιμών αντιπαραβολής** όπου απεικονίζονται οι επεμβάσεις με τα βακτηριακά στελέχη που επέδειξαν στατιστικά σημαντική μείωση στον ρυθμό ανάπτυξης του μύκητα ***V. dahliae***. **Α.1, Α.2)** Επάνω και κάτω όψη του μάρτυρα (Control) καθώς και οι επεμβάσεις με τα βακτηριακά στελέχη, **Β)** SAR5, **Γ)** SAR15, **Δ)** SAR35, **Ε)** SAR36, **ΣΤ)** SAR59, **Ζ)** SAR60, **Η)** SAR81, **Θ)** SAR85, **Ι)** SAR101, **Κ)**. SAR118, **Λ)** SAR119, **Μ)** SAR120, **Ν)** SAR122, **Ξ)** SAR125, και **Ο)** SAR160.



Γράφημα 11. Ρυθμός μυκηλιακής ανάπτυξης (mm/ημέρα) του μύκητα ***V. dahliae*** (απομόνωση 999-1) υπό την επίδραση των 20 πιο αποτελεσματικών βακτηριακών στελέχων σε **δοκιμές πτητικών** (φθίνουσα κατάταξη). Η κόκκινη στήλη αντιπροσωπεύει τον μάρτυρα ενώ οι πράσινες στήλες τις επεμβάσεις με τα βακτηριακά στελέχη που επέφεραν στατιστικά σημαντική μείωση του ρυθμού ανάπτυξης. Οι τιμές οι οποίες ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σύμφωνα με τη δοκιμασία *Tukey HSD* με $P \leq 0.05$.



Εικόνα 27. Αντιπροσωπευτικά τρυβλία των **δοκιμών με πτητικά** όπου απεικονίζονται επεμβάσεις με τα βακτηριακά στελέχη που επέδειξαν στατιστικά σημαντική μείωση στον ρυθμό ανάπτυξης του μύκητα ***V. dahliae***. **Α)** Μάρτυρας (Control) καθώς και επεμβάσεις με τα βακτηριακά στελέχη **Β)** SAR15, **Γ)** SAR60, **Δ)** SAR101, **Ε)** SAR118, **ΣΤ)** SAR119 και **Ζ)** SAR120, **Η)** SAR125 και **Θ)** SAR160.

Πίνακας 11. Μέσοι όροι και τυπικά σφάλματα (±) των μετρήσεων των μυκητολογικών παραμέτρων σε **τυπικές δοκιμές αντιπαραβολής** που προέκυψαν από την αξιολόγηση της αντιμικροβιακής δράσης των 20 πιο αποτελεσματικών βακτηριακών στελεχών έναντι του μύκητα ***V. dahliae***

Τύπος βιοδοκιμών	**Επέμβαση**	**Μυκητολογικοί παράμετροι**			
		Ρυθμός ανάπτυξης (mm/ημέρα)	**Αριθμός κονιδίων (×10^5)/ δισκίο διαμέτρου 5 mm**	**Πάχος υφών (μm)**	**Εμβαδόν μικροσκληρωτίων (cm^2)**
Δοκιμές Αντιπαραβολής (Confrontation test)	**V.d.+ PDA**	1.7±0.0 a	13.8±2.0 bc	3.6±0.2 a	9.0±0.5 a
	V.d.+ SAR5	0.6±0.1 f	14.1±1.9 bc	3.3±0.1 abc	2.5±0.5 efgh
	V.d.+ SAR15	1.0±0.1 cd	9.3±1.0 bc	3.4±0.1 abc	1.4±0.8 gh
	V.d.+ SAR26	1.7±0.0 a	11.2±0.9 bc	3.4±0.2 ab	6.4±0.5 abcd
	V.d.+ SAR35	0.9±0.1 cde	6.9±0.9 c	3.0±0.1 bcdef	2.2±0.5 efgh
	V.d.+ SAR36	0.9±0.1 cdef	7.3±0.8 bc	2.8±0.1 cdefg	0.7±0.2 h
	V.d.+ SAR56	1.7±0.0 a	10.8±0.6 bc	3.4±0.1 ab	6.7±0.8 abc
	V.d.+ SAR57	1.7±0.0 a	10.2±0.8 bc	3.3±0.1 abc	6.5±0.9 abc
	V.d.+ SAR59	1.1±0.0 c	9.7±1.9 bc	3.2±0.1 abcd	1.8±0.5 fgh
	V.d.+ SAR60	0.9±0.0 cde	20.9±8.0 abc	3.0±0.1 bcdef	4.2±0.4 bcdef
	V.d.+ SAR81	1.1±0.1 c	42.3±18.0 a	3.0±0.1 bcdef	2.2±0.8 efgh
	V.d.+ SAR83	1.7±0.0 a	10.6±1.4 bc	3.1±0.1 abcde	4.8±0.4 bcde
	V.d.+ SAR85	1.0±0.0 c	12.5±5.6 bc	2.8±0.1 cdefg	4.0±0.4 cdefg
	V.d.+ SAR101	0.9±0.0 cde	6.9±1.1 c	2.7±0.1 defg	3.1±0.7 efgh
	V.d.+ SAR118	0.7±0.0 def	3.2±0.9 c	2.4±0.0 g	4.1±0.2 bcdefg
	V.d.+ SAR119	0.7±0.0 ef	1.7±0.4 c	2.5±0.0 fg	3.7±0.3 defg
	V.d.+ SAR120	0.9±0.0 cdef	7.5±0.4 bc	2.5±0.0 efg	4.5±0.3 bcdef
	V.d.+ SAR122	0.9±0.0 cde	13.9±1.2 bc	2.5±0.0 efg	3.3±0.2 efgh
	V.d.+ SAR125	0.9±0.1 cde	14.1±1.4 bc	2.7±0.1 defg	3.6±0.6 efg
	V.d.+ SAR160	1.4±0.1 b	22.6±1.4 abc	3.0±0.1 bcdef	3.1±0.3 efgh
	V.d.+ SAR161	1.6±0.0 a	33.0±8.9 ab	3.2±0.1 abcd	6.7±0.4 ab

* Εντός των στηλών, οι τιμές οι οποίες ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σύμφωνα με τη δοκιμασία *Tukey HSD* με $P \leq 0.05$.

Πίνακας 12. Μέσοι όροι και τυπικά σφάλματα (±) των μετρήσεων των μυκητολογικών παραμέτρων σε **δοκιμές με πτητικά** που προέκυψαν από την αξιολόγηση της αντιμικροβιακής δράσης των 20 πιο αποτελεσματικών βακτηριακών στελεχών έναντι του μύκητα ***V. dahliae***

Τύπος βιοδοκιμών	Επέμβαση	Μυκητολογικοί παράμετροι			
		Ρυθμός ανάπτυξης (mm/ημέρα)	Αριθμός κονιδίων ($\times 10^5$)/ δισκίο διαμέτρου 5 mm	Πάχος υφών (μm)	Εμβαδόν μικροσκληρωτίων (cm^2)
Δοκιμές πτητικών (Volatile test)	**V.d./ PDA**	1.0±0.1 a	21.2±6.1 ab	2.5±0.0 abc	1.5±0.8 a
	V.d./ SAR5	0.5±0.1 abcdef	10.0±1.9 bcd	2.3±0.1 cde	0.1±0.1 a
	V.d./ SAR15	0.2±0.1 f	4.8±0.8 bcd	2.3±0.1 bcde	0.0±0.0 a
	V.d./ SAR26	1.0±0.1 ab	12.1±3.1 bcd	2.6±0.1 a	0.4±0.1 a
	V.d./ SAR35	0.6±0.1 abcdef	14.9±5.3 abcd	2.3±0.1 bcde	0.5±0.5 a
	V.d./ SAR36	0.5±0.1 abcdef	4.9±0.8 bcd	2.4±0.1 abcde	0.1±0.1 a
	V.d./ SAR56	0.9±0.0 abcd	4.8±0.4 bcd	2.5±0.0 abcd	0.3±0.0 a
	V.d./ SAR57	1.1±0.1 a	20.1±6.0 abc	2.5±0.0 ab	0.6±0.2 a
	V.d./ SAR59	0.7±0.1 abcdef	9.1±1.8 bcd	2.4±0.0 abcde	0.1±0.1 a
	V.d./ SAR60	0.2±0.0 f	14.9±3.6 abcd	2.2±0.1 e	0.0±0.0 a
	V.d./ SAR81	0.7±0.1 abcdef	15.5±3.8 abcd	2.4±0.1 abcde	0.6±0.6 a
	V.d./ SAR83	1.0±0.1 a	32.9±7.6 a	2.4±0.0 abcde	0.9±0.6 a
	V.d./ SAR85	0.9±0.2 abcd	10.9±3.8 bcd	2.5±0.0 abcd	0.4±0.2 a
	V.d./ SAR101	0.4±0.1 bcdef	8.6±1.1 bcd	2.4±0.0 abcde	0.0±0.0 a
	V.d./ SAR118	0.3±0.1 def	0.8±0.6 cd	2.2±0.1 de	0.0±0.0 a
	V.d./ SAR119	0.2±0.1 f	0.4±0.2 d	2.2±0.1 de	0.0±0.0 a
	V.d./ SAR120	0.3±0.0 ef	11.1±5.0 bcd	2.5±0.0 abcde	0.0±0.0 a
	V.d./ SAR122	0.8±0.2 abcde	14.4±5.3 abcd	2.4±0.0 abcde	1.9±1.9 a
	V.d./ SAR125	0.4±0.2 cdef	6.0±0.9 bcd	2.5±0.0 abcde	0.0±0.0 a
	V.d./ SAR160	0.3±0.1 def	19.3±4.7 abcd	2.6±0.0 a	0.0±0.0 a
	V.d./ SAR161	0.9±0.0 abc	10.6±1.9 bcd	2.6±0.0 a	0.6±0.1 a

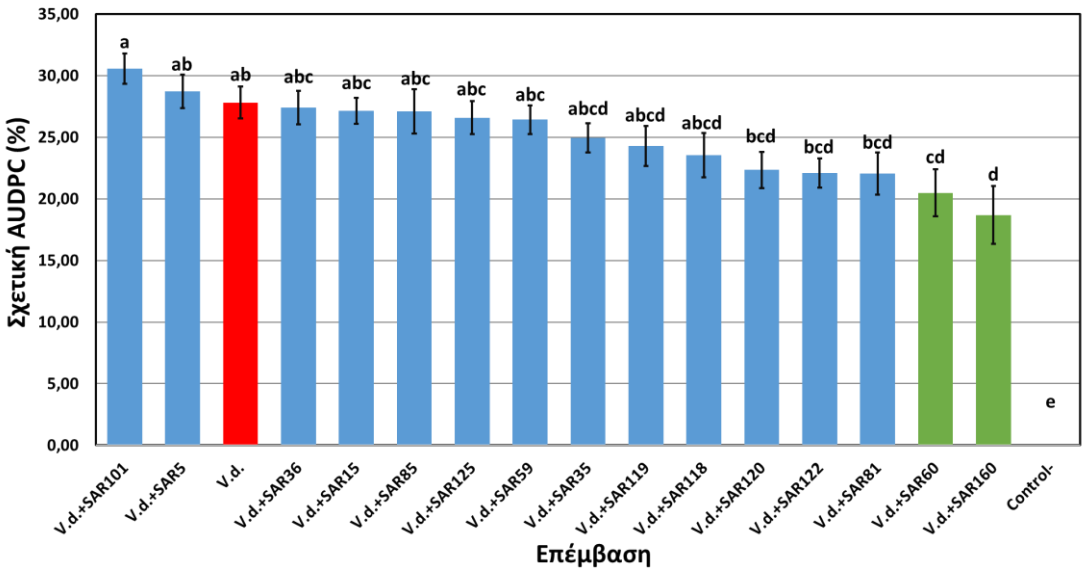
* Εντός των στηλών, οι τιμές οι οποίες ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σύμφωνα με τη δοκιμασία *Tukey HSD* με $P \leq 0.05$.

3.2.2 Αποτελέσματα in-planta βιοδοκιμών σε φυτά τομάτα

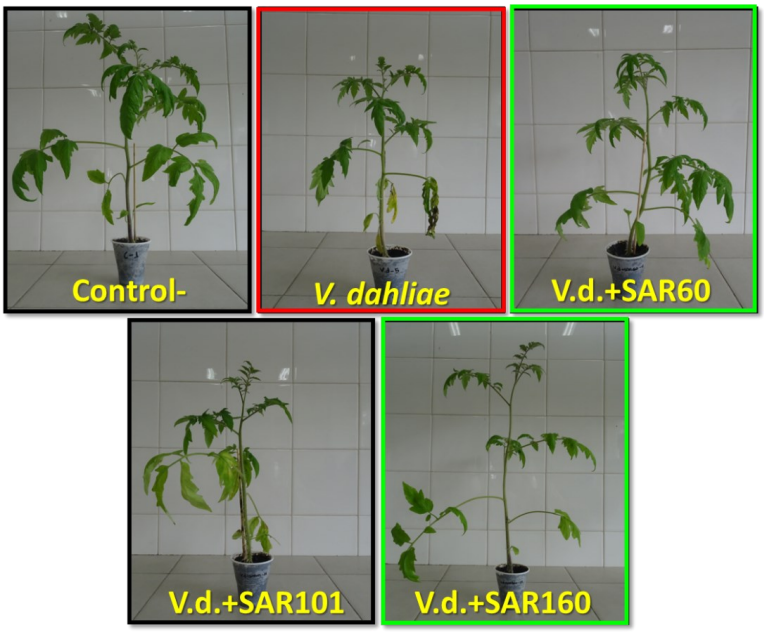
Αναφορικά με τα αποτελέσματα των *in-planta* βιοδοκιμών σε φυτά τομάτας, **2 βακτηριακά στελέχη** (SAR60 και SAR160) μείωσαν σημαντικά τα συμπτώματα της ασθένειας της βερτισιλλίωσης (**Γράφημα 12**, **Εικόνα 28**). Βάσει των αποτελεσμάτων, τα βακτηριακά στελέχη επέφεραν στατιστικά σημαντική μείωση της τιμής της Σχετικής AUDPC (%). Πιο συγκεκριμένα, τα βακτηριακά στελέχη **SAR60** και **SAR160** είχαν τιμές **20.5%** και **18.7%** αντίστοιχα ενώ ο θετικός μάρτυρας **27.8%**. Επιπλέον, το **βακτηριακό στέλεχος SAR160** επέφερε στατιστικά σημαντική μείωση στη τελική ένταση της ασθένειας (39.9%) σε σύγκριση με το θετικό μάρτυρα (54.0%). Ωστόσο, δεν παρατηρούνται σημαντικά στατιστικές διαφορές στη συχνότητα επαναπομόνωσης και στη σχετική ποσότητα DNA του *V. dahliae* εντός των αγγείων του ξύλου σε σύγκριση με τον μάρτυρα (**Πίνακας 13**). Αναφορικά με τις

παραμέτρους της φυτικής ανάπτυξης, **κανένα βακτηριακό στέλεχος** δεν παρουσίασε στατιστικά σημαντικές διαφορές σε σύγκριση με τον θετικό μάρτυρα (**Πίνακας 14**).

Όσον αφορά στα αποτελέσματα των φασματικών δεδομένων, όλα τα υπό μελέτη βακτηριακά στελέχη επέφεραν στατιστικές διαφορές στην ένταση της ασθένειας των σημασμένων φύλλων, στις **11 ημέρες από τη μόλυνση** σε σύγκριση με τον θετικό μάρτυρα. Επιπροσθέτως, στις **15 ημέρες από τη μόλυνση** μόνο το βακτηριακό στέλεχος **SAR160** επέφερε στατιστικά σημαντικές διαφορές σε σύγκριση με το θετικό μάρτυρα. Από την ανάλυση των φασματικών δεδομένων στατιστικές διαφορές παρατηρούνται μεταξύ των υπό μελέτη βακτηριακών στελεχών και του θετικού μάρτυρα στους εξής δείκτες: **NDVI** (στις 25 ημέρες από την μόλυνση [SAR60]), **NPCI** (στις 11 ημέρες από την μόλυνση [SAR160]), **TVI** (στις 15 [SAR160] και 25 ημέρες από τη μόλυνση [SAR60 & SAR160]) και **EVI** (στις 25 ημέρες από την μόλυνση [SAR60]) (**Γράφημα 13**).



Γράφημα 12. Σχετική AUDPC (%) στα φυτά τομάτας των επεμβάσεων του αρνητικού (Control-) και του θετικού μάρτυρα (V.d.) καθώς και των επεμβάσεων με τα 15 υπό αξιολόγηση βακτηριακά στελέχη. Οι τιμές οι οποίες ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σύμφωνα με τη δοκιμασία *Tukey HSD* με $P \leq 0.05$.



Εικόνα 28. Συμπτώματα της βερτισιλλίωσης σε φυτά τομάτας των επεμβάσεων **Control-**, **V.d.**, **V.d.+SAR60, V.d.+SAR101** και **V.d.+SAR160** στις 28 ημέρες από τη μόλυνση. Σε πράσινο πλαίσιο απεικονίζονται οι επεμβάσεις που επέφεραν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε σύγκριση με τον θετικό μάρτυρα (κόκκινο πλαίσιο).

Πίνακας 13. Μέσες τιμές και τυπικά σφάλματα (±) των μετρήσεων των παραμέτρων της ασθένειας της βερτισιλλίωσης σε φυτά τομάτας

Επέμβαση	**Παράμετροι ασθένειας**			
	Τ.Ε.Α. (%)	**Σχετ. AUDPC (%)**	**Σ.Ε**	**RT-PCR**
Control-	0.0±0.0 c	0.0±0.0 e	0.0±0.0 b	0.014±0.002 b
V.d.	54.0±2.2 a	27.8±1.3 ab	0.8±0.1 a	0.456±0.132 a
V.d.+SAR5	50.9±1.6 ab	28.7±1.4 ab	0.7±0.1 a	-
V.d.+SAR15	50.2±2.0 ab	27.1±1.0 abc	0.7±0.1 a	-
V.d.+SAR35	51.5±2.0 ab	25.0±1.2 abcd	0.8±0.1 a	-
V.d.+SAR36	50.7±1.9 ab	27.4±1.4 abc	0.8±0.1 a	-
V.d.+SAR59	52.9±1.8 a	26.4±1.2 abc	0.8±0.1 a	-
V.d.+SAR60	43.8±3.1 ab	20.5±1.9 cd	0.7±0.1 a	0.304±0.080 ab
V.d.+SAR81	48.5±2.1 ab	22.0±1.7 bcd	0.8±0.1 a	-
V.d.+SAR85	53.6±2.9 a	27.1±1.8 abc	0.7±0.1 a	-
V.d.+SAR101	53.8±1.6 a	30.6±1.2 a	0.8±0.1 a	-
V.d.+SAR118	53.8±2.8 a	23.6±1.8 abcd	0.7±0.1 a	-
V.d.+SAR119	46.9±2.7 ab	24.3±1.6 abcd	0.8±0.1 a	-
V.d.+SAR120	43.0±1.7 ab	22.3±1.5 bcd	0.7±0.1 a	-
V.d.+SAR122	45.2±2.4 ab	22.1±1.2 bcd	0.7±0.1 a	-
V.d.+SAR125	51.9±2.7 a	26.6±1.3 abc	0.8±0.1 a	-
V.d.+SAR160	39.9±4.2 b	18.7±2.4 d	0.7±0.1 a	0.429±0.068 a

* Στον παραπάνω πίνακα απεικονίζονται οι τιμές της Τελικής Έντασης των συμπτωμάτων της Ασθένειας (Τ.Ε.Α.), Σχετικής AUDPC (Σχετ. AUDPC), Συχνότητας Επαναπομόνωσης (Σ.Ε.) καθώς και της Σχετικής Ποσότητας DNA του *V. dahliae.* που προέκυψε από την Real-Time PCR (RT-PCR). Κάθε τιμή αντιπροσωπεύει το μέσο όρο 21 φυτών.

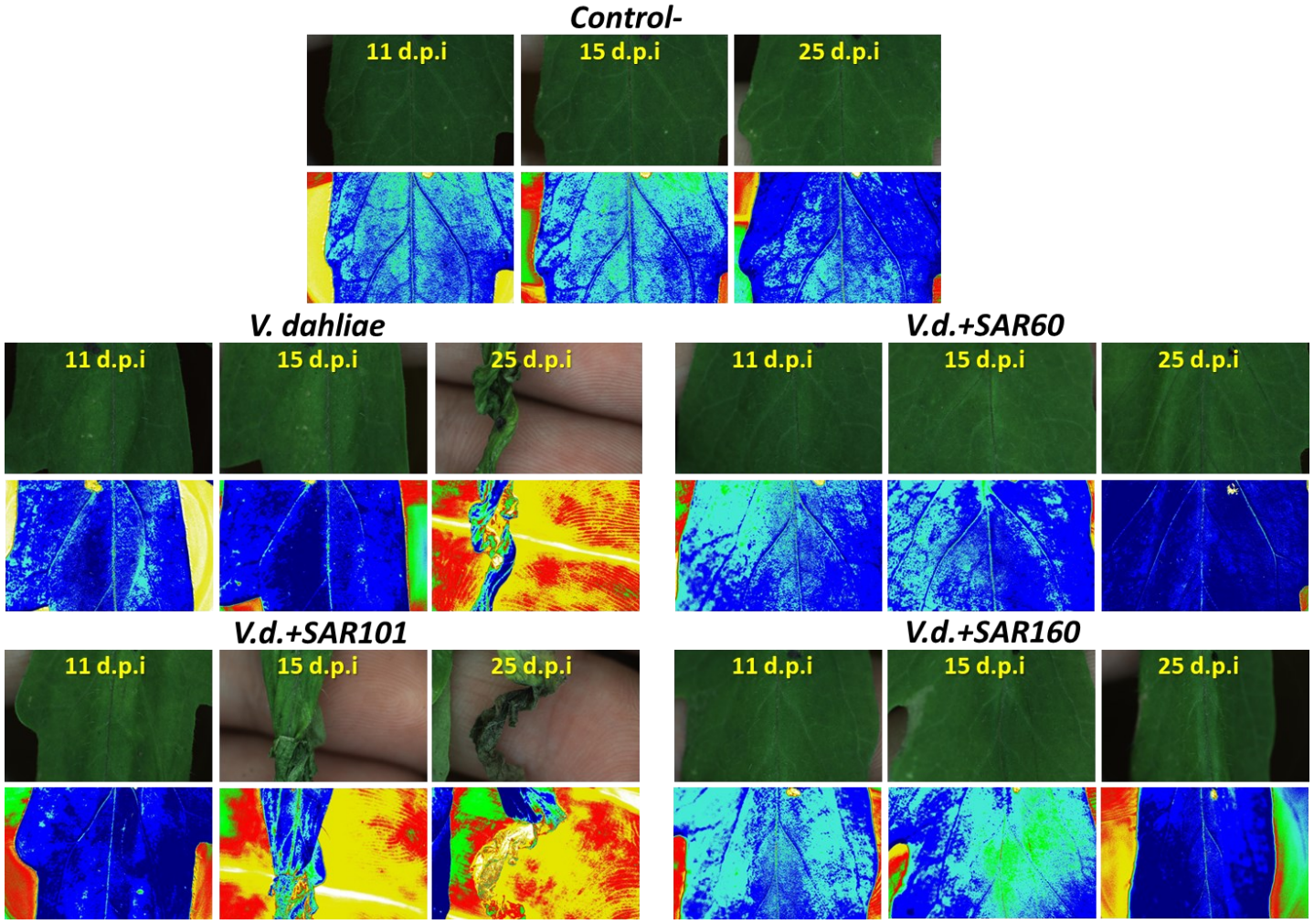
*Εντός των στηλών, οι τιμές οι οποίες ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σύμφωνα με τη δοκιμασία *Tukey* HSD με $P \leq 0.05$.

Πίνακας 14. Μέσες τιμές και τυπικά σφάλματα (±) των μετρήσεων των παραμέτρων της φυτικής ανάπτυξης σε φυτά τομάτας

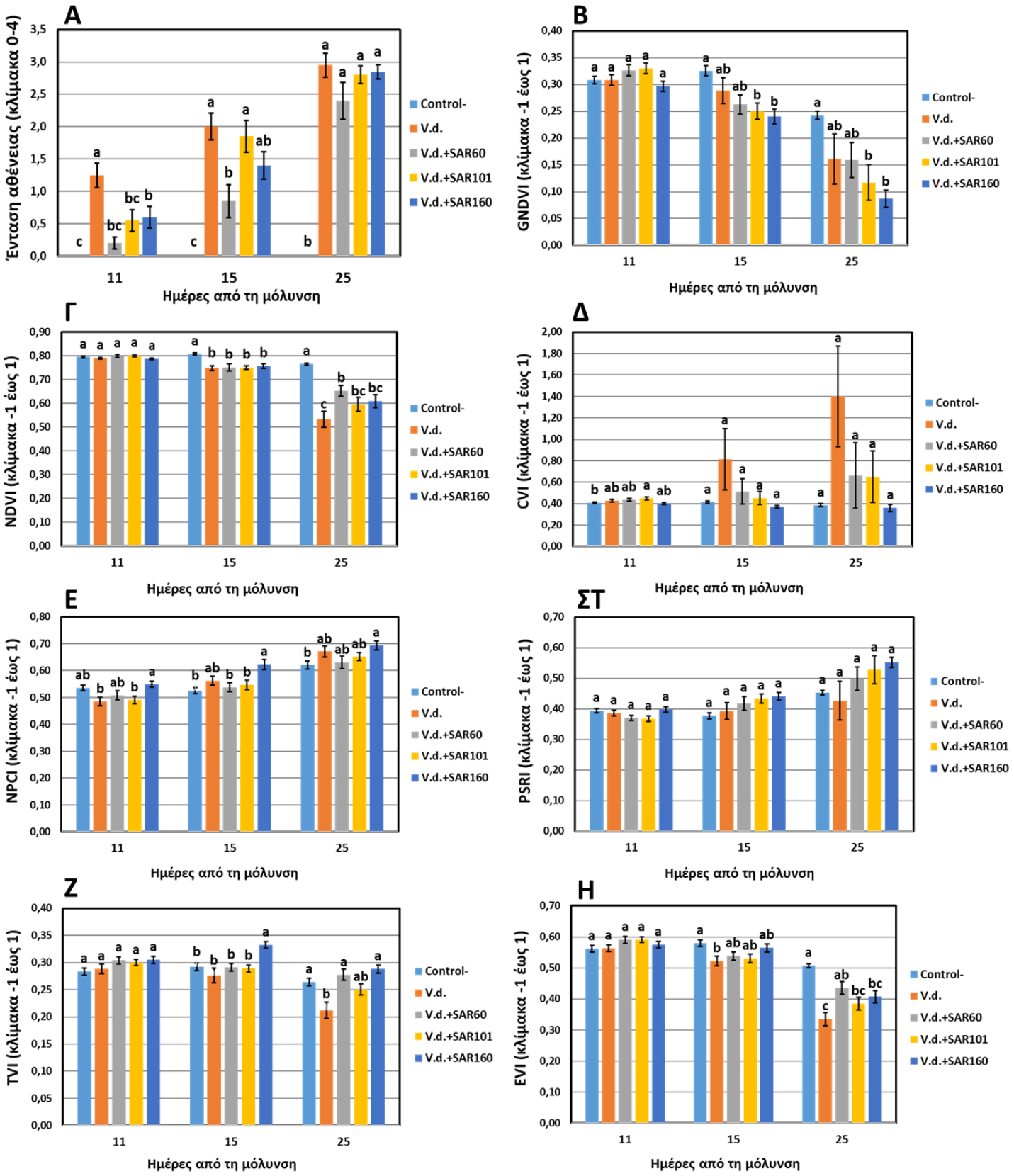
Επέμβαση	**Παράμετροι φυτικής ανάπτυξης**		
	Αριθμός φύλλων	**Ύψος (cm)**	**Νωπό βάρος (g)**
Control-	7.4±0.1 bc	33.1±1.0 a	12.5±0.3 a
V.d.	7.7±0.1 abc	28.6±1.0 bc	8.9±0.2 bcde
V.d.+SAR5	7.8±0.2 abc	27.9±0.9 bcd	8.5±0.3 cde
V.d.+SAR15	7.9±0.2 ab	29.1±0.9 bc	9.2±0.4 bcd
V.d.+SAR35	8.3±0.1 a	30.8±0.6 ab	10.2±0.4 b
V.d.+SAR36	7.8±0.1 abc	27.7±0.6 bcd	8.7±0.3 bcde
V.d.+SAR59	7.1±0.1 c	22.7±0.5 e	7.2±0.3 e
V.d.+SAR60	7.4±0.4 bc	25.6±0.5 cde	9.0±0.4 bcd
V.d.+SAR81	7.7±0.1 abc	23.6±0.5 e	8.2±0.3 cde
V.d.+SAR85	7.5±0.2 abc	25.7±0.8 cde	8.6±0.5 bcde
V.d.+SAR101	7.4±0.2 bc	25.1±0.7 cde	8.5±0.2 bcde
V.d.+SAR118	7.4±0.2 bc	25.5±0.6 cde	8.1±0.3 cde
V.d.+SAR119	7.7±0.2 abc	25.3±0.8 cde	8.2±0.4 cde
V.d.+SAR120	7.9±0.1 ab	27.9±1.2 bcd	8.6±0.3 bcde
V.d.+SAR122	7.6±0.2 abc	23.6±0.6 e	7.8±0.3 de
V.d.+SAR125	7.5±0.2 abc	24.4±0.7 de	8.9±0.4 bcde
V.d.+SAR160	7.6±0.2 abc	27.6±1.3 bcd	9.5±0.5 bc

***** Εντός των στηλών, οι τιμές οι οποίες ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σύμφωνα με τη δοκιμασία *Tukey HSD* με $P \leq 0.05$.

.



Εικόνα 29. Φάσματα αντιπροσωπευτικών φυλλαρίων φυτών τομάτας των επεμβάσεων **Control-**, **V.d.**, **V.d.+SAR60**, **V.d.+SAR101** και **V.d.+SAR160** που ελήφθησαν στις 11, 15 και 25 ημέρες από την μόλυνση. **Πάνω**: Έγχρωμες εικόνες (color) και **Κάτω**: Υπερφασματικός χάρτης του δείκτη βλάστησης GNDVI.

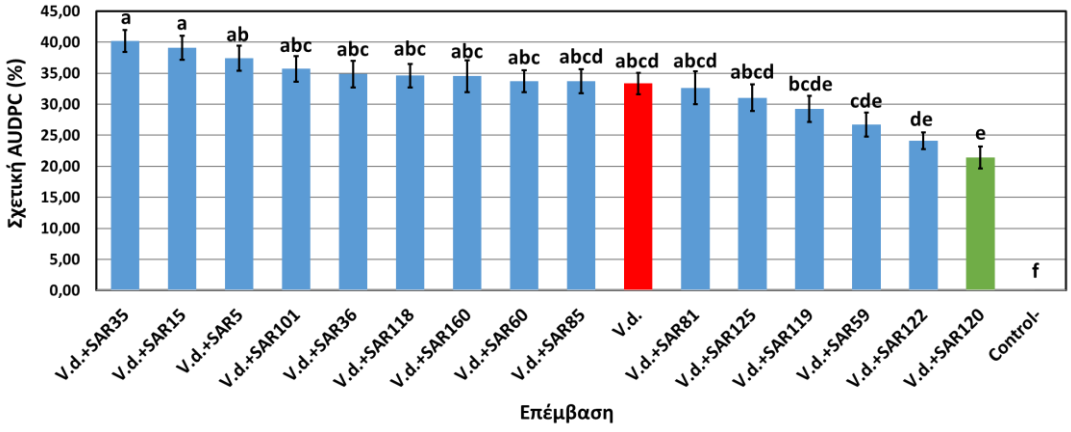


Γράφημα 13. Αποτελέσματα συμπτωμάτων και δεικτών βλάστησης σε σημασμένα φυλλάρια φυτών τομάτας των επεμβάσεων **Control-**, **V.d.**, **V.d.+SAR60**, **V.d.+SAR101** και **V.d.+SAR160** που ελήφθησαν στις 11, 15 και 25 ημέρες από τη μόλυνση. **Α.** Ένταση ασθένειας και δεδομένα των δεικτών βλάστησης **Β.** GNDVI, **Γ.** NDVI, **Δ.** CVI, **Ε.** NPCI, **ΣΤ.** PSRI, **Ζ.** TVI και **Η.** EVI.

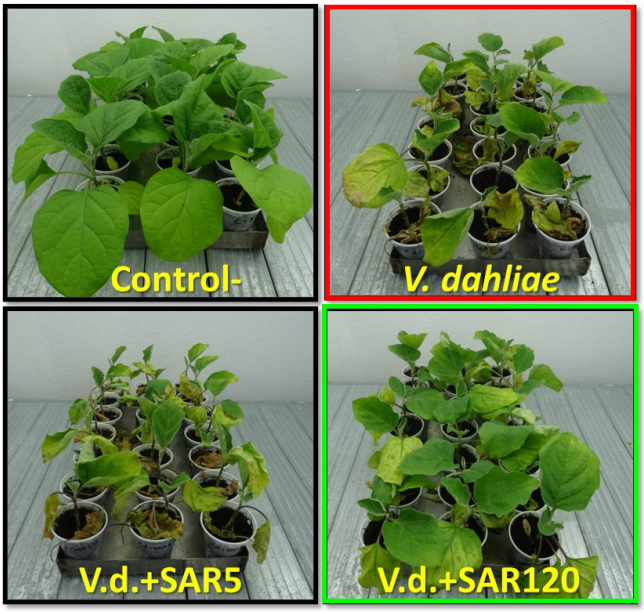
3.2.3 Αποτελέσματα in-planta βιοδοκιμών σε φυτά μελιτζάνας

Αναφορικά με τα αποτελέσματα των *in-planta* βιοδοκιμών σε φυτά μελιτζάνας, **1 βακτηριακό στέλεχος** (SAR120) μείωσε σημαντικά τη συμπτωματολογία της ασθένειας της βερτισιλλίωσης (**Γράφημα 14**, **Εικόνα 30**). Βάσει των αποτελεσμάτων, το βακτηριακό στέλεχος **SAR120** επέφερε στατιστικά σημαντική μείωση της τιμής της Σχετικής AUDPC (%) (21.4%) σε σύγκριση με το θετικό μάρτυρα (33.3%). Επιπρόσθετα, επέφερε στατιστικά σημαντική μείωση στη τελική ένταση της ασθένειας (66.4%) σε σύγκριση το θετικό μάρτυρα (76.0%). Ωστόσο, **κανένα** βακτηριακό στέλεχος δεν επέφερε στατιστικά σημαντικές διαφορές στις υπόλοιπες υπό αξιολόγηση παράμετρούς της ασθένειας (**Πίνακας 15**). Όσον αφορά στις παραμέτρους της φυτικής ανάπτυξης, **4 βακτηριακά στελέχη** (SAR119, SAR120, SAR122 και SAR125) επέφεραν στατιστικά υψηλότερες τιμές νωπού βάρους σε σύγκριση με το θετικό μάρτυρα (**Πίνακας 16**).

Όσον αφορά στα αποτελέσματα των φασματικών δεδομένων, στατιστικές διαφορές στην ένταση των συμπτωμάτων των σημασμένων φύλλων εντοπίζονται μόνο μεταξύ της επέμβασης **V.d.+SAR120** και του θετικού μάρτυρα (**V.d.**) στις **12 ημέρες από τη μόλυνση**. Από την ανάλυση των φασματικών δεδομένων στατιστικές διαφορές παρατηρούνται μεταξύ της επέμβασης V.d.+SAR120 και του θετικού μάρτυρα στους εξής δείκτες: **GNDVI** (στις 8 και 12 ημέρες από την μόλυνση), **NDVI** (στις 8 και 12 ημέρες από την μόλυνση), **NPCI** (στις 4 και 12 ημέρες από την μόλυνση), **PSRI** (στις 8 και 12 ημέρες από τη μόλυνση) και **EVI** (στις 12 ημέρες από την μόλυνση) (**Γράφημα 15**).



Γράφημα 14. Σχετική AUDPC (%) στα φυτά μελιτζάνας των επεμβάσεων του αρνητικού (Control-) και του θετικού μάρτυρα (V.d.) καθώς και των επεμβάσεων με τα 15 υπό αξιολόγηση βακτηριακά στελέχη. Οι τιμές οι οποίες ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σύμφωνα με τη δοκιμασία *Tukey HSD* με $P \leq 0.05$.



Εικόνα 30. Συμπτώματα της βερτισιλλίωσης σε φυτά μελιτζάνας των επεμβάσεων **Control-**, **V.d.**, **V.d.+SAR5** και **V.d.+SAR120** στις 18 ημέρες από τη μόλυνση. Σε πράσινο πλαίσιο απεικονίζεται η επέμβαση που επέφερε στατιστικά σημαντικές διαφορές με τον θετικό μάρτυρα (κόκκινο πλαίσιο).

Πίνακας 15. Μέσες τιμές και τυπικά σφάλματα (±) των μετρήσεων των παραμέτρων της ασθένειας της βερτισιλλίωσης σε φυτά μελιτζάνας

Επέμβαση	**Παράμετροι ασθένειας**					
	Τ.Ε.Α. (%)	**Σ.Α. (%)**	**Θ (%)**	**Σχετ. AUDPC**	**Σ.Ε**	**RT-PCR**
Control-	0.0±0.0 d	0.0±0.0 b	0.0±0.0 c	0.0±0.0 f	0.0±0.0 b	0.002±0.000 b
V.d.	76.0±1.5 ab	100.0±0.0 a	61.9±13.5 ab	33.3±1.7 abcd	0.9±0.0 a	0.241±0.035 a
V.d.+SAR5	78.8±1.2 a	100.0±.0 a	61.90±15.3 ab	37.4±2.0 ab	0.9±0.1 a	-
V.d.+SAR15	80.2±2.0 a	100.0±0.0 a	61.9±11.3 ab	39.1±2.0 a	0.9±0.1 a	-
V.d.+SAR35	80.0±1.8 a	100.0±0.0 a	66.7±14.6 ab	40.2±1.8 a	0.9±0.1 a	-
V.d.+SAR36	79.3±2.4 a	100.0±0.0 a	71.4±8.7 a	34.9±2.2 abc	0.9±0.1 a	-
V.d.+SAR59	74.8±1.6 abc	100.0±0.0 a	52.4±9.9 abc	26.7±2.0 cde	1.0±0.0 a	-
V.d.+SAR60	79.8±1.7 a	100.0±0.0 a	66.7±10.3 ab	33.7±1.8 abc	0.9±0.1 a	-
V.d.+SAR81	79.2±2.5 a	100.0±0.0 a	33.3±12.6 abc	32.7±2.7 abcd	1.0±0.0 a	-
V.d.+SAR85	79.1±2.1 a	100.0±0.0 a	66.7±10.3 ab	33.7±1.9 abcd	1.0±0.0 a	-
V.d.+SAR101	79.2±2.7 a	100.0±0.0 a	47.6±9.9 abc	35.7±2.1 abc	1.0±0.0 a	-
V.d.+SAR118	71.1±2.1 abc	100.0±0.0 a	28.6±8.7 abc	34.6±1.9 abc	1.0±0.0 a	-
V.d.+SAR119	75.9±1.4 ab	100.0±0.0 a	57.1±11.0 ab	29.3±2.1 bcde	1.0±0.0 a	0.227±0.047 a
V.d.+SAR120	66.4±1.8 c	100.0±0.0 a	14.3±9.9 bc	21.4±1.8 e	0.9±0.1 a	0.374±0.084 a
V.d.+SAR122	66.9±2.2 bc	100.0±0.0 a	23.8±9.2 abc	24.1±1.4 de	1.0±0.0 a	-
V.d.+SAR125	76.6±2.1 a	100.0±0.0 a	76.2±9.5 a	31.0±2.1 abcd	0.9±0.1 a	-
V.d.+SAR160	78.9±1.5 a	100.0±0.0 a	76.2±9.5 a	34.5±2.6 abc	1.0±0.0 a	-

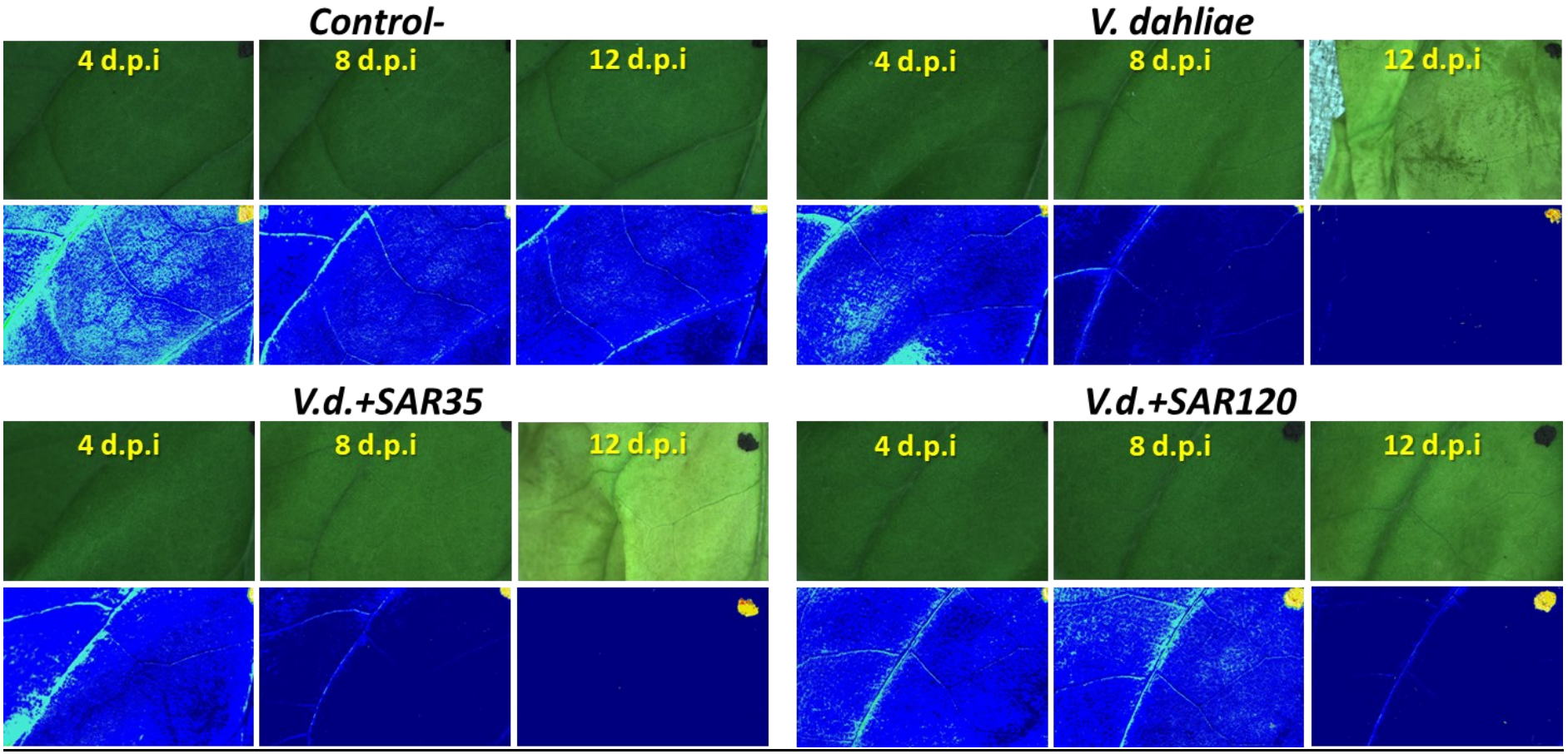
* Στον παραπάνω πίνακα απεικονίζονται οι τιμές της Τελικής Έντασης των συμπτωμάτων της Ασθένειας (Τ.Ε.Α.), Σοβαρότητα Ασθένειας (Σ.Α), Θνησιμότητας (Θ), Σχετικής AUDPC (Σχετ. AUDPC), Συχνότητας Επαναπομόνωσης (Σ.Ε.) καθώς και της Σχετικής Ποσότητας DNA του *V. dahliae.* που προέκυψε από την Real-Time PCR (RT-PCR). Κάθε τιμή αντιπροσωπεύει το μέσο όρο 21 φυτών.

*Εντός των στηλών, οι τιμές οι οποίες ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σύμφωνα με τη δοκιμασία Tukey HSD με $P \leq 0.05$.

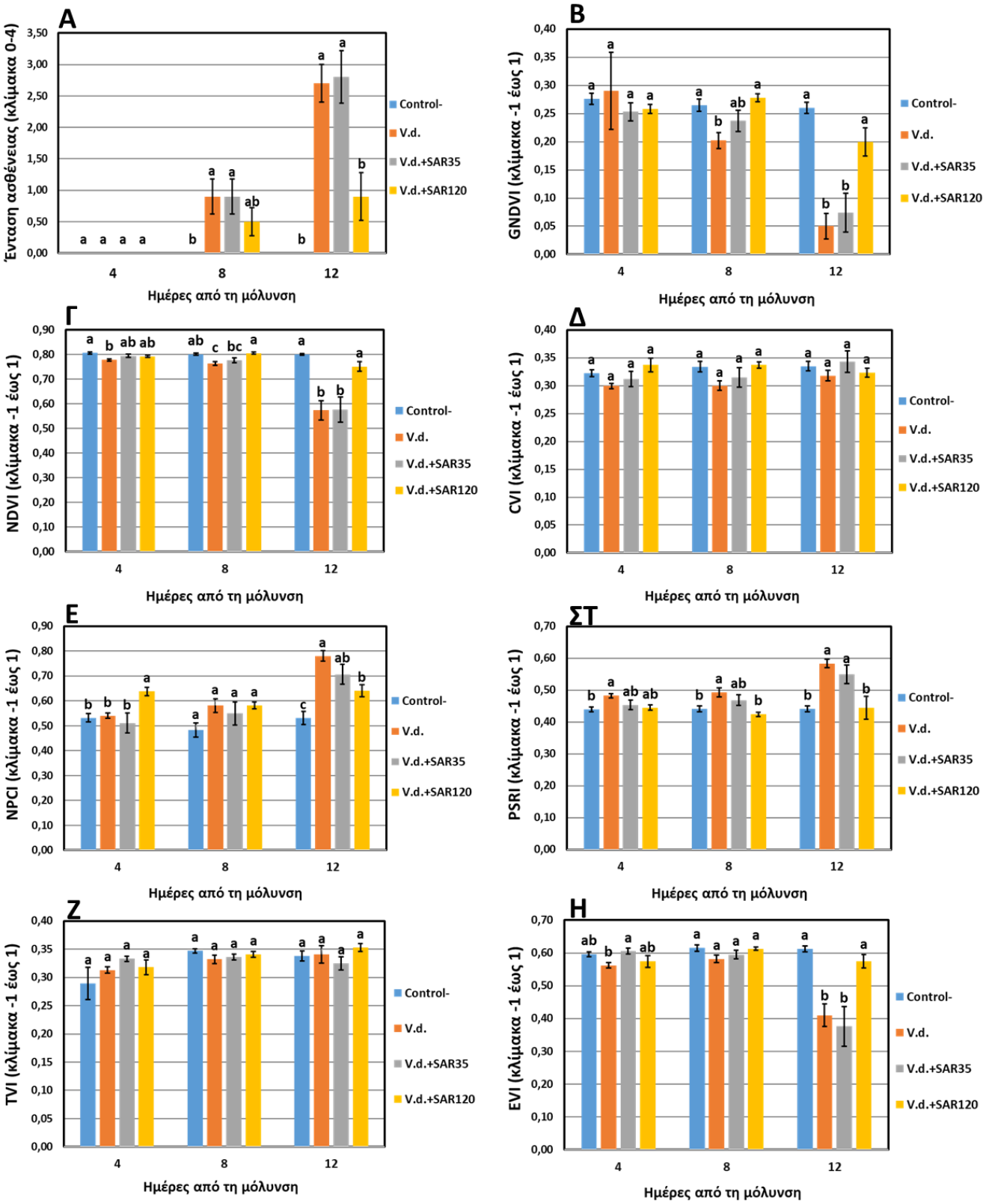
Πίνακας 16. Μέσες τιμές και τυπικά σφάλματα (±) των μετρήσεων των παραμέτρων της φυτικής ανάπτυξης σε φυτά μελιτζάνας.

Επέμβαση	**Παράμετροι φυτικής ανάπτυξης**		
	Αριθμός φύλλων	**Ύψος (cm)**	**Νωπό βάρος (g)**
Control-	5.2±0.21 ab	6.2±0.1 a	3.5±0.1 a
V.d.	4.8±0.10 ab	5.4±0.1 bcde	1.1±0.8 ef
V.d.+SAR5	4.9±0.28 ab	5.4±0.1 bcde	0.92±0.1 f
V.d.+SAR15	4.7±0.14 ab	5.2±0.1 cdef	1.1±0.1 ef
V.d.+SAR35	5.0±0.24 ab	5.2±0.1 cdef	1.1±0.1 ef
V.d.+SAR36	4.9±0.2 ab	5.5±0.1 bcd	1.1±0.1 ef
V.d.+SAR59	5.1±0.3 ab	5.0±0.1 def	1.4±0.1 cde
V.d.+SAR60	4.8±0.2 ab	4.7±0.1 f	1.2±0.1 def
V.d.+SAR81	4.6±0.2 ab	4.7±0.1 f	1.2±0.1 def
V.d.+SAR85	4.7±0.1 ab	4.9±0.1 ef	1.1±0.1 ef
V.d.+SAR101	4.5±0.1 b	4.9±0.1 ef	1.1±0.1 ef
V.d.+SAR118	4.6±0.1 ab	5.5±0.1 bcd	1.1±0.1 ef
V.d.+SAR119	5.1±0.2 ab	5.8±0.1 ab	1.6±0.1 bcd
V.d.+SAR120	5.0±0.1 ab	5.6±0.1 bc	1.9±0.1 b
V.d.+SAR122	4.9±0.1 ab	5.3±0.1 bcde	1.8±0.1 bc
V.d.+SAR125	5.4±0.2 a	5.8±0.1 ab	1.6±0.1 bcd
V.d.+SAR160	4.9±0.1 ab	5.3±0.1 bcde	1.4±0.1 cde

*Εντός των στηλών, οι τιμές οι οποίες ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σύμφωνα με τη δοκιμασία *Tukey HSD* με $P \leq 0.05$.



Εικόνα 31. Φάσματα αντιπροσωπευτικών φύλλων φυτών μελιτζάνας των επεμβάσεων **Control-**, **V.d.**, **V.d.+SAR35** και **V.d.+SAR120** που ελήφθησαν στις 4, 8 και 12 ημέρες από την μόλυνση. **Πάνω**: Έγχρωμες εικόνες (color) και **Κάτω**: Υπερφασματικός χάρτης του δείκτη βλάστησης GNDVI.



Γράφημα 15. Αποτελέσματα συμπτωμάτων και δεικτών βλάστησης σε σημασμένα φύλλα φυτών μελιτζάνας των επεμβάσεων **Control-**, **V.d.**, **V.d.+SAR35** και **V.d.+SAR120** που ελήφθησαν στις 4, 8 και 12 ημέρες από τη μόλυνση. **Α**. Ένταση ασθένειας και δεδομένα των δεικτών βλάστησης **Β.** GNDVI, **Γ.** NDVI, **Δ.** CVI, **Ε.** NPCI, **ΣΤ.** PSRI, **Ζ.** TVI και **Η.** EVI.

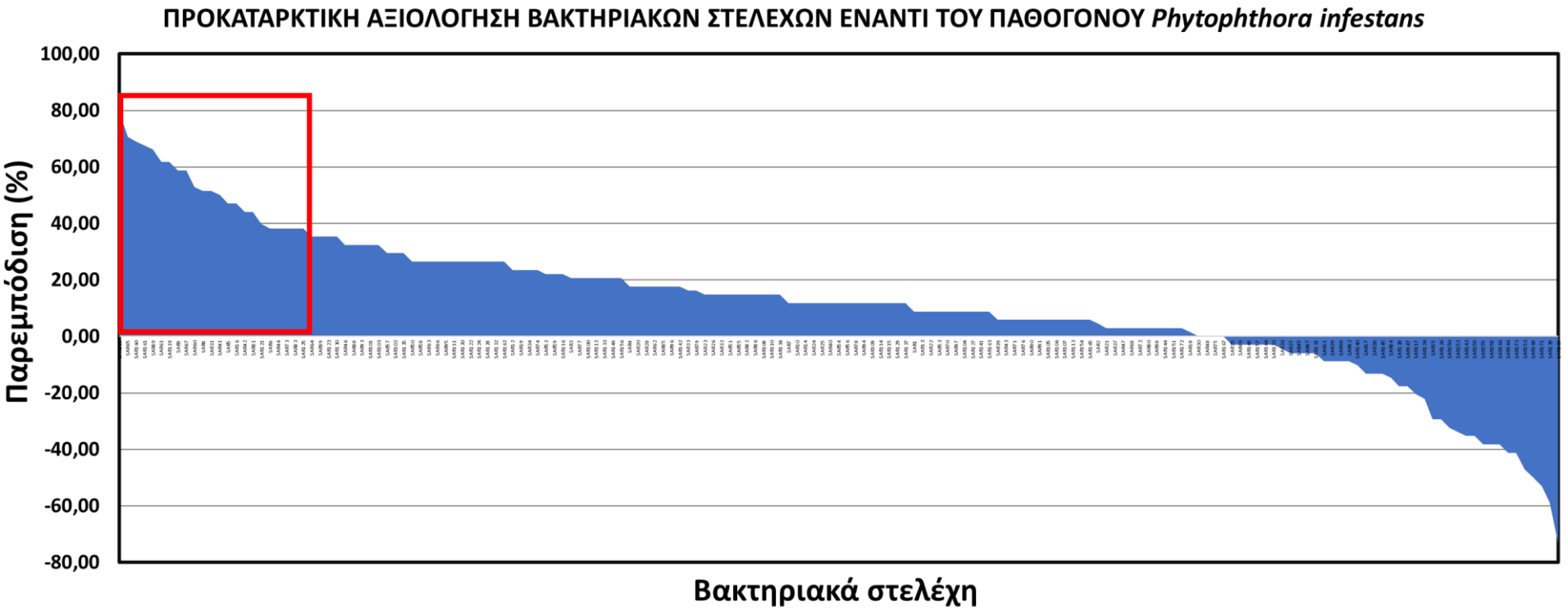
3.3 Αποτελέσματα αξιολόγησης βακτηριακών στελεχών έναντι του ωομύκητα Phytophthora infestans

3.3.1 Αποτελέσματα in-vitro βιοδοκιμών

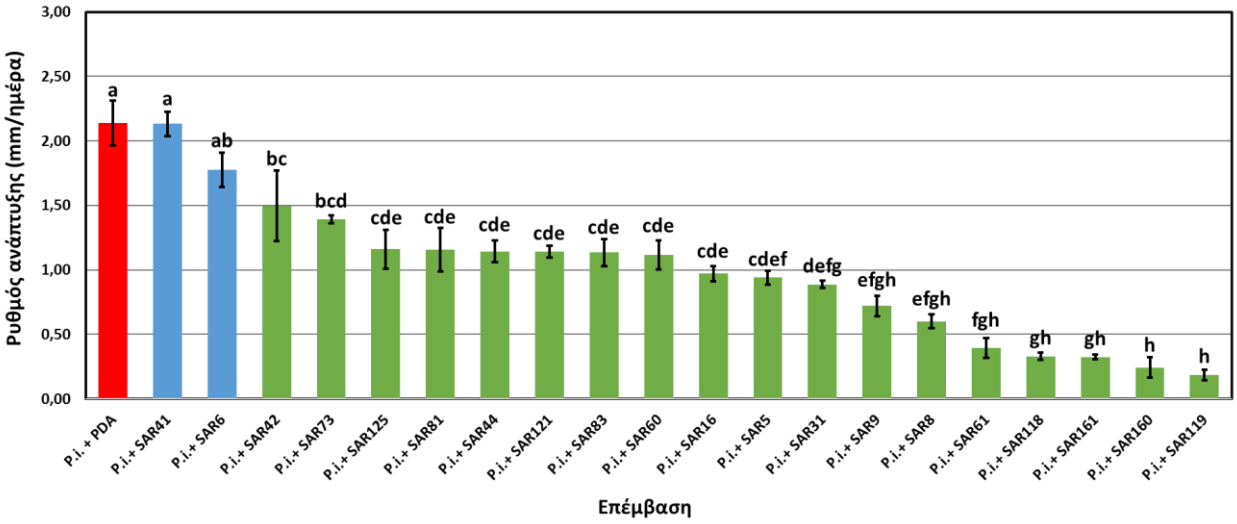
Από τα αποτελέσματα της **προκαταρκτικής αξιολόγησης** των 173 βακτηριακών στελεχών έναντι του ωομύκητα ***P. infestans*** (απομόνωση 88069) προέκυψε ότι **61 βακτηριακά στελέχη** επέφεραν αποτελεσματική παρεμποδιστική δράση (≥20%) (**Γράφημα 16**). Εξ' αυτών, επιλέχθηκαν τα 20 πιο αποτελεσματικά βακτηριακά στελέχη τα οποία αξιολογήθηκαν περαιτέρω σε διεξοδικές *in-vitro* βιοδοκιμές.

Όσον αφορά στα αποτελέσματα των **δοκιμών αντιπαραβολής** προέκυψε ότι **18 βακτηριακά στελέχη** (SAR5, SAR8, SAR9, SAR16, SAR31, SAR42, SAR44, SAR60, SAR61, SAR73, SAR81, SAR83, SAR118, SAR119, SAR121, SAR125, SAR160 και SAR161) επέφεραν στατιστικά σημαντική μείωση του ρυθμού της μυκηλιακής ανάπτυξης (**Γράφημα 17**, **Εικόνα 32**) και **5 βακτηριακά στελέχη** (SAR9, SAR61, SAR73, SAR81 και SAR118) επέφεραν στατιστικά σημαντική μείωση στο πάχος των υφών του παθογόνου σε σύγκριση με τον μάρτυρα. Ωστόσο, **κανένα** από τα υπό εξέταση βακτηριακά στελέχη δεν επέφερε στατιστικά σημαντικές μεταβολές στον αριθμό των παραγόμενων σποριαγγείων (**Πίνακας 17**).

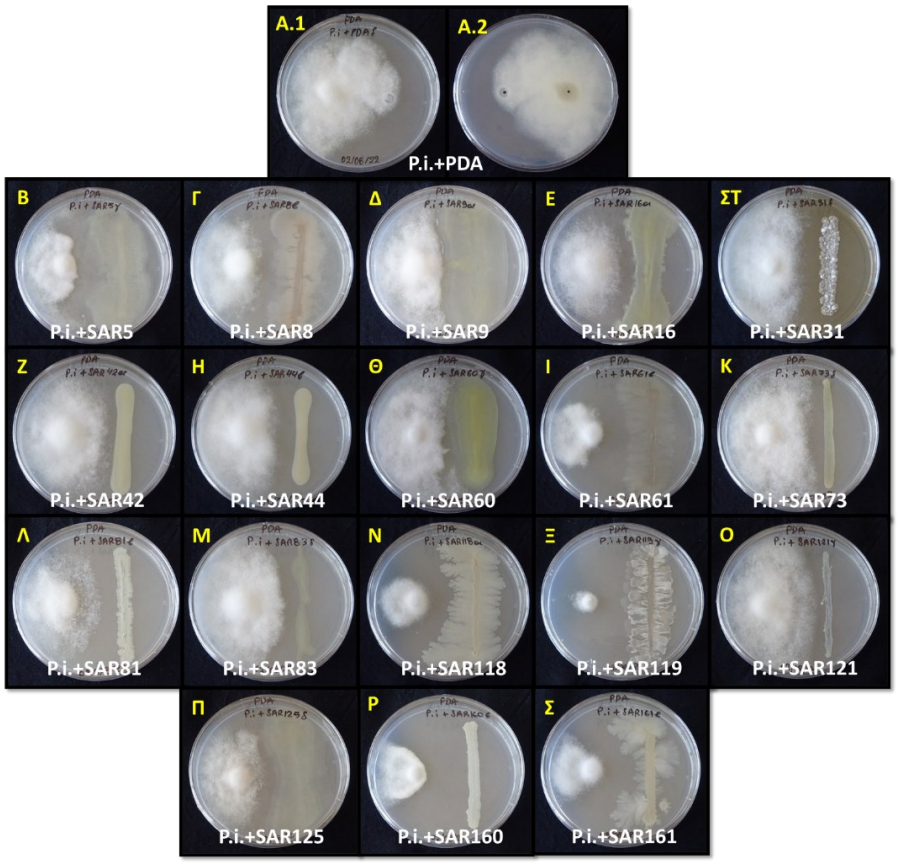
Όσον αφορά στα αποτελέσματα των **δοκιμών με πτητικά** προέκυψε ότι **8 βακτηριακά στελέχη** (SAR8, SAR16, SAR83, SAR118, SAR119, SAR121, SAR160 και SAR161) επέφεραν στατιστικά σημαντική μείωση του ρυθμού της μυκηλιακής ανάπτυξης (**Γράφημα 18**, **Εικόνα 33**) και **13 βακτηριακά στελέχη** (SAR5, SAR8, SAR31, SAR42, SAR44, SAR60, SAR73, SAR81, SAR83, SAR119, SAR125, SAR160 και SAR161) επέφεραν στατιστικά σημαντική μείωση στο πάχος των υφών του παθογόνου σε σύγκριση με το μάρτυρα. Τέλος, **κανένα** από τα υπό εξέταση βακτηριακά στελέχη δεν επέφερε στατιστικά σημαντικές μεταβολές στον αριθμό των παραγόμενων σποριαγγείων (**Πίνακας 18**).



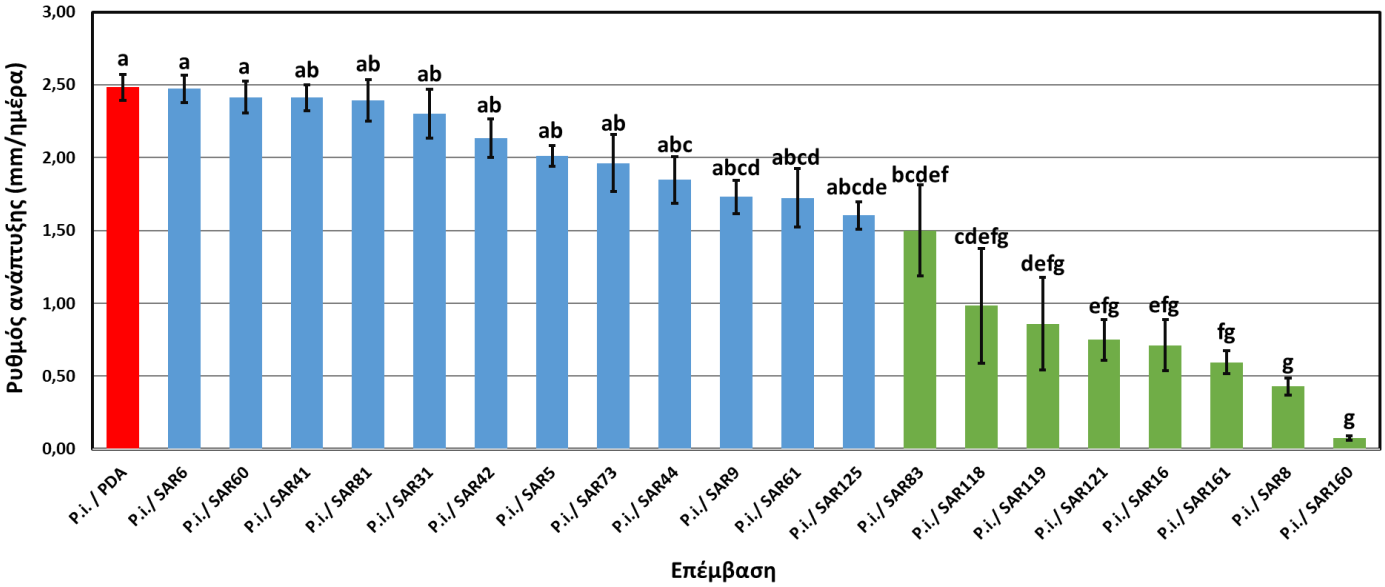
Γράφημα 16. Παρεμπόδιση (%) του ρυθμού της μυκηλιακής ανάπτυξης (mm/ημέρα) του παθογόνου ***P. infestans*** (απομόνωση 88069) από τα 173 βακτηριακά στελέχη σε τυπικές δοκιμές αντιπαραβολής, στο πλαίσιο προκαταρκτικής αξιολόγησης. Στο κόκκινο πλαίσιο περιλαμβάνονται τα 20 πιο αποτελεσματικά βακτηριακά στελέχη τα οποία εξετάστηκαν περαιτέρω σε διεξοδικές *in-vitro* βιοδοκιμές



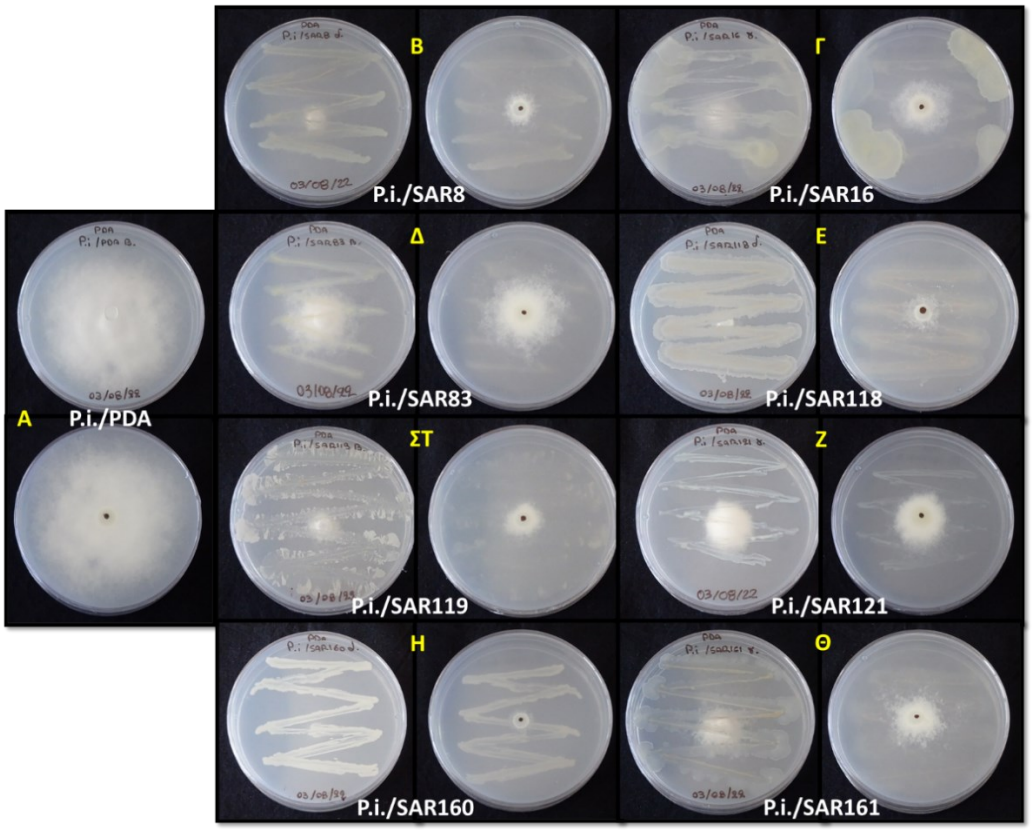
Γράφημα 17. Ρυθμός μυκηλιακής ανάπτυξης (mm/ημέρα) του μύκητα ***P. infestans*** (απομόνωση 88069) υπό την επίδραση των 20 πιο αποτελεσματικών βακτηριακών στελεχών σε **τυπικές δοκιμές αντιπαραβολής** (φθίνουσα κατάταξη). Η κόκκινη στήλη αντιπροσωπεύει το μάρτυρα ενώ οι πράσινες στήλες τα βακτηριακά στελέχη που επέφεραν στατιστικά σημαντική μείωση του ρυθμού ανάπτυξης. Οι τιμές οι οποίες ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σύμφωνα με τη δοκιμασία *Tukey HSD* με $P \leq 0.05$.



Εικόνα 32. Αντιπροσωπευτικά τρυβλία των **δοκιμών αντιπαραβολής** όπου απεικονίζονται οι επεμβάσεις με τα βακτηριακά στελέχη που επέδειξαν στατιστικά σημαντική μείωση στο ρυθμό ανάπτυξης του ωομύκητα ***P. infestans*****. Α.1, Α.2)** Επάνω και κάτω όψη του μάρτυρα (Control) καθώς και επεμβάσεις με τα βακτηριακά στελέχη: **Β)** SAR5, **Γ)** SAR8, **Δ)** SAR9, **Ε)** SAR16, **ΣΤ)** SAR31, **Ζ)** SAR42, **Η)** SAR44, **Θ)** SAR60, **Ι)** SAR61, **Κ)** SAR73, **Λ)** SAR81, **Μ)** SAR83, **Ν)** SAR118, **Ξ)** SAR119, **Ο)** SAR121, **Π)** SAR125, **Ρ)** SAR160 και **Σ)** SAR161.



Γράφημα 18. Ρυθμός μυκηλιακής ανάπτυξης (mm/ημέρα) του ωομύκητα ***P. infestans*** (απομόνωση 88069) υπό την επίδραση των 20 πιο αποτελεσματικών βακτηριακών στελεχών σε **δοκιμές πτητικών** (φθίνουσα κατάταξη). Η κόκκινη στήλη αντιπροσωπεύει τον μάρτυρα ενώ οι πράσινες στήλες τα βακτηριακά στελέχη που επέφεραν σημαντική στατιστική μείωση του ρυθμού ανάπτυξης. Οι τιμές οι οποίες ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σύμφωνα με τη δοκιμασία *Tukey HSD* με $P \leq 0.05$.



Εικόνα 33. Αντιπροσωπευτικά τρυβλία των **δοκιμών με πτητικά** όπου απεικονίζονται οι επεμβάσεις με τα βακτηριακά στελέχη που επέδειξαν στατιστικά σημαντική μείωση στον ρυθμό ανάπτυξης του ωομύκητα ***P. infestans***. **Α)** Μάρτυρας (Control) καθώς και επεμβάσεις με τα βακτηριακά στελέχη **Β)** SAR8, **Γ)** SAR16, **Δ)** SAR83, **Ε)** SAR118, **ΣΤ)** SAR119, **Ζ)** SAR121, **Η)** SAR160 και **Θ)** SAR161.

Πίνακας 17. Μέσοι όροι και τυπικά σφάλματα (±) των μετρήσεων των τυπικών **δοκιμών αντιπαραβολής** που προέκυψαν από την αξιολόγηση της αντιμικροβιακής δράσης των 20 πιο αποτελεσματικών βακτηριακών στελεχών έναντι του ωομύκητα ***P. infestans***

Τύπος βιοδοκιμών	**Επέμβαση**	**Μυκητολογικές παράμετροι**		
		Ρυθμός ανάπτυξης (mm/ημέρα)	**Αριθμός σπορειαγγείων (×10^5)/ δισκίο διαμέτρου 5 mm**	**Πάχος υφών (μm)**
Δοκιμές αντιπαραβολής (Confrontation test)	**P.i. + PDA**	2.1±0.2 a	4.7±2.3 ab	8.3±0.3 abc
	P.i. + SAR5	0.9±0.1 cdef	2.0±0.2 ab	7.1±0.3 cdefg
	P.i. + SAR6	1.8±0.1 ab	2.9±0.9 ab	7.7±0.3 bcde
	P.i. + SAR8	0.6±0.1 efgh	0.9±0.3 ab	7.5±0.2 bcdefg
	P.i. + SAR9	0.7±0.1 efgh	3.5±1.7 ab	7.0±0.2 defg
	P.i. + SAR16	1.0±0.1 cde	1.3±0.5 ab	7.6±0.2 bcdef
	P.i. + SAR31	0.9±0.0 defg	2.3±0.5 ab	7.5±0.3 bcdefg
	P.i. + SAR41	2.1±0.1 a	0.1±0.1 b	8.6±0.3 ab
	P.i. + SAR42	1.5±0.3 bc	1.7±0.7 ab	7.5±0.2 bcdefg
	P.i. + SAR44	1.1±0.1 cde	3.1±1.1 ab	8.1±0.2 abcd
	P.i. + SAR60	1.1±0.1 cde	2.2±0.9 ab	7.2±0.3 cdefg
	P.i. + SAR61	0.4±0.1 fgh	1.8±0.5 ab	6.3±0.2 g
	P.i. + SAR73	1.4±0.0 bcd	1.1±0.5 ab	6.7±0.2 efg
	P.i. + SAR81	1.2±0.2 cde	0.4±0.2 b	7.1±0.2 defg
	P.i. + SAR83	1.1±0.1 cde	3.0±1.0 ab	8.9±0.4 a
	P.i. + SAR118	0.3±0.0 gh	5.5±1.4 a	6.4±0.2 fg
	P.i. + SAR119	0.2±0.0 h	0.2±0.1 b	7.9±0.2 abcde
	P.i. + SAR121	1.1±0.0 cde	2.1±0.6 ab	7.5±0.1 bcdefg
	P.i. + SAR125	1.2±0.2 cde	1.4±1.2 ab	7.8±0.2 abcde
	P.i. + SAR160	0.2±0.1 h	3.3±0.8 ab	8.5±0.3 ab
	P.i. + SAR161	0.3±0.0 gh	1.5±0.2 ab	8.1±0.2 abcd

***** Εντός των στηλών, οι τιμές οι οποίες ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σύμφωνα με τη δοκιμασία *Tukey HSD* με $P \leq 0.05$.

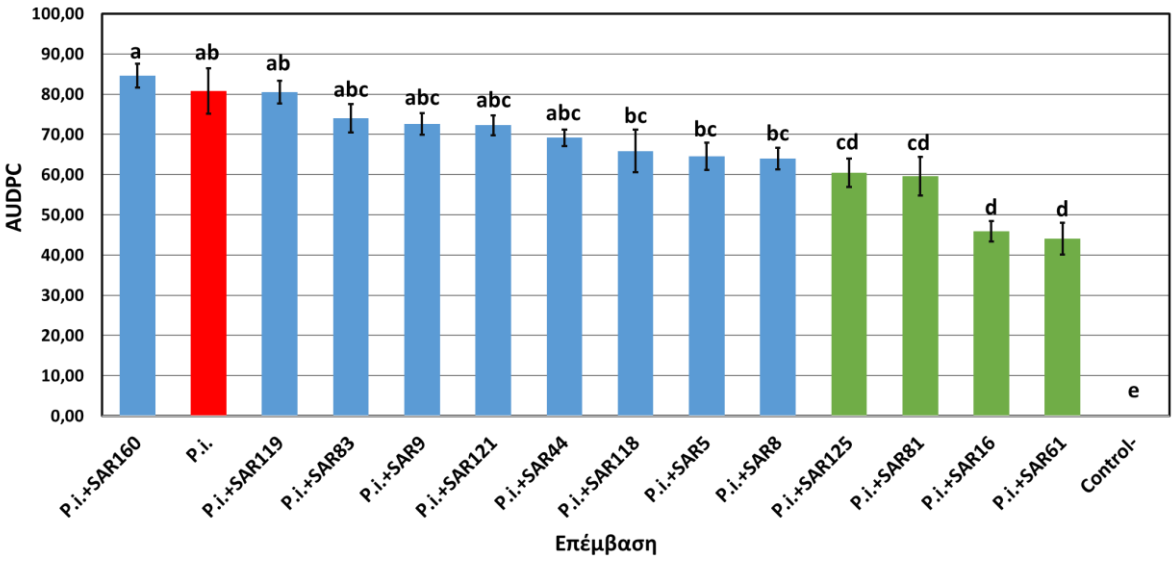
Πίνακας 18. Μέσοι όροι και τυπικά σφάλματα (±) των μετρήσεων των μυκητολογικών παραμέτρων σε **δοκιμές με πτητικά** που προέκυψαν από την αξιολόγηση της αντιμικροβιακής δράσης των 20 πιο αποτελεσματικών βακτηριακών στελεχών έναντι του ωομύκητα ***P. infestans***

Τύπος βιοδοκιμών	**Επέμβαση**	**Μυκητολογικές παράμετροι**		
		Ρυθμός ανάπτυξης (mm/ημέρα)	**Αριθμός σπορειαγγείων ($\times 10^5$)/ δισκίο διαμέτρου 5 mm**	**Πάχος υφών (μm)**
Δοκιμές πτητικών (Volatile test)	**P.i. / PDA**	2.5±0.1 a	2.7±0.5 ab	8.9±0.3 a
	P.i. / SAR5	2.0±0.1 ab	0.0±0.0 b	7.5±0.3 cde
	P.i. / SAR6	2.5±0.1 a	4.5±3.2 a	8.5±0.3 abc
	P.i. / SAR8	0.4±0.1 g	0.0±0.0 b	7.2±0.2 de
	P.i. / SAR9	1.7±0.1 abcd	0.0±0.0 b	7.9±0.1 abcd
	P.i. / SAR16	0.7±0.2 efg	0.0±0.0 b	8.0±0.2 abcd
	P.i. / SAR31	2.3±0.2 ab	0.0±0.0 b	5.9±0.2 f
	P.i. / SAR41	2.4±0.1 ab	0.3±0.2 b	7.8±0.2 abcde
	P.i. / SAR42	2.1±0.1 ab	0.7±0.3 b	7.3±0.2 de
	P.i. / SAR44	1.8±0.2 abc	0.1±0.1 b	7.4±0.2 cde
	P.i. / SAR60	2.4±0.1 a	0.6±0.4 b	7.4±0.3 cde
	P.i. / SAR61	1.7±0.2 abcd	0.3±0.2 b	7.8±0.2 abcde
	P.i. / SAR73	2.0±0.2 ab	0.1±0.1 b	7.5±0.2 bcde
	P.i. / SAR81	2.4±0.1 ab	0.2±0.1 b	7.0±0.1 def
	P.i. / SAR83	1.5±0.3 bcdef	0.2±0.2 b	7.1±0.2 de
	P.i. / SAR118	1.0±0.4 cdefg	0.0±0.0 b	8.7±0.4 ab
	P.i. / SAR119	0.9±0.3 defg	0.1±0.1 b	7.5±0.2 cde
	P.i. / SAR121	0.7±0.1 efg	0.0±0.0 b	7.8±0.2 abcde
	P.i. / SAR125	1.6±0.1 abcde	0.0±0.0 b	6.7±0.3 ef
	P.i. / SAR160	0.1±0.0 g	0.0±0.0 b	7.6±0.3 bcde
	P.i. / SAR161	0.6±0.1 fg	0.0±0.0 b	7.5±0.2 bcde

***** Εντός των στηλών, οι τιμές οι οποίες ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σύμφωνα με τη δοκιμασία *Tukey HSD* με $P \leq 0.05$.

3.3.2 Αποτελέσματα in-vivo βιοδοκιμών σε φυλλάρια τομάτας

Αναφορικά με τα αποτελέσματα των *in-vivo* βιοδοκιμων σε φυλλάρια τομάτας, **4 βακτηριακά στελέχη** (SAR16, SAR61, SAR81 και SAR125) μείωσαν σημαντικά τη σχετική AUDPC της ασθένειας σε σύγκριση με τον θετικό μάρτυρα. Επιπρόσθετα, **6 βακτηριακά στελέχη** (SAR8, SAR16, SAR61, SAR81, SAR118 και SAR125) εμφάνισαν στατιστικά σημαντική μείωση της τελικής διαμέτρου της αναπτυσσόμενης κηλίδας (**Γράφημα 19**, **Εικόνα 34** και **Πίνακας 19**).

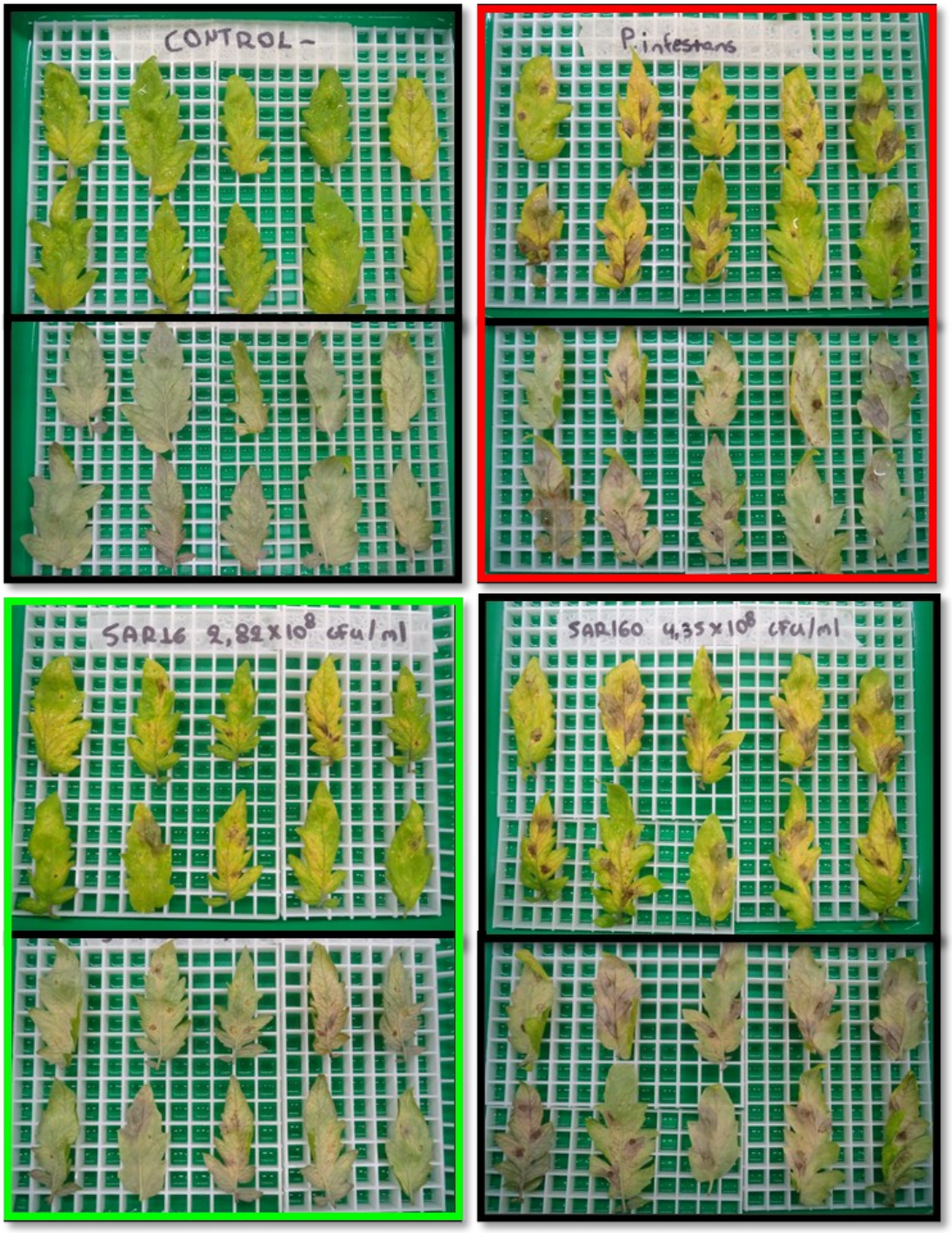


Γράφημα 19. AUDPC σε φυλλάρια τομάτας των επεμβάσεων του αρνητικού (Control-) και του θετικού μάρτυρα (P.i.) καθώς και των επεμβάσεων με τα 13 υπό αξιολόγηση βακτηριακά στελέχη. Οι τιμές οι οποίες ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σύμφωνα με τη δοκιμασία *Tukey HSD* με $P \leq 0.05$.

Πίνακας 19. Μέσες τιμές και τυπικά σφάλματα (±) των μετρήσεων των παραμέτρων της ασθένειας του περονόσπορου σε φυλλάρια τομάτας

	Παράμετροι ασθένειας	
Επέμβαση	**Τελική διάμετρος κηλίδας (mm)**	**AUDPC**
Control-	0.0±0.0 f	0.0±0.0 e
P.i.	20.5±1.0 a	80.8±5.8 ab
P.i.+SAR5	17.4±0.8 abc	64.5±3.4 bc
P.i.+SAR8	15.0±0.8 bcd	64.0±2.7 bc
P.i.+SAR9	17.5±0.7 abc	72.6±2.7 abc
P.i.+SAR16	10.8±0.7 de	45.9±2.6 d
P.i.+SAR44	16.4±0.7 abc	69.2±2.0 abc
P.i.+SAR61	10.3±1.1 e	44.1±4.0 d
P.i.+SAR81	14.4±1.2 cde	59.6±4.8.6 cd
P.i.+SAR83	17.0±1.1 abc	74.0±3.5 abc
P.i.+SAR118	15.0±1.3 bcd	65.9±5.3 bc
P.i.+SAR119	19.1±0.8 ab	80.5±2.9 ab
P.i.+SAR121	18.3±1.1 abc	72.3±2.5 abc
P.i.+SAR125	14.1±1.1 cde	60.5±3.6 cd
P.i.+SAR160	19.6±0.7 a	84.6±3.0 a

*Εντός των στηλών, οι τιμές οι οποίες ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σύμφωνα με τη δοκιμασία *Tukey HSD* με $P \leq 0.05$.



Εικόνα 34. Συμπτώματα του περονοσπόρου σε φυλλάρια τομάτας των επεμβάσεων **Control-, P.i, P.i.+SAR16** και **P.i.+SAR160** στις 6 ημέρες από τη μόλυνση. Σε πράσινο πλαίσιο απεικονίζεται η επέμβαση που επέφερε σημαντικά στατιστικές διαφορές με τον θετικό μάρτυρα (κόκκινο πλαίσιο).

4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η παγκόσμια γεωργική παραγωγή πλήττεται από πληθώρα βιοτικών και αβιοτικών καταπονήσεων οι οποίες προκαλούν σημαντικές οικονομικές απώλειες. Υπολογίζεται ότι το 20-40% των απωλειών αυτών προκαλείται από ασθένειες φυτών (απώλειες 40 δισεκατομμυρίων δολαρίων ετησίως), με τις μυκητολογικές ασθένειες να αντιπροσωπεύουν το 42% και τις βακτηριολογικές το 27% του ανωτέρου ποσοστού. Πράγματι, οι μύκητες αποτελούν τις πιο σημαντικές απειλές των καλλιεργειών καθώς διαθέτουν όλα εκείνα τα χαρακτηριστικά που τους καθιστούν επικίνδυνους. Τέτοια χαρακτηριστικά είναι η υψηλή μολυσματικότητα, το υψηλό αναπαραγωγικό δυναμικό, η αυξημένη διασπορά τους, η ικανότητα διάδοσης των πολλαπλασιαστικών μονάδων σε μεγάλες αποστάσεις προκαλώντας μολύνσεις σε φυτά-ξενιστές σε σύντομο χρονικό διάστημα καθώς και ο σχηματισμός ανθεκτικών δομών διαχείμασης με τις οποίες επιβιώνουν για πολλά χρόνια ακόμη και σε δυσμενείς συνθήκες (Roca-Couso et al., 2021). Τις τελευταίες δεκαετίες, η διαχείριση των ασθενειών επιτελείται κατά κύριο λόγο με τη χρήση χημικών σκευασμάτων. Ωστόσο, τα τελευταία χρόνια υπάρχει η τάση απόσυρσης των χημικών σκευασμάτων καθώς αποτελούν απειλή για την υγεία τόσο του παραγωγού όσο και του καταναλωτή και μολύνουν το περιβάλλον καθώς παραμένουν ως τοξικά υπολείμματα στο έδαφος. Επιπρόσθετα, τα παθογόνα είναι ικανά να αναπτύσσουν ανθεκτικότητα στις διάφορες χρησιμοποιούμενες δραστικές ενώσεις γεγονός που έχει ως απόρροια αποτελεσματικά χημικά σκευάσματα να μην έχουν πλέον τα επιθυμητά αποτελέσματα (Shi and Sun 2017).

Το γεγονός αυτό οδηγεί την επιστημονική κοινότητα στην εύρεση νέων εναλλακτικών μεθόδων διαχείρισης των ασθενειών. Μια τέτοια προσέγγιση είναι η χρήση ανθεκτικών ενδοφυτικών μικροοργανισμών, απομονωμένων από αλόφυτα τα οποία μπορούν να προάγουν τη φυτική ανάπτυξη και να προσδίδουν αντοχή των φυτών σε ποικίλες καταπονήσεις. Οι ενδοφυτικοί μικροοργανισμοί αποικίζουν τους φυτικούς ιστούς, μέσω της ρίζας ή και των στομάτων, χωρίς να προκαλούν αρνητικές συνέπειες στον ξενιστή τους (Ryan et al., 2008; Szymańska et al., 2022). Πληθώρα μελετών έχει αποδείξει τις ευεργετικές επιδράσεις των ενδοφυτικών μικροοργανισμών. Οι ενδοφυτικοί μικροοργανισμοί συμβάλλουν στην άμυνα των

φυτών, στην αντοχή από αβιοτικά στρες καθώς και στην φυτική ανάπτυξη προάγοντας την φυτική βιομάζα (Christakis et al., 2021; Slama et al., 2023).

Στη παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή διερευνήθηκε η φυτοπροστατευτική ικανότητα 173 ενδοφυτικών βακτηριακών στελεχών απομονωμένων από αλόφυτα της Κρήτης, έναντι σημαντικών φυτοπαθογόνων των κηπευτικών καλλιεργειών. Ειδικότερα, σε πρώτη φάση διενεργήθηκαν *in-vitro* βιοδοκιμές προκειμένου να επιλεχθούν τα πιο αποτελεσματικά βακτηριακά στελέχη αξιολογώντας την επίδραση τους σε διάφορες μυκητολογικές παραμέτρους όπως είναι ο ρυθμός ανάπτυξης, η παραγωγή κονιδίων, το πάχος των υφών αλλά και ο σχηματισμός σύνθετων μικροβιολογικών κατασκευών. Τα πιο αποτελεσματικά στελέχη του εκάστοτε παθοσυστήματος αξιολογήθηκαν σε *in-planta* ή και *in-vivo* βιοδοκιμές προκειμένου να διερευνηθεί η φυτοπροστατευτική τους δράση έναντι των σημαντικότατων φυτοπαθογόνων *B. cinerea*, *V. dahliae* και *P. infestans*.

Βάσει των αποτελεσμάτων του παθοσυστήματος **τομάτα-*B. cinerea***, το βακτήριο *Kushneria marisflavi* (κωδικός SAR128) μείωσε σημαντικά τη συμπτωματολογία της ασθένειας σε φυτά τομάτας. Το συγκεκριμένο βακτηριακό είδος ουδέποτε έχει αναφερθεί ως βιολογικός παράγοντας για τη διαχείριση παρασιτικών φυτικών ασθενειών παγκοσμίως. Ωστόσο, πρόσφατη δημοσίευση των Szymańska et al. (2022) αξιολογήθηκαν τα βακτηριακά στελέχη *Kushneria marisflavi* και *Pseudomonas stutzeri* ως προς την ικανότητα τους να προσδίδουν αντοχή σε φυτά υπό συνθήκες υψηλής αλατότητας. Και τα δύο στελέχη ήταν ικανά να αυξάνουν την αντοχή φυτών μαρουλιού, ηλίανθου και κριθαριού στην αλατότητα. Επιπροσθέτως, όσον αφορά στα αποτελέσματα του παθοσυστήματος **τομάτα-*B. cinerea***, ένα βακτηριακό στέλεχος (κωδικός SAR15, μη ταυτοποιημένο) είχε την ικανότητα να μειώνει την συμπτωματολογία της ασθένειας σε καρπούς που μολύνθηκαν με εναπόθεση κονιδιακού αιωρήματος του παθογόνου ενώ 8 βακτηριακά στελέχη μείωσαν την συμπτωματολογία της ασθένειας σε καρπούς που μολύνθηκαν με εναπόθεση δισκίου φρέσκιας καλλιέργειας του μύκητα. Αξίζει να αναφερθεί ότι στην περίπτωση των καρπών που μολύνθηκαν τεχνητά με εναπόθεση δισκίου φρέσκιας καλλιέργειας του παθογόνου, τα 3 πιο αποτελεσματικά βακτηριακά στελέχη ανήκουν στο γένος *Bacillus* sp. και είναι απομονωμένα από τη φυλλόσφαιρα αλοφύτων. Πιο συγκεκριμένα, πρόκειται για τα βακτήρια *Bacillus mobilis* (SAR111)*, Bacillus amyloliquefaciens* (SAR118) και *Bacillus siamensis* (SAR119). Το *Bacillus* sp.

αποτελεί το πιο ενδελεχώς μελετημένο γένος βακτηρίων στα πλαίσια της βιολογικής αντιμετώπισης με πολλές μελέτες να αναφέρουν την κατασταλτική ικανότητα ειδών τους γένους έναντι του παθογόνου *B. cinerea* (Bouchard-Rochette et al., 2022; Roca-Couso et al., 2021).

Όσον αφορά στο παθοσύστημα **μελιτζάνα-*V. dahliae***, το βακτήριο *Pseudomonas migulae* (κωδικός SAR120) ήταν ικανό να μειώσει τη συμπτωματολογία της ασθένειας στις *in-planta* βιοδοκιμές. Επιπρόσθετα, στο παθοσύστημα **τομάτα-*V. dahliae***, το βακτήριο *Olivibacter soli* (κωδικός SAR60) και ο ζυμομύκητας *Metschnikowia* sp. (κωδικός SAR160) επέδειξαν φυτοπροστατευτική δράση έναντι του παθογόνου. Τα περισσότερα βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιούνται ως βιολογικοί παράγοντες έναντι του *V. dahliae* ανήκουν στα γένη *Pseudomonas* sp. και *Bacillus* sp. Τα βακτήρια του γένους *Pseudomonas* sp. περιορίζουν το φυτοπαθογόνο με διάφορους μηχανισμούς. Έχουν την ικανότητα να παράγουν αντιβιοτικά (π.χ. πυολομητρίνη, πυρολνιτρίνη), χηλικές ενώσεις σιδηροφόρων (π.χ. εξάντληση σιδήρου) αλλά και διάφορα λυτικά ένζυμα που καταστρέφουν το κυτταρικό τοίχωμα των παθογόνων (Harting et al., 2021; Kowalska 2021). Αναφορικά με το γένος *Olivibacter* sp., ουδέποτε έως σήμερα έχει αναφερθεί η χρήση του ως βιολογικός παράγοντας έναντι φυτοπαθογόνων. Πρόκειται για ένα βακτηριακό γένος με ελάχιστη διαθέσιμη γνώση το οποίο συνδέεται με την αποικοδόμηση οργανικής ύλης στο έδαφος και έχει αναφερθεί σε μελέτες σχετικές με την κομποστοποίηση (Parab et al., 2023). Ωστόσο εκτός από τα βακτηριακά στελέχη, υπάρχουν αρκετές μελέτες που αξιολογούν ζυμομύκητες έναντι φυτοπαθογόνων στα πλαίσια της βιολογικής αντιμετώπισης. Οι επιφυτικοί ζυμομύκητες αποτελούν φυσική μικροχλωρίδα των φυτών γεγονός που τους καθιστά ιδιαίτερα ανθεκτικούς σε διάφορους περιβαλλοντικούς παράγοντες (π.χ. pH, θερμοκρασία κ.α.). Ειδικότερα, τα γένη *Metschnikowia* sp., *Rhodotaula* sp., και *Pichia* sp. έχουν αξιολογηθεί στο παρελθόν ως δυνητικοί βιολογικοί παράγοντες έναντι ασθενειών (Pawlikowska et al., 2019). Τα είδη του γένους *Metschnikowia* sp έχουν την ικανότητα να παράγουν λυτικά ένζυμα (π.χ. χιτινάσες, γλυκοσιδάσες) αλλά και πουλκερριμινικό οξύ τα οποία έχουν αντιμικροβιακή δράση. Επιπλέον, το πουλκερριμινικό οξύ έχει την ικανότητα να σχηματίζει σύμπλοκα με τα ιόντα σιδήρου προσδίδοντας στο ζυμομύκητα την ικανότητα να ανταγωνίζεται τους μικροοργανισμούς μέσω της εξάντλησης του διαθέσιμου σιδήρου. Πολλές μελέτες αναφέρουν την κατασταλτική ικανότητα του

γένους *Metschnikowia* sp. έναντι σημαντικών παθογόνων όπως είναι και τα *V. dahliae*, *Fusarium* sp., *Alternaria* sp. και *B. cinerea* (Pawlikowska et al., 2019; Türkel et al., 2014).

Τέλος, βάσει των αποτελεσμάτων του παθοσυστήματος **τομάτα-*P. infestans*** προκύπτει ότι τα βακτηριακά στελέχη με κωδικούς SAR16 (*Sphingobium olei*), SAR61 (μη ταυτοποιημένο), SAR81 (μη ταυτοποιημένο) και SAR125 (*Bacillus simplex*) ήταν ικανά να μειώσουν τη συμπτωματολογία της ασθένειας του περονοσπόρου της τομάτας. Η αντιμικροβιακή δράση του γένους *Bacillus* sp. έχει αναφερθεί σε πολλές μελέτες έναντι του φυτοπαθογόνου ωομύκητα *P. infestans* (Hashemi et al., 2022). Τέλος, το βακτηριακό στέλεχος *Sphingobium olei* δεν έχει αναφερθεί ως βιολογικός παράγοντας στα πλαίσια της βιολογικής αντιμετώπισης μέχρι σήμερα.

Τα φασματικά δεδομένα αποτελούν ένα καινοτόμο εργαλείο για τη διάγνωση των ασθενειών. Η χαρτογράφηση του φασματικού φαινοτύπου μπορεί να αποτελέσει ένα σημαντικό εργαλείο το οποίο θα καταδεικνύει τα φυσιολογικά χαρακτηριστικά και τη φυτοϋγειονομική κατάσταση των φυτών. Το ίδιο ισχύει και για τα διάφορα είδη παρασίτων και παθογόνων μικροοργανισμών καθώς καθένα από αυτά έχει τη δικιά του φασματική υπογραφή. Επομένως, η δημιουργία μιας φασματικής βιβλιοθήκης θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί στο πεδίο προκειμένου να πραγματοποιηθεί έγκαιρη διάγνωση της εκάστοτε ασθένειας αλλά και να εκτιμάται η έκταση και η ένταση της προσβολής (Che'Ya et al., 2022). Στη παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή λήφθησαν φασματικά δεδομένα με τη χρήση της κάμερας PhenoCheck στις *in-planta* βιοδοκιμές των παθοσυστημάτων **τομάτα-*B. cinerea***, **τομάτα-*V. dahliae*** και **μελιτζάνα-*V. dahliae***. Από τα δεδομένα αυτά εκτιμήθηκαν οι δείκτες βλάστησης NDVI, CVI, NPCI, GNDVI, PSRI, TVI και EVI και χρησιμοποιήθηκαν ως πρόσθετοι παράμετροι αξιολόγησης της εκάστοτε ασθένειας. Βάσει των αποτελεσμάτων που παρουσιάζονται επαληθεύεται η φυτοπροστατευτική ικανότητα των αποτελεσματικών βακτηριακών στελεχών καθώς οι αποτελεσματικές επεμβάσεις επέφεραν στατιστικές διαφορές σε διάφορους δείκτες βλάστησης σε σύγκριση τόσο με τον αντίστοιχο θετικό μάρτυρα όσο και με επιλεγμένες μη αποτελεσματικές επεμβάσεις με τις οποίες συγκρίθηκαν. Βιβλιογραφικά αναφέρονται περισσότεροι από 40 δείκτες βλάστησης που χρησιμοποιούνται ευρέως σε παγκόσμια κλίμακα σε μελέτες φυτοκάλυψης, συνθηκών ξηρασίας, σχέσης ξενιστή-παθογόνου

αλλά και σε εκτίμηση αποδόσεων διαφόρων καλλιεργειών (Wan et al., 2022). Πολλές μελέτες αξιολογούν διάφορους δείκτες βλάστησης στην διάγνωση, ανίχνευση και εκτίμηση της έντασης διαφόρων ασθενειών. Για παραδειγμα, οι Sancho-Adamson et al., 2019 χρησιμοποίησαν δείκτες βλάστησης για την αξιολόγηση των πρώιμων επιδράσεων της βερτισιλλίωσης σε ασυμπτωματικά δέντρα ελιάς. Οι Calderon et al., 2015, χρησιμοποίησαν φασματικά και θερμικά δεδομένα προκειμένου να ανιχνεύσουν έγκαιρα την ασθένεια της βερτισιλλίωσης σε δέντρα ελιάς αλλά και να ταξινομήσουν τα δεντρύλλια ανάλογα την σοβαρότητα της ασθένειας σε κατηγορίες. Ωστόσο, ουδέποτε έως σήμερα έχει αναφερθεί η δυνατότητα αξιοποίησης των φασματικών δεδομένων για την ευχερή διάκριση αποτελεσματικών και μη αποτελεσματικών επεμβάσεων σε φυτά.

5 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ – ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΕΡΓΑΣΙΕΣ

Από τα αποτελέσματα της παρούσα μεταπτυχιακής διατριβής προκύπτει ότι η αξιοποίηση του ενδοφυτικού και επιφυτικού μικροβιώματος των αλοφύτων θα μπορούσε να αποτελέσει μια εναλλακτική και ταυτόχρονα βιώσιμη λύση για τη διαχείριση σημαντικών φυτοπαθογόνων των κηπευτικών καλλιεργειών όπως είναι ο *B. cinerea*, το *V. dahliae* και το *P. infestans*. Ωστόσο, απαιτείται περαιτέρω αξιολόγηση των βακτηριακών στελεχών σε συνθήκες πεδίου προκειμένου να διερευνηθεί η αλληλεπίδραση των φυτών με τα επιλεγμένα στελέχη σε πραγματικές συνθήκες καλλιέργειας αλλά και πρόσθετοι παράμετροι όπως ο βέλτιστος τρόπος και χρόνος εφαρμογής καθώς και η δοσολογία. Επιπλέον, απαιτείται ενδελεχής κατανόηση των μηχανισμών δράσης των επιλεγμένων βακτηριακών στελεχών σε μοριακό, φυσιολογικό και βιοχημικό επίπεδο, καθώς και η αξιολόγηση τους σε άλλα σημαντικά φυτοπαθογόνα και φυτά-ξενιστές.

Η λήψη φασματικών δεδομένων μπορεί να αποτελέσει ένα σημαντικό εργαλείο για την έγκαιρη διάγνωση των ασθενειών των φυτών. Στην παρούσα μελέτη, παρότι λήφθηκε πλήθος φασματικών δεδομένων κατά την πορεία των βιοδοκιμών, η ανάλυση πραγματοποιήθηκε μόνο για τους προαναφερθέντες δείκτες βλάστησης σε επιλεγμένες χρονικές στιγμές. Αν και διαπιστώθηκαν διαφορές μεταξύ των

επεμβάσεων, απαιτείται περαιτέρω ανάλυση των φασματικών δεδομένων προκειμένου να αξιοποιηθεί στο έπακρο η κεκτημένη πληροφορία που αφορά στο φασματικό φαινότυπο των φυτών των κατασταλτικών επεμβάσεων. Πρόκειται για μια αρκετά καινοτόμα πρακτική με ελάχιστη έως σήμερα διαθέσιμη πληροφορία στον κλάδο της Φυτοπαθολογίας και κυρίως στην κατεύθυνση της βιολογικής αντιμετώπισης. Συνεπώς, απαιτείται πρόσθετος πειραματισμός και χωροχρονική ανάλυση φασματικών δεδομένων τόσο σε συνθήκες πεδίου όσο και σε ελεγχόμενες εργαστηριακές συνθήκες προκειμένου να δημιουργηθούν αξιόπιστες φασματικές βιβλιοθήκες που θα συμβάλλουν στην ορθή μηχανική εκμάθηση και μοντελοποίηση της φασματικής πληροφορίας. Η αξιοποίηση των δυνατοτήτων της φασματικής απεικόνισης θα καταστήσει δυνατή την έγκυρη διάγνωση των ασθενειών των φυτών, μεμονωμένα ή συνδυαστικά, σε αρκετά πρώιμα στάδια, επιτρέποντας μετέπειτα την έγκαιρη και στοχευμένη επέμβαση.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Abada K. A. M., Attia, A. M. F.,& Zyton, M. A. L. 2018. Management of pepper verticillium wilt by combinations of inducer chemicals for plant resistance, bacterial bioagents and compost. Journal of Applied Biotechnology Bioengineering 5,(2),117–127.

Alabouvette, C., Olivain, C., and Steinberg, C., 2006. Biological control of plant diseases: the European situation. European Journal of Plant Pathology, 114, 329-341

Alam, M. W., Rehman, A., Ahmad, S., Sarwar, M., Naseem, M. K., Chattha, M. B., Malik, U., & Ali, S. 2019. First report of *Botrytis cinerea* causing postharvest fruit rot on stored pomegranates in Pakistan. Plant disease, 103, (2), 374-374.

Alhaddad, F. A., Bitaar, Z. M., & Abu-Dieyeh, M. H. 2024. Diversity, Characterization, and Potential Applications of Bacterial Endophytes Isolated from the Halophyte Limonium axillare. Journal of Plant Growth Regulation, 1-18.

Amaro, T. M., Thilliez, G. J., Motion, G. B., & Huitema, E., 2017. A perspective on CRN proteins in the genomics age: evolution, classification, delivery and function revisited. Frontiers in plant science, 8, 99.

Amselem, J., Cuomo, C.A., van Kan, J.A.L., Viaud, M., Benito, E.P., Couloux, A.,

Coutinho, M. P., de Vries, P. R., Dyer, S. P., Fillinger, S., Fournier, E., Gout, L., et al., 2011. Genomic analysis of the necrotrophic fungal pathogens *Sclerotinia sclerotiorum* and *Botrytis cinerea*. PLoS Genetics, 7.

Aylor, D. E., 2003. Spread of plant disease on a continental scale: role of aerial dispersal of pathogens. Ecology, 84, (8), 1989-1997.

Bengtsson, T. 2013. Boosting potato defence against late blight. Acta Universitatis agriculturae Sueciae, (1652-6880), 58.

Bi, K., Liang, Y., Mengiste, T., & Sharon, A., 2023. Killing softly: A roadmap of *Botrytis cinerea* pathogenicity. Trends in plant science, 28, (2), 211-222.

Bibi, F., Strobel, G. A., Naseer, M. I., Yasir, M., Khalaf Al-Ghamdi, A. A., & Azhar, E. I. 2018. Halophytes-associated endophytic and rhizospheric bacteria: diversity, antagonism and metabolite production. Biocontrol science and technology, 28, (2), 192-213.

Bhandari, D. D., & Brandizzi, F., 2024. Logistics of defense: The contribution of endomembranes to plant innate immunity. Journal of Cell Biology, 223,(6).

Bika, R., Baysal-Gurel, F., & Jennings, C., 2021. *Botrytis cinerea* management in ornamental production: a continuous battle. Canadian Journal of Plant Pathology, 43, (3), 345-365.

Boddy, L. 2015. Pathogens of autotrophs. The fungi,Waltham, MA, 245-292.

Boevink, P. C., McLellan, H., Gilroy, E. M., Naqvi, S., He, Q., Yang, L. N., Wang, X. D., Turnbull, D., Armstrong, M. R., Tian, Z. D., and Birch, P. R. J., 2016. Oomycetes seek help from the plant: *Phytophthora infestans* effectors target host susceptibility factors. Molecular Plant, 9, 636-638

Boller, T., & Felix, G., 2009. A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. Annual review of plant biology, 60, 379-406.

Bonaterra, A., Badosa, E., Daranas, N., Francés, J., Roselló, G., & Montesinos, E. 2022. Bacteria as biological control agents of plant diseases. Microorganisms, 10, (9), 1759.

Bouchard-Rochette, M., Machrafi, Y., Cossus, L., Nguyen, T. T. A., Antoun, H., Droit, A., & Tweddell, R. J. 2022. *Bacillus pumilus* PTB180 and *Bacillus subtilis* PTB185: Production of lipopeptides, antifungal activity, and biocontrol

ability against *Botrytis cinerea*. Biological Control, 170, 104925.

CABI, 2023. "*Verticillium dahliae* (*Verticillium* wilt)". Διαθέσιμο on line: www.cabi.org/isc/datasheet/56275. Τελευταία πρόσβαση: 12/8/2023.

Calderón, R., Navas-Cortés, J. A., & Zarco-Tejada, P. J. 2015. Early detection and quantification of Verticillium wilt in olive using hyperspectral and thermal imagery over large areas. Remote Sensing, 7, (5), 5584-5610.

Campbell, C.L., & Madden, L.V., 1990. Introduction to Plant Disease Epidemiology. John Wiley and Sons, New York.

Chaurasia, B., Pandey, A., Palni, L. M. S., Trivedi, P., Kumar, B., and Colvin, N. 2005. Diffusible and volatile compounds produced by an antagonistic *Bacillus subtilis* strain cause structural deformations in pathogenic fungi *in vitro*. Microbiological Research, 160, 75–81.

Che'Ya, N. N., Mohidem, N. A., Roslin, N. A., Saberioon, M., Tarmidi, M. Z., Arif Shah, J., Fazlil llahi, W., & Man, N., 2022. Mobile computing for pest and disease management using spectral signature analysis: A review. Agronomy, 12(4), 967.

Chen, A., Hu, J., Sun, S., and Xu, G., 2007. Conservation and divergence of both phosphate- and mycorrhiza-regulated physiological responses and expression patterns of phosphate transporters in solanaceous species. New Phytologist, 173, 817–831

Chen, J. Y., Liu, C., Gui, Y. J., Si, K. W., Zhang, D. D., Wang, J., Short, D. P. G., Huang, J. Q., Li, N. Y., Liang, Y., Zhang, W. Q., Yang, L., Ma, X. F., Li, T. G., Zhou, L., Wang, B. L., Bao, Y. M., Subbarao, K. V., Zhang, G. Y., & Dai, X. F.,. 2018. Comparative genomics reveals cotton-specific virulence factors in flexible genomic regions in *Verticillium dahliae* and evidence of horizontal gene transfer from *Fusarium*. New Phytologist, 217, 756–770.

Chen, J. Y., Xiao, H. L., Gui, Y. J., Zhang, D. D., Li, L., Bao, Y. M. & Dai, X. F. 2016. Characterization of the *Verticillium dahliae* exoproteome involves in pathogenicity from cotton-containing medium. Frontiers in Microbiology, 7, 1709.

Chen, T., Zhang, Z., Chen, Y., Li, B. & Tian, S., 2023. *Botrytis cinerea*. Current Biology, 33, R460–R462.

Choquer, M., Rascle, C., Gonçalves, I. R., de Vallée, A., Ribot, C., Loisel, E., Smievski, P., Ferria, J., Savadogo, M., Souibgui, E., Gagey, M. J., Dupuy, J. W., Rollins, J. A., Marcato, R., Nous, C., Bruel, C., & Poussereau, N. 2021. The infection cushion of *Botrytis cinerea*: a fungal 'weapon'of plant-biomass destruction. Environmental Microbiology, 23, (4), 2293-2314.

Christakis, C. A., Daskalogiannis, G., Chatzaki, A., Markakis, E. A., Mermigka, G., Sagia, A., Rizzo, G. F., Catara, V., Lagkouvardos, I., Studholme, D. J., & Sarris, P. F. 2021. Endophytic bacterial isolates from halophytes demonstrate phytopathogen biocontrol and plant growth promotion under high salinity. Frontiers in Microbiology, 1001.

Conrath, U., Beckers, G. J., Langenbach, C. J., & Jaskiewicz, M. R. 2015. Priming for enhanced defense. Annual review of phytopathology, 53, 97-119.

Cook, R. J., 1985. Biological control of plant pathogens: theory to application. Phytopathology, 75, (1), 25-29.

Daniel, B., Konrad, B., Toplak, M., Lahham, M., Messenlehner, J., Winkler, A., and Macheroux, P. 2017. The family of berberine bridge enzyme-like enzymes: A treasure-trove of oxidative reactions. Archives Biochemistry Biophysics**,** 632:88-103.

Domsch, K. H., Gams, W., and Anderson, T. H., 1980. Compendium of soil fungi. Volume 1. Academic. Press. London, U. K

Droby, S., & Lichter, A., 2007. Post-harvest *Botrytis* infection: etiology, development and management. In *Botrytis:* Biology, pathology and control, Dordrecht: Springer Netherlands, 349-367.

Duanis-Assaf, D., Galsurker, O., Davydov, O., Maurer, D., Feygenberg, O., Sagi, M., Poverenov, E., Fluhr, R., & Alkan, N., 2022. Double-stranded RNA targeting fungal ergosterol biosynthesis pathway controls *Botrytis cinerea* and postharvest grey mould. Plant Biotechnology Journal, 20, 226–237.

Elad, Y., Pertot, I., Cotes Prado, A.M. & Stewart, A., 2016. Plant hosts of *Botrytis* spp. In: Fillinger: *Botrytis* – the fungus, the pathogen and its management in agricultural systems. Switzerland: Springer International Publishing, 413–486.

Erwin, D. C., & Ribeiro, O. K. 1996. *Phytophthora* diseases worldwide. American Phytopathological Society APS Press.

Fradin, E. F., & Thomma, B. P. H. J., 2006. Physiology and molecular aspects of Verticillium wilt diseases caused by *V. dahliae* and *V. albo-atrum*. Molecular Plant Pathology, 7, 71–86.

Furuichi, N., Yokokawa, K., Okamura, H., & Ohta, M. 2014. PiPE, a *Phytophthora*-associated PAMPS from *P. infestans*, Binds to a Ca2+-Dependent Protein Kinase (CDPK) in Potato for the Induction of Hypersensitive Reaction. Journal of Clinical and Experimental Pathology, 4, (156), 2161-0681.

Gao, L., Ma, J., Liu, Y., Huang, Y., Mohamad, O. A. A., Jiang, H., Egamberdiea, D., & Li, L. 2021. Diversity and biocontrol potential of cultivable endophytic bacteria associated with halophytes from the West Aral Sea basin. Microorganisms, 9, (7), 1448.

Gao P, Qin J, Li D, Zhou S., 2018. Inhibitory effect and possible mechanism of a *Pseudomonas* strain QBA5 against gray mold on tomato leaves and fruits caused by *Botrytis cinerea*. PLoS One. 13, 1–16.

Glass, N. L., Schmoll, M., Cate, J. & Coradetti, S., 2013. Plant cell wall deconstruction by ascomycete fungi. Annual Review of Microbiology, 67,477–498.

Gómez-Gálvez, F. J., Vega-Macías, V., Hidalgo-Moya, J. C., Hidalgo-Moya, J. J., & Rodríguez-Jurado, D., 2020. Application to soil of disinfectants through irrigation reduces *Verticillium dahliae* in the soil and verticillium wilt of olive. Plant Pathology, 69, (2), 272-283.

Goodwin, S. B., Cohen, B. A., Deahl, K. L., & Fry, W. E. 1994. Migration from northern Mexico as the probable cause of recent genetic changes in populations of *Phytophthora infestans*. Phytopathology, 84, 553-558.

Govrin, E. M., & Levine, A. 2000. The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. Current biology,10(13), 751-757.

Grenville-Briggs, L. J., Avrova, A. O., Bruce, C. R., Williams, A., Whisson, S. C., Birch, P. R. J., & Van West, P., 2005. Elevated amino acid biosynthesis in *Phytophthora infestans* during appressorium formation and potato infection. Fungal Genetics and Biology, 42, (3), 244-256.

Harting, R., Nagel, A., Nesemann, K., Bastakis, E., Kusch, H., Stanley, C. E., Stockli,

M., Kaever, A., Hoff, K. J., Stanke, M., DeMello, A. J., Kunzler, M., Haney, C. H., Braus-Stromeyer, S. A., & Braus, G. H. 2021. *Pseudomonas* strains induce transcriptional and morphological changes and reduce root colonization of *Verticillium* spp. Frontiers in Microbiology, 12, 652468.

Hashemi, M., Tabet, D., Sandroni, M., Benavent-Celma, C., Seematti, J., Andersen, C. B., & Grenville-Briggs, L. J. 2022. The hunt for sustainable biocontrol of oomycete plant pathogens, a case study of *Phytophthora infestans*. Fungal Biology Reviews, 40, 53-69.

Hausbeck, M. K., & Pennypacker, S. P,. 1991. Influence of grower activity and disease incidence on concentrations of airborne conidia of *Botrytis cinerea* among geranium stock plants. Plant Disease. 75:798–803.

Haverkort, A. J., Struik, P. C., Visser, R. G. F., and Jacobsen, E., 2009. Applied biotechnology to combat late blight in potato caused by *Phytophthora infestans*. Potato Research. 52, 249-264.

Hua, L., Yong, C., Zhanquan, Z., Boqiang, L., Guozheng, Q. & Shiping, T. 2018. Pathogenic mechanisms and control strategies of *Botrytis cinerea* causing post-harvest decay in fruits and vegetables. Food Quality and Safety, 2, 111–119.

Inderbitzin, P., Davis. R. M., Bostock R. M., Usami, T., Platt, H. W., and Subbarao, K. V., 2011. Phylogenetics and Taxonomy of the Fungal Vascular Wilt Pathogens *Verticillium* with the Descriptions of Five New Species. PLoS ONE, 6(12), 1-22

Inderbitzin, P., & Subbarao, K. V., 2014. *Verticillium* systematics and evolution: how confusion impedes Verticillium wilt management and how to resolve it. Phytopathology, 104,564–574.

Jones, J. D., & Dangl, J. L., 2006. The plant immune system. Nature, 444, (7117), 323-329.

Klosterman, S. J., Atallah, Z. K., Vallad G. E., & Subbarao, K. V., 2009. Diversity, pathogenicity, and management of *Verticillium* species. Annual Review of Phytopathology.; 47, 39–62.

Köhl, J., Kolnaar, R., & Ravensberg, W. J. 2019. Mode of action of microbial biological control agents against plant diseases: relevance beyond efficacy. Frontiers in plant science, 845.

Korolev N, Pérez-Artés E, Bejarano-Alcázar J, Rodríguez-Jurado D, Katan J, Katan T and Jiménez-Díaz RM 2001. Comparative study of genetic diversity and pathogenicity among populations of *Verticillium dahliae* from cotton in Spain and Israel. European Journal of Plant Pathology 107:443-456.

Kowalska, B., 2021. Management of the soil-borne fungal pathogen–*Verticillium dahlia*e Kleb. causing vascular wilt diseases.Journal of Plant Pathology, 103, (4), 1185-1194.

Kubicek, C. P., Starr, T. L. & Glass, N. L. 2014. Plant cell wall-degrading enzymes and their secretion in plant-pathogenic fungi. Annual Review of Phytopathology, 52, 427–451.

Lahlali, R., Bajii, M., and Jijakli, M. H. 2007. Isolation and evaluation of bacteria and fungi as biological control agents against *Rhizoctonia solani*. Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences, 72, 973–982.

Leesutthiphonchai, W., Vu, A. L., Ah-Fong, A. M., & Judelson, H. S., 2018. How does *Phytophthora infestans* evade control efforts? Modern insight into the late blight disease. Phytopathology, 108, 8, 916-924.

Ligoxigakis, E.K., Markakis, E.A. 2012. Incidence and pathogenicity of races and isolates of *Verticillium dahliae* in Crete, southern Greece. Phytoparasitica 40:493-506.

Ligoxigakis E. K., Vakalounakis, D.J., and Thanassopoulos C. C., 2002. Weed hosts of *Verticillium dahliae* in Crete: susceptibility, Symptomatology and Significance. Phytoparasitica, 30, (5): 511-518

Livak K.J., Schmittgen T.D. 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. Methods, 25, 402-408.

Liu, T. L., Song, T. Q., Zhang, X., Yuan, H. B., Su, L. M., Li, W. L., Xu, J., Liu, S. H., Chen, L. L., Chen, T. Z., Zhang, M. X., Gu, L. C., Zhang, B. L. & Dou, D. L., 2014. Unconventionally secreted effectors of two filamentous pathogens target plant salicylate biosynthesis. Nature Communications, 5, 4686.

López-Moral, A., Agustí-Brisach, C., & Trapero, A. 2021. Plant biostimulants: New insights into the biological control of Verticillium wilt of olive. Frontiers in Plant Science, 12.

Lowe, A., Harrison, N., & French, A. P. 2017. Hyperspectral image analysis techniques for the detection and classification of the early onset of plant disease and stress. Plant methods, 13, (1), 80.

Malandrakis, A. A., Krasagakis, N., Kavroulakis, N., Ilias, A., Tsagkarakou, A., Vontas, J., & Markakis, E. 2022. Fungicide resistance frequencies of *Botrytis cinerea* greenhouse isolates and molecular detection of a novel SDHI resistance mutation. Pesticide Biochemistry and Physiology, 183, 105058.

Markakis, E. A., Fountoulakis, M. S., Daskalakis, G. C., Kokkinis, M., and Ligoxigakis, E. K., 2016. The suppressive effect of compost amendments on *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis cucumerinu*m in cucumber and *Verticillium dahliae* in eggplant. Crop Protection, 79, 70-79.

Markakis, E.A., Ligoxigakis, E.K., Avramidou, E.V., Tzanidakis, N. 2014. Survival, persistence and infection efficiency of *Verticillium dahliae* passed through the digestive system of sheep. Plant Disease 98:1235-1240.

Markakis, E. A., Tjamos, S. E., Chatzipavlidis, I., Antoniou, P. P., Paplomatas, E. J., 2008. Evaluation of compost amendments for control of vascular wilt diseases. Journal of Phytopathology, 156, 622-627.

Mazumdar, P., Singh, P., Kethiravan, D., Ramathani, I., & Ramakrishnan, N. 2021. Late blight in tomato: Insights into the pathogenesis of the aggressive pathogen *Phytophthora infestans* and future research priorities. Planta, 253*,* (6), 119.

Mbengue, M., Navaud, O., Peyraud, R., Barascud, M., Badet, T., Vincent, R., Barbacci, A., & Raffaele, S. 2016. Emerging trends in molecular interactions between plants and the broad host range fungal pathogens *Botrytis cinerea* and *Sclerotinia sclerotiorum*. Frontiers in plant science, 7, 422.

Murray, M. G., Thompson, W. F. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucleic Acids Research, 8,.4321-4326.

Nazar, R.N., Hu, X., Schmidt, J., & Culham, D. 1991. Potential use of PCR-amplified ribosomal intergenic sequences in the detection and differentiation of verticillium wilt pathogens. Physiological and Molecular Plant Pathology 39, 1-11.

Neubauer, C., Hüntemann, K., Heitmann, B., & Müller, C., 2015. Suppression of *Verticillium dahliae* by glucosinolate-containing seed meal amendments. European journal of plant pathology, 142, 239-249.

Neupane, Krishna, and Fulya Baysal-Gurel. 2021. "Automatic identification and monitoring of plant diseases using unmanned aerial vehicles: A review."Remote Sensing 13.19, 3841.

NV5 GEOSPATIAL, 2023. Διαθέσιμο Online: https://www.nv5geospatialsoftware.com/ Τελευταία Πρόσβαση 21.08.2023.

Ottmann, C., Luberacki, B., Küfner, I., Koch, W., Brunner, F., Weyand, M., Mattinen, L., Pirhonen, M., Anderluh, G., Seitz, H. U., Nurnberger, T., & Oecking, C. 2009. A common toxin fold mediates microbial attack and plant defense. Proceedings of the National Academy of Sciences, 106, (25), 10359-10364.

Pal, K. K., and McSpadden, G. B., 2006. Biological control of Plant Pathogens. The Plant Health Instructor, 1-25

Panstruga, R., & Dodds, P. N. 2009. Terrific protein traffic: the mystery of effector protein delivery by filamentous plant pathogens. Science, 324, (5928), 748-750.

Panthee, D. R., Pandey, A., & Paudel, R., 2024. Multiple Foliar Fungal Disease Management in Tomatoes: A Comprehensive Approach. International Journal of Plant Biology, 15, 1, 69-93.

Papaioannou, I. A., Ligoxigakis, E. K., Vakalounakis, D. J., Markakis, E. A., & Typas, M. A. 2013. Phytopathogenic, morphological, genetic and molecular characterization of a *Verticillium dahliae* population from Crete, Greece. European Journal of Plant Pathology, 136, 577-596.

Parab, C., Yadav, K. D., & Prajapati, V. 2023. Genomics and microbial dynamics in green waste composting: A mini review. Ecological Genetics and Genomics, 29, 100206.

Pawlikowska, E., James, S. A., Breierova, E., Antolak, H., & Kregiel, D. 2019. Biocontrol capability of local *Metschnikowia* sp. isolates. Antonie Van Leeuwenhoek, 112, 1425-1445.

Perfect, S. E., & Green, J. R., 2001. Infection structures of biotrophic and hemibiotrophic fungal plant pathogens. Molecular Plant Pathology, 2, 2, 101-108.

Plesken, C., Pattar, P., Reiss, B., Noor, Z.N., Zhang, L., Klug, K. Huettel, K., & Hahn, M., 2021. Genetic diversity of *Botrytis cinerea* revealed by multilocus sequencing, and identification of *B. cinerea* populations showing genetic isolation and distinct host adaptation. Frontiers in Plant Science, 12.

Popokova, K.V., 1972. Late Blight of Potato. Moscow. In: Tsedeke Abate (ed.). 1985. Review of Crop Production Research in Ethiopia. Proccedings of the First Ethiopian Crop Protection Symposium. Institute of Agricultural Research. Addis Ababa. Ethiopia

Poudel, A., Pandey, M., Shah, K., Acharya, B., & Shrestha, J. 2020. Evaluation of fungicides for management of late blight (*Phytophthora infestans*) of potato.

Raffaele, S., Win, J., Cano, L. M., and Kamoun, S., 2010. Analyses of genome architecture and gene expression reveal novel candidate virulence factors in the secretome of *Phytophthora infestans*. BMC Genomics, 11, 637.

Roca-Couso, R., Flores-Félix, J. D., & Rivas, R. 2021. Mechanisms of action of microbial biocontrol agents against *Botrytis cinerea*. Journal of Fungi, 7, (12), 1045.

Ryan, R. P., Germaine, K., Franks, A., Ryan, D. J., and Dowling, D. N. 2008. Bacterial endophytes: recent developments and applications. FEMS Microbiology Letters. 278, 1–9.

Sancho-Adamson, M., Trillas, M. I., Bort, J., Fernandez-Gallego, J. A., & Romanyà, J. 2019. Use of RGB vegetation indexes in assessing early effects of Verticillium wilt of olive in asymptomatic plants in high and low fertility scenarios. Remote Sensing, 11, (6), 607.

Santoyo, G., Moreno-Hagelsieb, G., del Carmen Orozco-Mosqueda, M., & Glick, B. R. 2016. Plant growth-promoting bacterial endophytes. Microbiological research, 183, 92-99.

Saunders, D. G., Breen, S., Win, J., Schornack, S., Hein, I., Bozkurt, T. O., Champouret, N., Vleeshouwers, V. A., Birch, P. R. J., Gilroy, E. M., & Kamoun, S. 2012. Host protein BSL1 associates with *Phytophthora infestans* RXLR effector AVR2 and the *Solanum demissum* immune receptor R2 to mediate disease resistance. The Plant Cell, 24, (8), 3420-3434.

Schnathorst, W. C., 1981. Life cycle and epidemiology of *Verticillium* Fungal wilt diseases of plant.

Shi, J. F., & Sun, C. Q. 2017. Isolation, identification, and biocontrol of antagonistic bacterium against *Botrytis cinerea* after tomato harvest. Brazilian journal of microbiology, *48*, 706-714.

Shlezinger, N., Minz, A., Gur, Y., Hatam, I., Dagdas, Y. F., Talbot, N. J., & Sharon, A. 2011. Anti-apoptotic machinery protects the necrotrophic fungus *Botrytis cinerea* from host-induced apoptotic-like cell death during plant infection. PLoS pathogens, 7, 8.

Short, D. P., Sandoya, G., Vallad, G. E., Koike, S. T., Xiao, C. L., Wu, B. M., Gurung, S., Hayes, R. J., & Subbarao, K. V., 2015. Dynamics of *Verticillium* species microsclerotia in field soils in response to fumigation, cropping patterns, and flooding. Phytopathology, 105, (5), 638-645.

Singh, R., Caseys, C., & Kliebenstein, D. J., 2024. Genetic and molecular landscapes of the generalist phytopathogen *Botrytis cinerea*. Molecular Plant Pathology, 25, 1.

Slama, H. B., Chenari Bouket, A., Alenezi, F. N., Luptakova, L., Baranov, O., Ahadi, R., & Belbahri, L. 2023. Impacts of Salt Stress on the Rhizosphere and Endophytic Bacterial Role in Plant Salt Alleviation. International Journal of Plant Biology, 14(2), 361-376.

Snelders, N. C., Rovenich, H., Petti, G. C., Rocafort, M., van den Berg, G. C. M., Vorholt, J. A., Mesters, J. R., Seidl, M. F., Nijland, R. & Thomma, B. P. H. J., 2020. Microbiome manipulation by a soil-borne fungal plant pathogen using effector proteins. Nature Plants, 6, 1365–1374.

Song, J, Win, J., Tian, M., Schornack, S., Kaschani, F., Ilyas, M., Van der Hoorn, R.A.L., Kamoun, S. 2009. Apoplastic effectors secreted by two unrelated eukaryotic plant pathogens target the tomato defense protease Rcr3. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA106, 1654–1659.

Song, T. Q., Ma, Z. C., Shen, D. Y., Li, Q., Li, W. L., Su, L. M., Ye, T. Y., Zhang, M. X., Wang, Y. C., and Dou, D. L., 2015. An oomycete CRN effector reprograms expression of plant HSP genes by targeting their promoters. PLoS Pathogens 11.

Szymańska, S., Lis, M. I., Piernik, A., & Hrynkiewicz, K. 2022. *Pseudomonas stutzeri* and *kushneria marisflavi* alleviate salinity stress-associated damages in barley, lettuce, and sunflower. Frontiers in Microbiology, 13, 788893.

Thomashow, L. S., Bonsall, R. E., and Weller, D. M. 1997. “Antibiotic production by soil and rhizosphere microbes in situ,” in Manual of Environmental Microbiology, eds C. J. Hurst, G. R. Knudsen, M. J. McInerney, L. D. Stetzenbach, and M. V. Walter (Washington, DC: ASM Press), 493–499.

Tian, L., Huang, C. M., Zhang, D. D., Li, R., Chen, J. Y., Sun, W. X., Qiu, N. W., & Dai, X. F., 2021. Extracellular superoxide dismutase VdSOD5 is required for virulence in *Verticillium dahliae*. Journal of Integrative Agriculture, 20, 1858–1870.

Tian, M., Huitema, E., Da Cunha, L., Torto-Alalibo, T., & Kamoun, S. 2004. A Kazal-like extracellular serine protease inhibitor from *Phytophthora infestans* targets the tomato pathogenesis-related protease P69B. Journal of Biological Chemistry, 279*,* (25), 26370-26377.

Tian, Y., Che, Z., Sun, D., Yang, Y., Lin, X., Liu, S., 2019. Resistance identification of tree peony cultivars of different flowering time to gray mold pathogen *Botrytis cinerea*. HortScience. 54:328–330.

Tsedaley, B., 2014. Late blight of potato (*Phytophthora infestans*) biology, economic importance and its management approaches. Journal of Biology, Agriculture and Healthcare, 4, (25), 215-225.

Türkel, S., Korukluoğlu, M., & Yavuz, M. 2014. Biocontrol activity of the local strain of *Metschnikowia pulcherr*ima on different postharvest pathogens. Biotechnology research international.

Valero-Jiménez, C. A., Veloso, J., Staats, M., & van Kan, J. A., 2019. Comparative genomics of plant pathogenic *Botrytis* species with distinct host specificity. BMC genomics, 20(1), 1-12.

Veloso, J. & van Kan, J.A.L. 2018. Many shades of grey in *Botrytis*–host plant interactions. Trends in Plant Science, 23, 613–622.

Wan, L., Li, H., Li, C., Wang, A., Yang, Y., & Wang, P. 2022. Hyperspectral sensing of plant diseases: Principle and methods. Agronomy, 12, (6), 1451.

Wang, D., Chen, J. Y., Song, J., Li, J. J., Klosterman, S. J., Li, R., Kong, Z. Q., Subbarao, K. V., Dai, X. F., & Zhang, D. D., 2021. Novel cytotoxic function of xylanase VdXyn4 in the plant vascular wilt pathogen *Verticillium dahliae*. Plant Physiology, 187, 409–429.

Wang, M., Weiberg, A., Dellota Jr, E., Yamane, D., & Jin, H. 2017. Botrytis small RNA Bc-siR37 suppresses plant defense genes by cross-kingdom RNAi. RNA biology, 14, (4), 421-428.

Williamson, B., Tudzynski, B., Tudzynski, P. & Van Kan, J.A.L. 2007. *Botrytis*

cinerea: the cause of grey mould disease. Molecular Plant Pathology, 8, 561–580.

Yadeta, K. A., & Thomma, B. P. H. J., 2013. The xylem as battleground for plant hosts and vascular wilt pathogens. Frontiers in Plant Science, 4, 97.

Zhang, D. D., Dai, X. F., Klosterman, S. J., Subbarao, K. V., & Chen, J. Y., 2022. The secretome of *Verticillium dahliae* in collusion with plant defence responses modulates Verticillium wilt symptoms. Biological Reviews, 97(5), 1810-1822.

Zhao, P., Zhao, Y. L., Jin, Y., Zhang, T. & Guo, H. S. 2014.Colonization process of *Arabidopsis thaliana* roots by a green fluorescent protein-tagged isolate of *Verticillium dahliae*. Protein & Cell, 5, 94–98.

Βακαλουνάκης, Ι. Δ., 2010. Ασθένειες της Τομάτας Διάγνωση και Αντιμετώπιση

Παναγόπουλος, Χ. Γ., 2000. Ασθένειες Κηπευτικών Καλλιεργειών. Εκδόσεις Σταμούλης, Αθήνα σελ. 15-24, 76-87.

Τζάμος, Ε. Κ., 2004. Φυτοπαθολογία. Εκδόσεις Σταμούλης, Αθήνα σελ. 240-241.

Φουντάς, Σ., και Γεμτός. Θ., 2015. Γεωργία Ακριβείας. Σύνδεσμος Ελληνικών Ακαδημαϊκών Βιβλιοθηκών, Αθήνα, σελ.132-137.