



**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΙΚΗΣ & ΓΕΩΡΓΙΚΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**

Διδακτορική Διατριβή

Ενδοφυτικοί μικροοργανισμοί των αρωματικών φυτών *Teucrium polium*
και *Hypericum hircinum* που προάγουν την ανάπτυξη των φυτών

Ειρήνη-Ευαγγελία Κ. Θωμλούδη

Επιβλέπων καθηγητής:

Παναγιώτης Κατινάκης, Ομότιμος Καθηγητής ΓΠΑ

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:

Παναγιώτης Κατινάκης, Ομότιμος Καθηγητής ΓΠΑ

Δημήτριος Μπουράνης, Καθηγητής ΓΠΑ

Ιορδάνης Χατζηπαυλίδης, Καθηγητής ΓΠΑ

ΑΘΗΝΑ
2022



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΙΚΗΣ & ΓΕΩΡΓΙΚΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

Διδακτορική Διατριβή

Ενδοφυτικοί μικροοργανισμοί των αρωματικών φυτών *Teucrium polium* και *Hypericum hircinum* που προάγουν την ανάπτυξη των φυτών

“Endophytic microorganisms of the aromatic plants *Teucrium polium* and *Hypericum hircinum* that promote plant growth”

Ειρήνη-Ευαγγελία Κ. Θωμλούδη

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή:

Δημήτριος Μπουράνης, Καθηγητής Γ.Π.Α

Ιορδάνης Χατζηπαυλίδης, Καθηγητής Γ.Π.Α

Γεώργιος Ζερβάκης, Καθηγητής Γ.Π.Α

Επαμεινώνδας Παπλωματάς, Καθηγητής Γ.Π.Α

Δημήτριος Τσιτσιγιάννης, Καθηγητής Γ.Π.Α

Σωτήριος Τζάμος, Αναπληρωτής Καθηγητής Γ.Π.Α

Κωνσταντίνος Δελής, Αναπληρωτής Καθηγητής ΠΑ.ΠΕΛ.

Ενδοφυτικοί μικροοργανισμοί των αρωματικών φυτών *Teucrium polium* και *Hypericum hircinum* που προάγουν την ανάπτυξη των φυτών

Τμήμα Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής

Εργαστήριο Γενικής & Γεωργικής Μικροβιολογίας

Περίληψη

Η αύξηση του πληθυσμού της γης και η επακόλουθη αύξηση στη ζήτηση τροφίμων, σε συνδυασμό με την απώλεια γεωργικών εδαφών και τη μείωση απόδοσης της παραγωγής λόγω της κλιματικής αλλαγής, έχουν οδηγήσει στην εκτεταμένη χρήση χημικών λιπασμάτων και φυτοπροστατευτικών προϊόντων. Οι δυσμενείς επιδράσεις της υπερχρήσης αγροχημικών στην υγεία του ανθρώπου και του περιβάλλοντος δημιούργησαν την ανάγκη για την ανάπτυξη μεθόδων για την αύξηση της απόδοσης και τη μείωση των απωλειών των καλλιεργειών, με ταυτόχρονη μείωση των χημικών εισροών. Μία πολλά υποσχόμενη λύση για την αύξηση της απόδοσης και τη μείωση των απωλειών είναι η χρήση περιβαλλοντικά φιλικών και ταυτόχρονα αποτελεσματικών μεθόδων, όπως είναι η εφαρμογή μικροοργανισμών που προωθούν την ανάπτυξη των φυτών, με τα ενδοφυτικά βακτηριακά στελέχη να προσελκύουν όλο και περισσότερο ενδιαφέρον. Η συγκεκριμένη εργασία αφορά τη διερεύνηση των ικανοτήτων των ενδοφυτικών βακτηρίων που απομονώθηκαν από τη ρίζα και τα φύλλα των αρωματικών φυτών *Teucrium polium* και *Hypericum hircinum* με σκοπό την εύρεση στελεχών υποσχόμενων για χρήση ως εμβόλια στη γεωργική πρακτική, καθώς και τη διερεύνηση της αύξησης της αποτελεσματικότητάς τους ως μίγματα ανά ζεύγη. Στο πρώτο στάδιο της μελέτης πραγματοποιήθηκε η ομαδοποίηση 37 βακτηριακών απομονώσεων βάσει της μορφολογίας των μοναδιαίων αποικιών τους και την προκαταρκτική 16S rDNA φυλογενετική ταξινόμηση. Η επιλογή αντιπροσωπευτικών στελεχών με πιθανή διαφορετική δράση βασίστηκε σε *in vitro* δοκιμές α) προώθησης της ανάπτυξης των φυτών, όπως η διαλυτοποίηση ιζηματοποιημένου φωσφόρου, η παραγωγή ρυθμιστών της ανάπτυξης των φυτών και η έκκριση λυτικών ενζύμων, β) περιβαλλοντικής προσαρμογής, όπως η αντοχή σε ακραίες θερμοκρασίες, γ) διερεύνησης πιθανής παθογόνου δράσης σε φυτά *Arabidopsis thaliana* Col-0 και δ) αλληλεπίδρασης των βακτηριακών στελεχών μεταξύ τους. Από αυτά επιλέχθηκαν 19 αντιπροσωπευτικά στελέχη, τα οποία υποβλήθηκαν στη συνέχεια σε *in vitro* δοκιμές που αφορούσαν την ικανότητα ταχείας ομαδικής κίνησης σε επιφάνειες (swarming), κολυμβητικής κίνησης (swimming), σχηματισμού βιοϋμενίου (biofilm), καθώς και παρεμπόδισης φυτοπαθογόνων μυκήτων σημαντικών για τη γεωργία. Ακόμη, εξετάστηκε η επίδρασή τους στην ανάπτυξη του φυτού *A. thaliana* Col-0 *in vitro*, μετά τον εμβολιασμό τους σε επαφή με το ακρορρίζιο, σε απόσταση από αυτό και μέσω πτητικών ενώσεων. Κριτήριο επιλογής αποτέλεσε η αύξηση των πλευρικών ριζών και ριζικών τριχιδίων. Ακολούθησε η εξέταση της επίδρασής τους στη βλαστικότητα και την ανάπτυξη φυτών τομάτας *in vitro* μετά από βιοδιέγερση (biopriming) του σπόρου. Ο συνδυασμός των αποτελεσμάτων των *in vitro* δοκιμών οδήγησε στην επιλογή των στελεχών Hil4 (*Bacillus halotolerans*), Hir139 (*Bacillus velezensis*), Tel34 (*Bacillus safensis*), Tel52 (*Bacillus velezensis*) και Ter90 (*Bacillus subtilis*), τα οποία συγκέντρωσαν τα περισσότερα επιθυμητά

χαρακτηριστικά. Διαπιστώθηκε ότι τα στελέχη Hil4, Hir139, Tel52 και Ter90 εκκρίνουν βιοεπιφανειοδραστικές ενώσεις με αντιμυκητολογική δράση σε υγρή καλλιέργεια, ενώ σχηματίστηκε ζώνη παρεμπόδισης εναντίον φυτοπαθογόνων μυκήτων κατά τη διπλή καλλιέργεια τους *in vitro*. Για την μελέτη και ανίχνευση των εκκρινόμενων και διαχεόμενων μεταβολιτών, πραγματοποιήθηκε η εκχύλισή τους από τη ζώνη παρεμπόδισης που δημιουργήθηκε εναντίον του μύκητα *Botrytis cinerea* σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα και από ζώνη παρόμοιου μεγέθους αξενικής βακτηριακής καλλιέργειας. Τα εκχυλίσματα των Hil4, Hir139, Tel52, Ter90 ήταν βιοδραστικά έναντι του *B. cinerea* σε διπλή καλλιέργεια και διαπιστώθηκε πως οι αντιμυκητιακοί μεταβολίτες παράγονται ιδιосуστατικά. Μετά από αλληλούχιση ολικού γονιδιώματος, τα στελέχη ταυτοποιήθηκαν σε επίπεδο είδους και διερευνήθηκε η παρουσία συστάδων γονιδίων που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση αντιμικροβιακών δευτερογενών μεταβολιτών, που ανταγωνίζονται άμεσα τα φυτοπαθογόνα ή λειτουργούν ως διεγέρτες της άμυνας των φυτών. Σε όλα τα στελέχη βρέθηκε η συστάδα βιοσύνθεσης ενώσεων της οικογένειας των κυκλικών λιποπεπτιδίων Surfactins, της σιδηροφόρου ένωσης Bacillibactin και της ένωσης Bacilysin. Στα γονιδιώματα των στελεχών Hil4, Hir139, Tel52 και Ter90 εντοπίστηκε η συστάδα βιοσυνθετικών γονιδίων της ένωσης Bacillaene, καθώς και η συστάδα βιοσύνθεσης ενώσεων της οικογένειας των κυκλικών λιποπεπτιδίων Fengycins. Στα γονιδιώματα των στελεχών Hil4 και Ter90 εντοπίστηκε η συστάδα βιοσύνθεσης της Subtilosin, ενώ οι συστάδες βιοσυνθετικών γονιδίων των ενώσεων Difficidin, Macrolactin H και Amylocyclicin εντοπίστηκαν μόνο στα γονιδιώματα των στελεχών Hir139 και Tel52. Η συστάδα βιοσύνθεσης της ένωσης Plantazolicin εντοπίστηκε στο γονιδίωμα του στελέχους Hir139, ενώ της ένωσης Mersacidin εντοπίστηκε στο γονιδίωμα του στελέχους Tel52. Το γονιδίωμα του στελέχους Tel34 περιέχει τη συστάδα βιοσύνθεσης της ένωσης Safencin. Τέλος, εντοπίστηκε συστάδα για τη βιοσύνθεση κυκλικών λιποπεπτιδίων της οικογένειας Iturins στα στελέχη Hil4 (Mojavensin), Hir139 και Tel52 (Bacillomycin D). Επίσης, στα γονιδιώματα των στελεχών διαπιστώθηκε η παρουσία πληθώρας γονιδίων που εμπλέκονται στον αποικισμό, την προώθηση της ανάπτυξης των φυτών και τη βιολογική αντιμετώπιση φυτοπαθογόνων μικροοργανισμών, όπως εκείνα που κωδικοποιούν λυτικά ένζυμα. Ανάλυση UHPLC-HRMS του εκχυλίσματος των εκκρινόμενων και διαχεόμενων μεταβολιτών κατά την αξενική καλλιέργεια σε στερεό υπόστρωμα των Hil4 και Hir139 έδειξε την πιθανή παρουσία των ενώσεων Surfactin A (C13-C15), Fengycin A (C16), Bacillaene, Bacilysin, Dihydroanticapsin (ενεργό μέρος της Bacilysin) αλλά και Azelaic Acid. Ακόμη, ανιχνεύθηκε η ένωση Bacillomycin D (C13-C17) και Oxydifficidin ως εκκρινόμενη από το στέλεχος Hir139, ενώ ανιχνεύθηκε η ένωση Mojavensin ως εκκρινόμενη από το στέλεχος Hil4. Τα επιλεγμένα στελέχη χρησιμοποιήθηκαν για τη δημιουργία μιγμάτων (ανά ζεύγη) μετά από δοκιμές *in vitro* συμβατότητας, συνδυάζοντας στελέχη με διαφορετικά χαρακτηριστικά και περιλαμβάνοντας *in vitro* συμβατά και μη συμβατά μίγματα. Συγκεκριμένα, τα μίγματα που δοκιμάστηκαν ήταν τα Hil4-Tel52, Tel34-Ter90 και Tel34-Hir139. Στη δοκιμή προώθησης της ανάπτυξης φυτών τομάτας σε συνθήκες θερμοκηπίου, το στέλεχος Ter90 είχε τη μεγαλύτερη επίδραση στο νωπό βάρος υπόγειου τμήματος, το ύψος, καθώς και το νωπό και ξηρό βάρος του υπέργειου τμήματος σε σύγκριση με όλες τις μεταχειρίσεις και το μάρτυρα. Τα υπόλοιπα

στελέχη έδειξαν να προωθούν την ανάπτυξη των φυτών μόνο σε συνθήκες *in vitro* και όχι στο θερμοκήπιο. Η μεταχείριση του μίγματος H14-Tel52 εμφάνισε σε κάποια χαρακτηριστικά υψηλότερες τιμές από εκείνες των μεμονωμένων, γεγονός που ίσως οφείλεται στην αύξηση του πληθυσμού τους στη ριζόσφαιρα, αλλά σε σύγκριση με του μάρτυρα υπερίσχυε μόνο στο ύψος και το ξηρό βάρος υπέργειου τμήματος του φυτού. Δοκιμή των στελεχών σε αποκομμένους καρπούς ελιάς εναντίον του φυτοπαθογόνου μύκητα *Colletotrichum acutatum*, έδειξε ότι οι μεταχειρίσεις Ter90 και H139 παρουσίασαν περίπου 45% και 57% μείωση του δείκτη σοβαρότητας της ασθένειας σε σχέση με τη μεταχείριση του μάρτυρα, αντίστοιχα, ενώ 33% και 60% μείωση της έντασης της ασθένειας, αντίστοιχα. Επίσης, η εφαρμογή όλων των στελεχών μείωσε τη σοβαρότητα της τεφράς σήψης σε καρπούς αμπέλου και μικρόκαρπες τομάτες, με πιο αποτελεσματικό το στέλεχος H139, το οποίο μείωσε τη σοβαρότητα της ασθένειας περίπου 52.5% και 47% στους δύο καρπούς αντίστοιχα. Το μίγμα H14-Tel52 μείωσε σημαντικά τη σοβαρότητα της ασθένειας στα τοματίνια σε σύγκριση με τα μεμονωμένα στελέχη, ωστόσο δεν είχε διαφορά από το H139. Στη δοκιμή αντιμετώπισης του *B. cinerea* στα φύλλα μέσω επαγωγής της διασυστηματικής ανοχής φυτών τομάτας μετά από εμβολιασμό των στελεχών στη ριζόσφαιρα, το στέλεχος H139 αναδείχθηκε το αποτελεσματικότερο με περίπου 75% μείωση της έκτασης νεκρωτικής κηλίδας, ακολουθούμενο από τα Ter90 και Tel52 με περίπου 71% και 67% μείωση, αντίστοιχα. Επίσης, κάποιες από τις μεταχειρίσεις έδειξαν αυξημένα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *erf1* και *aco1* 24 ώρες μετά το πρώτο ριζοπότισμα με βακτήρια σε σύγκριση με τη μεταχείριση του μάρτυρα. Τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής ανέδειξαν δύο υποσχόμενα στελέχη, τα H139 και Ter90, με εξαιρετικά αποτελέσματα στην προώθηση της ανάπτυξης των φυτών και τη βιολογική αντιμετώπιση φυτοπαθογόνων μυκήτων. Όσον αφορά τα μίγματα που εξετάστηκαν, στις περισσότερες περιπτώσεις είχαν είτε αντίστοιχη δράση με το αποτελεσματικότερο στέλεχος του μίγματος, είτε μειωμένη δράση στην περίπτωση που ο πληθυσμός του υπέστη μείωση όταν εφαρμόστηκε σε μίγμα σε σχέση με την εφαρμογή ως μεμονωμένο στέλεχος, πιθανώς λόγω ανταγωνισμού. Ακόμη, οι *in vitro* δοκιμές συμβατότητας δεν αντικατόπτριζαν πάντα τη συμβατότητα *in planta* σε όλα τα συστήματα. Συμπερασματικά, η εργασία αυτή αποτελεί μια ενδεδειγμένη μελέτη της αποτελεσματικότητας ενδοφυτικών βακτηριακών στελεχών ως βιοδιεγέρτες της ανάπτυξης των φυτών και ως παράγοντες βιολογικής αντιμετώπισης φυτοπαθογόνων μυκήτων, καθώς και έναν οδηγό για την αξιολόγηση υποσχόμενων βακτηριακών στελεχών. Επιπρόσθετα, εμβαθύνει στην κατανόηση της αλληλεπίδρασης των βακτηριακών στελεχών μεταξύ τους με σκοπό τη δημιουργία αποτελεσματικών μιγμάτων.

Επιστημονική Περιοχή: Γεωργική Μικροβιολογία

Λέξεις κλειδιά: ενδοφυτικά βακτήρια, προώθηση της ανάπτυξης των φυτών, βιολογική αντιμετώπιση, αρωματικό φυτό, *Bacillus*, *Botrytis cinerea*, διασυστηματική ανοχή, μετασυλλεκτική ασθένεια, εξόρυξη γονιδιώματος, συστάδες βιοσυνθετικών γονιδίων, δευτερογενείς μεταβολίτες, UHPLC-HRMS, τομάτα, σταφύλι, μίγματα βακτηρίων

Endophytic microorganisms of the aromatic plants *Teucrium polium* and *Hypericum hircinum* that promote plant growth

Department of Crop Science

Laboratory of General & Agricultural Microbiology

Abstract

The world population rise and the subsequent increase in food demand combined with agricultural land loss and decrease of crop production due to climate change have led to the extended use of chemical fertilizers and plant protection products. The adverse effects of agrochemical overuse on environmental and human health have created the need for development of methods to achieve increase of crop yield and decrease of losses with simultaneous minimization of chemical inputs. A very promising solution is the use of plant growth promoting bacteria, including culturable endophytes which attract increasing interest over the last years. This study concerns the screening of endophytic bacteria isolated from the root and leaves of aromatic plants *Teucrium polium* και *Hypericum hircinum* with the aim of finding promising strains for use in agricultural practice, as well as investigating the possible efficacy enhancement when applied as pairs. During the first stage, 37 endophytic bacterial isolates were grouped based on colony morphology and a preliminary 16S rDNA phylogenetic analysis. The selection of representative isolates was carried out by *in vitro* assays regarding: a) plant growth promotion traits, such as phosphate solubilization, production of plant growth regulators and lytic enzyme secretion, b) environmental fitting, such as resistance in extreme temperature, c) potential pathogenic effect on *Arabidopsis thaliana* Col-0 and d) interaction among the bacterial strains. The selected 19 representative strains were further subjected to *in vitro* tests concerning the ability of fast swarming motility, swimming motility, biofilm formation, as well as inhibition of agricultural importance phytopathogenic fungi during dual culture. Also, their effect on growth and development of *A. thaliana* Col-0 was examined *in vitro* through inoculation on the root tip or at distance from the root tip as well as through volatile emission. The determinant selection factor was the increase of lateral roots and root hairs. Bacterial strains were further examined regarding their effect on the germination and growth of *Solanum lycopersicum* var. Chondrokatsari Messinias *in vitro* after seed biopriming. The combination of *in vitro* results led to the selection of strains Hil4 (*Bacillus halotolerans*), Hir139 (*Bacillus velezensis*), Tel34 (*Bacillus safensis*), Tel52 (*Bacillus velezensis*) and Ter90 (*Bacillus subtilis*), as the ones that gathered most of the desirable traits. Strains Hil4, Hir139, Tel52 and Ter90 seemed to secrete biosurfactants with antifungal activity in the liquid culture medium, while an inhibition zone was formed during their dual culture with phytopathogenic fungi on solid growth medium. In order to study and detect the secreted and diffusible secondary metabolites during solid culture, their extraction was performed from the growth medium residing at the inhibition zone against *Botrytis cinerea* and from a zone of equal size during single bacterial culture. Extracts of Hil4, Hir139, Tel52, Ter90 were bioactive against *B. cinerea* on dual culture, while the production of metabolites seemed to be constitutive. After whole genome sequencing, the selected strains were

identified in species level and a search for gene clusters involved in secondary metabolite production with direct antifungal or plant defence elicitor action was carried out. The biosynthetic gene clusters (BGCs) of siderophore Bacillibactin, Bacilysin and cyclic lipopeptide family Surfactin were found in the genomes of all strains. The genome of strains Hil4, Hir139, Tel52 και Ter90 harbored the BGCs of Bacillaene and the cyclic lipopeptide family Fengycins. The BGC of Subtilosin was predicted only in the genomes of Hil4 and Ter90, while BGCs of Difficidin, Macrolactin H and Amylocyclicin were only found in the genomes of Hir139 and Tel52. Plantazolicin BGC was only found in the genome of Hir139, while Mersacidin BGC was only found in the genome of Tel52. Strain Tel34 harbored the BGC of Safencin. The presence of iturinic lipopeptides was predicted in the genomes of Hil4 (Mojavensin), Hir139 and Tel52 (Bacillomycin D). Furthermore, the genomes of all selected strains harbored genes involved in colonization, plant growth promotion and biological control were found, such as those that encode lytic enzymes. Finally, UHPLC-HRMS analysis of the extract containing secreted and agar diffusible metabolites of single Hil4 and Hir139 bacterial culture led to the putative annotation of Surfactin A (C13-C15), Fengycin A (C16), Bacillaene, Bacilysin, Dihydroanticapsin (active part of Bacilysin), as well as Azelaic Acid. Additionally, Bacillomycin D (C13-C17) and Oxydifficidin were putatively annotated as secreted by Hir139, while Mojavensin was putatively annotated as secreted by Hil4. The selected strains were paired for the development of mixtures after assays regarding their *in vitro* compatibility, by combining strains with different abilities and including *in vitro* compatible and incompatible pairs. Specifically, the mixtures tested were Hil4-Tel52, Tel34-Ter90 and Tel34-Hir139. As far as the assay of tomato growth promotion under greenhouse conditions is concerned, strain Ter90 had the biggest impact on root fresh weight, plant height as well as fresh and dry weight of shoot compared to all treatments and the control. The rest of the strains seemed to promote plant growth *in vitro* but not in the greenhouse. The Hil4-Tel52 treatment showed better performance in some plant characteristics than the individual strains, which may be linked to the increase of their rhizosphere population when applied as a mixture, however it only showed increase in height and shoot dry weight compared to the control. Testing of individual strains on detached olives against the phytopathogenic fungus *Colletotrichum acutatum* highlighted the treatments Hir139 and Ter90, which presented approximately 57% and 45% reduction in disease severity, respectively, compared to the control, while 60% and 33% reduction of disease incidence, respectively. Also, all strains managed to reduce severity of gray mold on grape fruit and cherry tomatoes, where strain Hir139 was the most effective, achieving reduction of approximately 52.5% and 47%, respectively. Mixture Hil4-Tel52 reduced severity with statistically significant difference from individual strains in cherry tomatoes, but not from Hir139. In the assay of biological control against *B. cinerea* in leaves through induction of tomato systemic resistance after bacterial root inoculation, strain Hir139 was the most effective achieving approximately 75% reduction in size of leaf necrotic lesions, followed by Ter90 and Tel52 achieving 71% and 67% of reduction, respectively. Also, some of the treatments showed increased expression levels of *erf1* and *aco1* at 24 hours post bacterial root inoculation compared to the control. In this study, two promising bacterial strains were showcased regarding their

plant growth promoting and biological control abilities, Hir139 and Ter90. As far as the mixtures tested were concerned, in most cases they showed either the same efficacy as the most effective individual strain, or reduced efficacy, when the population of the most effective strain was reduced when applied in a mixture possibly due to antagonism. Also, *in vitro* compatibility did not always reflect *in planta* compatibility in all systems. In conclusion, this is a thorough study of the efficacy of endophytic bacterial strains as plant growth promoters and biological control agents, while it also constitutes a guide for the evaluation of promising bacterial strains. In addition, this study is an important step towards understanding bacterial interaction with the purpose of developing successful mixtures.

Scientific Area: Agricultural Microbiology

Keywords: endophytic bacteria, plant growth promotion, biological control, aromatic plant, *Bacillus*, *Botrytis cinerea*, systemic resistance, post harvest disease, genome mining, biosynthetic gene clusters, secondary metabolites, UHPLC-HRMS, tomato, grape, bacterial mixtures

Δήλωση Έργου

«Η έγκριση της Διδακτορικής Διατριβής από το Τμήμα Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής της Σχολής Αγροτικής Παραγωγής Υποδομών και Περιβάλλοντος του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών δεν υποδηλώνει την αποδοχή των γνώμων του συγγραφέως» (ν. 5343/1932, άρθρο 202, παρ. 2).

Με την άδεια μου, η παρούσα εργασία ελέγχθηκε από την Εξεταστική Επιτροπή μέσα από λογισμικό ανίχνευσης λογοκλοπής που διαθέτει το ΓΠΑ και διασταυρώθηκε η εγκυρότητα και η πρωτοτυπία της.

Το έργο συγχρηματοδοτείται από την Ελλάδα και την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο) μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού, Εκπαίδευση και Διά Βίου Μάθηση», στο πλαίσιο της Πράξης «Ενίσχυση του ανθρώπινου ερευνητικού δυναμικού μέσω της υλοποίησης διδακτορικής έρευνας» (MIS-5000432-2^{ος} κύκλος), που υλοποιεί το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών (ΙΚΥ).



Πίνακας Περιεχομένων

Ευχαριστίες.....	14
Παρουσιάσεις σε συνέδρια-Δημοσιεύσεις	16
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	17
1.1 Προκλήσεις της σύγχρονης γεωργίας	17
1.2 Βιοδιεγέρτες (Biostimulants, BS) και Παράγοντες βιολογικής αντιμετώπισης φυτοπαθογόνων (Biological Control Agents, BCAs).....	19
1.3 Μικροοργανισμοί που σχετίζονται με τα φυτά.....	23
1.3.1 Κατηγορίες μικροοργανισμών	23
1.3.2 Μικροοργανισμοί που προωθούν την ανάπτυξη των φυτών.....	26
1.4 Άμεσοι μηχανισμοί προώθησης της ανάπτυξης των φυτών	30
1.4.1 Φυτοδιέγερση (Phyostimulation)	31
1.4.2 Βιολίπανση (Biofertilization).....	32
1.5 Έμμεσοι μηχανισμοί προώθησης της ανάπτυξης των φυτών-Βιολογική αντιμετώπιση παθογόνων	35
1.5.1 Ανταγωνισμός για θέση και θρεπτικά.....	35
1.5.2 Παραγωγή λυτικών ενζύμων.....	37
1.5.3 Παραγωγή διαχεόμενων αντιμικροβιακών ενώσεων	38
1.5.4 Επαγωγή της φυτικής άμυνας	47
1.6 Ενδοφυτικοί μικροοργανισμοί	50
1.7 Έρευνα βακτηριακών στελεχών για χρήση στη γεωργική πρακτική.....	54
1.8 Ο φυτοπαθογόνος μύκητας <i>Botrytis cinerea</i>.....	56
1.9 Ενδοφυτικοί μικροοργανισμοί απομονωμένοι από φαρμακευτικά φυτά	58
1.9.1 Το φυτό <i>Hypericum hircinum</i>	59
1.9.2 Το φυτό <i>Teucrium polium</i>	59
2. ΣΚΟΠΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ.....	60
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	61
3.1 Θρεπτικά μέσα ανάπτυξης μικροοργανισμών και φυτών	61
3.2 Ενδοφυτικά βακτηριακά στελέχη.....	61
3.2.1 Προέλευση.....	61
3.2.2 Συντήρηση-Καλλιέργεια.....	62
3.2.3 Δημιουργία εμβολίου.....	62
3.2.4 Προσδιορισμός συγκέντρωσης ζωντανών κυττάρων (Colony Forming Units, CFU).....	63
3.3 Φυτοπαθογόνοι μύκητες	63
3.3.1 Συντήρηση των μυκήτων.....	63
3.3.2 Δημιουργία εμβολίου μόλυνσης.....	64
3.4 Φυλογενετική ταξινόμηση ενδοφυτικών βακτηρίων.....	64
3.5 Αλληλεπιδράσεις βακτηριακών στελεχών	65

3.5.1	Δοκιμή σχηματισμού γραμμής οριοθέτησης κατά την ομαδική κίνηση σε επιφάνειες (Swarm boundary assay)	65
3.5.2	Μέθοδος υπερκείμενης έγχυσης άγαρ (Soft agar overlay assay)	66
3.6	Δοκιμές για χαρακτηριστικά προώθησης ανάπτυξης των φυτών <i>in vitro</i>	66
3.6.1	Διαλυτοποίηση φωσφόρου.....	66
3.6.2	Παραγωγή σιδηροφόρων μορίων	67
3.6.3	Παραγωγή κυτταρινολυτικών ενζύμων	67
3.6.4	Παραγωγή πρωτεολυτικών ενζύμων	68
3.6.5	Παραγωγή χιτινολυτικών ενζύμων.....	69
3.6.6	Παραγωγή ουρεασών.....	69
3.6.7	Παραγωγή σουλφατασών	70
3.6.8	Παραγωγή ενώσεων που περιέχουν ινδόλιο (indole-related compounds).....	70
3.6.9	Παραγωγή αμμωνίας	71
3.6.10	Παραγωγή ακετοΐνης.....	71
3.6.11	Ταχεία ανίχνευση επιφανειοδραστικών ενώσεων με τη μέθοδο της κατάρρευσης της σταγόνας (Drop collapse assay)	72
3.7	Δοκιμές περιβαλλοντικής προσαρμογής των βακτηριακών στελεχών	72
3.7.1	Ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά	72
3.7.2	Ανάπτυξη σε εύρος συγκεντρώσεων αλατότητας.....	73
3.7.3	Ανάπτυξη σε ακραίες θερμοκρασίες	73
3.7.4	Ανάπτυξη σε εύρος τιμών pH	74
3.8	Διερεύνηση κίνησης των βακτηρίων	74
3.8.1	Ομαδική κίνηση σε επιφάνειες (Swarming motility).....	74
3.8.2	Κολυμβητική κίνηση (Swimming motility)	75
3.8.3	Κινητικότητα στο έδαφος	75
3.9	Σχηματισμός βιοϋμενίου (Biofilm formation)	75
3.10	Παρεμπόδιση της ανάπτυξης φυτοπαθογόνων μυκήτων	76
3.10.1	Διπλή καλλιέργεια (Dual Culture) βακτηριακών κυττάρων και μύκητα.....	76
3.10.2	Διπλή καλλιέργεια (Dual Culture) υπερκείμενου βακτηριακής καλλιέργειας και μύκητα.....	76
3.10.3	Μικροσκοπική παρατήρηση του μυκηλίου	77
3.11	Επίδραση στο φυτό μοντέλο <i>Arabidopsis thaliana</i> Col-0 <i>in vitro</i>	77
3.11.1	Απολύμανση σπόρων και συγχρονισμός βλαστικότητας.....	77
3.11.2	Επιλογή αντιπροσωπευτικών βακτηριακών στελεχών.....	78
3.11.3	Επιλογή των καταλληλότερων βακτηριακών στελεχών	78
3.11.4	Εμβολιασμός μιγμάτων βακτηριακών στελεχών σε απόσταση από το ακρορρίζιο.....	80
3.12	Δημιουργία βακτηριακών μεταλλαγμάτων με ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά	82
3.13	Διερεύνηση συμβατότητας μιγμάτων βακτηριακών στελεχών στις ρίζες φυτών <i>Arabidopsis thaliana</i> Col-0 <i>in vitro</i>	82
3.14	Μικροσκοπική παρατήρηση αποικισμού βακτηρίων σε ρίζα <i>A.thaliana</i> Col-0	83
3.15	Απομόνωση και ανάλυση μεταβολιτών των βακτηρίων από στερεό θρεπτικό μέσο εναντίον του <i>B. cinerea</i>	84

3.15.1	Απομόνωση ακατέργαστου εκχυλίσματος από το μέτωπο αλληλεπίδρασης βακτηρίων και <i>B.cinerea</i> σε διπλή καλλιέργεια.....	84
3.15.2	Διερεύνηση της βιοδραστικότητας του απομονωμένου ακατέργαστου εκχυλίσματος.....	84
3.15.3	Ανάλυση ακατέργαστου εκχυλίσματος με Χρωματογραφία Λεπτής Στιβάδας (Thin Layer Chromatography, TLC) και βιοαυτογραφία με έγχυση άγαρ (agar overlay bioautography).....	85
3.15.4	Ταυτοποίηση εκκρινόμενων διαχεόμενων ενώσεων στα ακατέργαστα εκχυλίσματα με χημική ανάλυση UHPLC-HRMS (Ultra-high performance liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry).....	86
3.16	Βιολογική αντιμετώπιση έναντι φυτοπαθογόνων σε αποκομμένους καρπούς.....	87
3.16.1	Επιλογή και απολύμανση καρπών.....	87
3.16.2	Ανθράκνωση καρπών ελιάς (ποικιλία Κορωνέικη).....	87
3.16.3	Τεφρά σήψη σε μικρόκαρπες τομάτες (βελανίδι) (ποικιλία Lobello).....	88
3.16.4	Τεφρά σήψη σε επιτραπέζια σταφύλια.....	89
3.16.5	Υπολογισμός δεικτών ασθένειας.....	89
3.16.6	Μελέτες αποικισμού στις πληγές των καρπών.....	90
3.17	Επίδραση στην ανάπτυξη του φυτού <i>Solanum lycopersicum</i> var. <i>chondrokatsari</i> με τη μέθοδο βιοδιέγερσης σπόρου.....	90
3.17.1	Βιοδιέγερση σπόρου με χρήση παράγοντα προσκόλλησης.....	90
3.17.2	Επίδραση στη βλαστικότητα σε <i>in vitro</i> συνθήκες.....	91
3.17.3	Επίδραση στην ανάπτυξη σε <i>in vitro</i> συνθήκες.....	91
3.17.4	Επίδραση στην ανάπτυξη σε συνθήκες θερμοκηπίου.....	92
3.17.5	Αποικισμός των βακτηριακών στελεχών στη ριζόσφαιρα σε συνθήκες θερμοκηπίου.....	93
3.18	Διερεύνηση επαγωγής διασυστηματικής ανοχής στο φυτό <i>Solanum lycopersicum</i> var. <i>Chondrokatsari</i> εναντίον του <i>B. cinerea</i> σε συνθήκες θερμοκηπίου.....	93
3.19	Ανάλυση επαγωγής έκφρασης γονιδίων άμυνας του φυτού <i>Solanum lycopersicum</i> var. <i>Chondrokatsari</i> σε συνθήκες θερμοκηπίου.....	93
3.19.1	Δειγματοληψία φύλλων.....	93
3.19.2	Απομόνωση φυτικού RNA.....	94
3.19.3	Καθαρισμός του RNA.....	94
3.19.4	Αντίστροφη μεταγραφή και σύνθεση του συμπληρωματικού DNA (cDNA).....	95
3.19.5	Ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real-Time quantitative PCR, RT- qPCR).....	96
3.20	Απομόνωση βακτηριακού γενωμικού DNA.....	98
3.21	Προσδιορισμός συγκέντρωσης και καθαρότητας νουκλεϊνικών οξέων (DNA).....	98
3.22	Αλληλούχιση γονιδιωμάτων.....	98
3.23	<i>In silico</i> ανάλυση των αλληλουχιών.....	99
3.23.1	Φυλογενετική ταξινόμηση με βάση το 16S rRNA γονίδιο.....	99
3.23.2	Ανάλυση του ολικού γονιδιώματος.....	99
3.24	Μετρήσεις και στατιστική ανάλυση.....	100
4.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	102
4.1	Επιλογή αντιπροσωπευτικών ενδοφυτικών βακτηριακών στελεχών.....	102
4.1.1	Επιλογή ενδοφυτικών βακτηριακών στελεχών από τη συλλογή του εργαστηρίου.....	102

4.1.2	Κατηγοριοποίηση των βακτηρίων με βάση τις αλληλεπιδράσεις τους.....	109
4.1.3	Διερεύνηση επιθυμητών βακτηριακών χαρακτηριστικών <i>in vitro</i>	117
4.1.4	Επίδραση στο φαινότυπο του φυτού μοντέλου <i>Arabidopsis thaliana</i> Col-0 <i>in vitro</i>	125
4.1.5	Σύνοψη-Επιλογή των αντιπροσωπευτικών στελεχών.....	127
4.2	Επιλογή των καταλληλότερων ενδοφυτικών βακτηριακών στελεχών.....	128
4.2.1	Διερεύνηση κινητικότητας.....	128
4.2.2	Διερεύνηση ικανότητας σχηματισμού βιοϋμενίου (biofilm).....	129
4.2.3	Διερεύνηση <i>in vitro</i> προώθησης της ανάπτυξης του φυτού μοντέλου <i>Arabidopsis thaliana</i>	130
4.2.4	Διερεύνηση <i>in vitro</i> προώθησης της ανάπτυξης του φυτού <i>Solanum lycopersicum</i> var. Chondrokatsari Messinias	136
4.2.5	Διερεύνηση ικανότητας παρεμπόδισης φυτοπαθογόνων μυκήτων <i>in vitro</i> με τη μέθοδο της διπλής καλλιέργειας.....	138
4.2.6	Σύνοψη-Επιλογή των καταλληλότερων στελεχών	140
4.3	Περαιτέρω διερεύνηση της ικανότητας των επιλεγμένων βακτηριακών στελεχών στην αντιμετώπιση φυτοπαθογόνων μυκήτων <i>in vitro</i>	142
4.3.1	Δράση των στελεχών έναντι του φυτοπαθογόνου <i>Colletotrichum acutatum</i> σε διπλή καλλιέργεια <i>in vitro</i> και σε αποκομμένους καρπούς ελιάς	142
4.3.2	Επίδραση βακτηριακών καλλιεργειών και υπερκείμενου βακτηριακών καλλιεργειών στην ανάπτυξη του φυτοπαθογόνου μύκητα <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i> κατά τη διπλή καλλιέργεια <i>in vitro</i>	144
4.3.3	Απομόνωση και ανάλυση ακατέργαστων εκχυλισμάτων από μονή βακτηριακή καλλιέργεια και συγκαλλιέργεια με <i>Botrytis cinerea</i> σε στερεό θρεπτικό υποστρώμα.....	146
4.3.4	Ανίχνευση μεταβολιτών του ακατέργαστου εκχυλίσματος από μονή βακτηριακή καλλιέργεια σε στερεό μέσο με χημική ανάλυση UHPLC-HRMS	149
4.4	Αλληλούχηση γονιδιωμάτων των επιλεγμένων βακτηριακών στελεχών	155
4.4.1	Χαρακτηριστικά του γονιδιώματος και φυλογενετική ταξινόμηση.....	155
4.4.2	Συστάδες γονιδίων που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση δευτερογενών μεταβολιτών.....	163
4.4.3	Γονίδια που εμπλέκονται στην προώθηση της ανάπτυξης των φυτών και στη βιοσύνθεση δευτερογενών μεταβολιτών	180
4.4.4	Ένζυμα που συνθέτουν ή καταβολίζουν υδατάνθρακες (Carbohydrate-active enzymes, CAZymes).....	185
4.5	Επιλογή των συνδυασμών βακτηριακών στελεχών για δημιουργία μιγμάτων που αποτελούνται από ζεύγη.....	187
4.5.1	Αλληλεπίδραση επιλεγμένων στελεχών με τη μέθοδο της υπερκείμενης έγχυσης ημιστερεού θρεπτικού υλικού (soft overlay agar).....	187
4.5.2	Αλληλεπίδραση επιλεγμένων στελεχών με τη δοκιμή σχηματισμού γραμμής οριοθέτησης κατά την ομαδική κίνηση σε επιφάνειες (swarm boundary assay).....	190
4.5.3	Επιλογή τελικών μιγμάτων βακτηριακών στελεχών προς περαιτέρω εξέταση	192
4.6	Αποικισμός και επίδραση των μεμονωμένων και μιγμάτων βακτηριακών στελεχών σε φυτά <i>Arabidopsis thaliana</i> Col-0 <i>in vitro</i>.....	193
4.7	Επίδραση μεμονωμένων και μιγμάτων βακτηριακών στελεχών στην ανάπτυξη του φυτού <i>Solanum lycopersicum</i> var. Chondrokatsari Messinias σε συνθήκες θερμοκηπίου.....	197
4.8	Δράση μεμονωμένων και μιγμάτων βακτηριακών στελεχών εναντίον του φυτοπαθογόνου μύκητα <i>Botrytis cinerea</i> σε αποκομμένους καρπούς (detached fruit).....	202

4.8.1	Μικρόκαρπες τομάτες (ποικιλία Lobello).....	204
4.8.2	Επιτραπέζια σταφύλια	208
4.9	Διερεύνηση ικανότητας των μεμονωμένων και μιγμάτων βακτηριακών στελεχών για επαγωγή διασυστηματικής αντοχής σε φυτά τομάτας υπό συνθήκες θερμοκηπίου	211
4.9.1	Δοκιμή βιολογικής αντιμετώπισης του φυτοπαθογόνου μύκητα <i>Botrytis cinerea</i>	211
4.9.2	Εξέταση επαγωγής γονιδίων άμυνας του φυτού με τη μέθοδο ποσοτικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (RT-qPCR)	212
5.	ΣΥΖΗΤΗΣΗ	214
5.1	Επιλογή αντιπροσωπευτικών στελεχών.....	215
5.2	Τα βακτηριακά στελέχη του γένους <i>Bacillus</i> συγκεντρώνουν πολλαπλά επιθυμητά χαρακτηριστικά.....	215
5.3	Επιλογή των καταλληλότερων στελεχών.....	224
5.4	Η ανάλυση του γενόματος και των εκκρινόμενων διαχεόμενων μεταβολιτών ανέδειξε το δυναμικό των επιλεγμένων στελεχών	226
5.5	Επιλογή συνδυασμών στελεχών για δοκιμή μιγμάτων	236
5.6	Το στέλεχος Ter90 και το μίγμα Hil4-Tel52 είχαν ωφέλιμη επίδραση σε φυτά τομάτας.....	239
5.7	Βακτηριακά στελέχη καταπολεμούν την τεφρά σήψη σε καρπούς τομάτας και αμπέλου, αλλά και την ανθράκνωση σε καρπούς ελιάς.....	241
5.8	Βακτηριακά στελέχη και μίγματα επάγουν τη διασυστηματική αντοχή φυτών τομάτας έναντι του <i>Botrytis cinerea</i>.....	251
5.9	Υπάρχει συνάφεια μεταξύ <i>in vitro</i> και <i>in vivo</i> δράσης;.....	256
5.10	Θα επιλεγόταν κάποιο μίγμα έναντι των μεμονωμένων βακτηριακών στελεχών;	256
5.11	Η συμβατότητα σε <i>in vitro</i> δοκιμές προβλέπει τη συμβατότητα στους φυτικούς ιστούς και τη ριζόσφαιρα; Παρατηρήθηκε εξάρτηση συμβατότητας και επιτυχημένου μίγματος;.....	257
5.11.1	Μίγμα Hil4-Tel52.....	257
5.11.2	Μίγμα Tel34-Ter90	258
5.11.3	Μίγμα Tel34-Hir139.....	259
6.	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	260
7.	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	261

Ευχαριστίες

Η συγκεκριμένη διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Γενικής και Γεωργικής Μικροβιολογίας που ανήκει στο Τμήμα Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Μέσα από την πολύχρονη παραμονή μου στο συγκεκριμένο εργαστήριο από προπτυχιακή φοιτήτρια έως και υποψήφια διδάκτωρ, νιώθω την ανάγκη να ευχαριστήσω τους ανθρώπους που είχαν καθοριστική συμβολή στην πορεία μου.

Το ευχαριστώ είναι λίγο για να εκφράσω την αμέριστη ευγνωμοσύνη μου στον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Παναγιώτη Κατινάκη, Ομότιμο Καθηγητή, για την ανέφελη πολύχρονη συνεργασία μας. Η καθοδήγησή του, οι πολύτιμες συμβουλές του, η ευρεία επιστημονική του κατανόηση, ο ενθουσιασμός του για την επιστήμη, οι πολύωρες συζητήσεις και ο ανιδιοτελής χαρακτήρας του με διαμόρφωσαν ως επιστήμονα, αλλά και ως άνθρωπο. Τον ευχαριστώ, λοιπόν, θερμά που συνέβαλλε σημαντικά στο να γίνει αυτό το ταξίδι ουσιαδές και ευχάριστο.

Θα ήθελα να εκφράσω θερμές ευχαριστίες στο μέλος της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής Καθηγητή κ. Δημήτρη Μπουράνη για τη βοήθεια, τη στήριξη, την εμπιστοσύνη του και τις συζητήσεις μας από τα προπτυχιακά έτη έως και την ολοκλήρωση της διατριβής. Ακόμη, θερμές ευχαριστίες οφείλω στον Καθηγητή κ. Ιορδάνη Χατζηπαυλίδη για τη βοήθεια, την καθοδήγηση και την άψογη συνεργασία μας όλα αυτά τα έτη. Ευχαριστώ, επίσης, τα υπόλοιπα μέλη της επταμελούς επιτροπής Καθηγητή κ. Γεώργιο Ζερβάκη, Καθηγητή κ. Επαμεινώνδα Παπλωματά, Καθηγητή κ. Δημήτριο Τσιτσιγιάννη, Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Σωτήριο Τζάμο και Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Κωνσταντίνο Δελή για τις πολύτιμες συμβουλές τους και την καθοριστική συμβολή τους στην ολοκλήρωση και τη βελτίωση αυτής της διατριβής.

Πέραν των μελών της επταμελούς επιτροπής οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ και σε άλλους ανθρώπους που βοήθησαν στην υλοποίηση της συγκεκριμένης εργασίας μέσω των συμβουλών τους, της βοήθειας στις αναλύσεις και την παροχή εξοπλισμού. Έτσι, ευχαριστώ τους κ.κ. Δρ Αγγελική Σκαγιά, Επίκουρο Καθηγητή Κωνσταντίνο Παπαδημητρίου, Δρ Δημοσθένη Νικολόπουλο, Επίκουρη Καθηγήτρια Στυλιανή Χωριανοπούλου, Καθηγητή Σπυρίδων Κίντζιο, Αναπληρωτή Καθηγητή Σταμάτη Ρήγα, Ομότιμο Καθηγητή Κωνσταντίνο Φασσέα και Καθηγητή Πολυδεύκη Χατζόπουλο καθώς και όλο το προσωπικό των εργαστηρίων Γενικής & Γεωργικής Μικροβιολογίας, Μοριακής Βιολογίας, Φυσιολογίας Φυτών και Μικροσκοπίας του ΓΠΑ. Ιδιαίτερα ευχαριστώ τις κυρίες δρ Ειρήνη Μπαίρα και δρ Αιμιλία Μαρκέλλου από το Μπενάκειο Φυτοπαθολογικό Ινστιτούτο για την καθοριστική συμβολή τους στην πραγματοποίηση και ανάλυση των αποτελεσμάτων της τεχνικής UHPLC-HRMS. Επίσης, ευχαριστώ την Καθηγήτρια κ. Γαρυφαλλιά Οικονόμου του Εργαστηρίου Γεωργίας ΓΠΑ για τη συλλογή και ταυτοποίηση των αρωματικών φυτών που χρησιμοποιήθηκαν. Ένα ξεχωριστό ευχαριστώ στην Δρ Αναστασία Βενιεράκη, μέλος ΕΔΙΠ, για την εξαιρετικά πολύτιμη

βοήθεια, καθώς και την αμέριστη εμπιστοσύνη και υποστήριξη που απλόχερα μου έχει προσφέρει τόσο για την ολοκλήρωση της εργασίας όσο και σε προσωπικό επίπεδο όλα αυτά τα χρόνια.

Επιθυμώ να ευχαριστήσω θερμά και τους συνάδελφους υποψήφιους διδάκτορες κ.κ. Καλλίμαχο Νηφάκο, Δήμητρα Δούκα και Τάσο-Νεκτάριο Σπαντίδο για τη συμβολή τους στην ολοκλήρωση της διατριβής. Το ευχαριστώ είναι λίγο για να εκφράσει την ευγνωμοσύνη μου στη συνάδελφο, πολύτιμη συνοδοιπόρο και αγαπημένη φίλη, δόκτωρ πλέον, Πωλίνα Τσαλαγατίδου για όλες τις επιστημονικές και μη συζητήσεις μας, τις συμβουλές της, την ψυχραιμία της στις δυσκολίες και την άψογη συνεργασία μας.

Θερμές ευχαριστίες στο προσωπικό του εργαστηρίου Γεωργικής Γενετικής & Βιοτεχνολογίας φυτών καθώς και του Εργαστηρίου Λαχανοκομίας του Πανεπιστημίου Πελοποννήσου για την πολύμηνη φιλοξενία και τη δυνατότητα διεξαγωγής των πειραμάτων θερμοκηπίου και RT-qPCR, Ιδιαίτερα ευχαριστώ τους κ.κ. Αναπληρωτή Καθηγητή Κωνσταντίνο Δελή και Καλλίμαχο Νηφάκο, μέλος ΕΤΕΠ, για την άριστη συνεργασία, την καθοδήγηση, τις συμβουλές τους καθώς και τη διατήρηση του ευχάριστου κλίματος που ήταν απαραίτητο στη διεξαγωγή των τόσο σημαντικών και δύσκολων πειραμάτων. Θα ήθελα, επίσης, να ευχαριστήσω τις φοιτήτριες Δήμητρα Αγγελουπούλου, Μαρία Βαβαρούτσου και Κωνσταντίνα Κοντούλη για τη βοήθεια τους στα πειράματα θερμοκηπίου. Ακόμη, ευχαριστώ την κ. Ευγενία Σταματελοπούλου, μέλος ΕΤΕΠ του εργαστηρίου Ενόργανης Ανάλυσης για την άδεια χρήσης εργαστηριακού εξοπλισμού, την καλοσύνη της και το χαμόγελό της.

Τέλος, πάνω απ'όλα, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τους γονείς μου, Ελευθερία Μαργαρίτη και Κυριάκο Θωμλούδη που είναι πάντα δίπλα μου, πιστεύουν σε εμένα και κάνουν το καλύτερο δυνατό για να μπορέσω να επιτύχω τα όνειρά μου, καθώς και τον αρραβωνιαστικό μου Θανάση Παπανικολάου για την κατανόηση και την ενθάρρυνση.

Παρουσιάσεις σε συνέδρια-Δημοσιεύσεις

Η συγκεκριμένη διατριβή οδήγησε σε ανακοινώσεις των αποτελεσμάτων σε συνέδρια (Ελληνικά και Διεθνή) με τη μορφή προφορικών παρουσιάσεων ή/και γραπτών (πόστερ), καθώς και τη δημοσίευση ερευνητικών άρθρων και ανασκοπήσεων σε διεθνή επιστημονικά περιοδικά με κριτές.

Συμμετοχές σε συνέδρια-Άρθρα σε πρακτικά συνεδρίων

Thomloudi E.E., Tsalgatiidou P.C., Baira E., Papadimitriou K., Venieraki A., Katinakis P., Endophytic strain *B. halotolerans* Hil4 is a promising biological control agent of gray mold in fruit with plant growth promoting potential, Poster presented at 9th *Mikrobiokosmos conference*; 2021; 16-18 December; Athens, Greece.

Thomloudi E.E., Tsalgatiidou P.C., Venieraki A., Katinakis P., Characterization of endophytic bacteria from medicinal plants and growth effect on *Arabidopsis thaliana* *in vitro*, *Proceedings of the 28th International Symposium of CIEC the International Scientific Centre for Fertilizers Fertilization and Nutrient Use Efficiency in Mediterranean Environments*, Athens, Greece, 3-4 November, 2020, pp. 187-192.

Thomloudi, E.E., Tsalgatiidou, P.C., Spantidos, T-N., Douka, D., Dimou, M., Venieraki, A., Katinakis, P. Plant growth promoting effects of endophytic bacteria from *Teucrium polium* and *Hypericum hircinum* on *Solanum lycopersicum*. Poster presented at 8th *Mikrobiokosmos conference*; 2019; 18-20 April; Patra, Greece.

Thomloudi, E-E., Tsalgatiidou, P.C, Davari ,A., Douka, D., Spantidos, T-N., Dimou, M., Venieraki, A, Katinakis, P. Characterization of endophytic bacteria from medicinal plants *Teucrium polium* and *Hypericum hircinum*. Oral presentation at 19th *Hellenic Phytopathology Conference*; 2018; 30 October-1 November; Athens, Greece

Δημοσιεύσεις σε διεθνή επιστημονικά περιοδικά με κριτές (peer-reviewed)

Thomloudi, E. E., Tsalgatiidou, P. C., Douka, D., Spantidos, T. N., Dimou, M., Venieraki, A., & Katinakis, P. (2019). Multistrain versus single-strain plant growth promoting microbial inoculants-The compatibility issue. *Hellenic Plant Protection Journal*, 12(2), 61-77.

Thomloudi, E. E., Tsalgatiidou, P. C., Baira, E., Papadimitriou, K., Venieraki, A., & Katinakis, P. (2021). Genomic and Metabolomic Insights into Secondary Metabolites of the Novel *Bacillus halotolerans* Hil4, an Endophyte with Promising Antagonistic Activity against Gray Mold and Plant Growth Promoting Potential. *Microorganisms*, 9(12), 2508.

Thomloudi, E. E. et al.

Endophytic *Bacillus velezensis* Hir139 is a promising plant growth promoting and biological control agent with large genomic and metabolic potential (*In preparation*)

Thomloudi, E. E. et al.

Genome mining of three *Teucrium polium* endophytic bacteria with plant growth promoting and biological control abilities *in vitro* (*In preparation*)

Thomloudi, E. E. et al.

Investigation of efficacy enhancement through the use of endophytic bacterial mixtures (*In preparation*)

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Προκλήσεις της σύγχρονης γεωργίας

Σύμφωνα με τον Οργανισμό Τροφίμων και Γεωργίας (Food and Agriculture Organization, FAO) των Ηνωμένων Εθνών, ο πληθυσμός της γης θα φτάσει σε έναν πρωτόγνωρο αριθμό τα επόμενα χρόνια, με προβλέψεις να υποστηρίζουν πως θα ξεπεράσει τα 10 δις μέχρι το 2100 (Basu et al., 2021). Αυτή η πρόβλεψη πυροδοτεί την ανάγκη εξασφάλισης τροφής αλλά και της ισομερούς κατανομής της (Ehrlich et al., 2015). Πέραν των τροφίμων που προορίζονται για ανθρώπινη κατανάλωση, υπάρχουν καλλιέργειες που σχετίζονται με τη διατροφή παραγωγικών ζώων, τη κλωστοϋφαντουργία, τα βιοκαύσιμα κ.α. (Backer et al., 2018). Οι φυτοπαθογόνοι οργανισμοί είναι ένας από τους σημαντικότερους περιοριστικούς παράγοντες στην παραγωγή τροφίμων, τόσο στο πεδίο όσο και μετασυλλεκτικά (Pirttilä et al., 2021), ενώ οι αβιοτικές καταπονήσεις των φυτών, όπως η αλατότητα και η ξηρασία, έχουν επιδεινωθεί λόγω αύξησης της θερμοκρασίας και έλλειψης νερού με αποτέλεσμα τη συνεχή απώλεια καλλιεργήσιμων εδαφών (Pirttilä et al., 2021). Περίπου 40% των γεωργικών εδαφών του κόσμου και 24% των παραγωγικών περιοχών έχουν οδηγηθεί σε μείωση της γονιμότητας, της παραγωγικής τους ικανότητας και της βιοποικιλότητας (Maximillian et al., 2019). Ακόμη, έχει αυξηθεί η δημοτικότητα των τροφών φυτικής προέλευσης σε σχέση με τα προϊόντα ζωικής προέλευσης για περιβαλλοντικούς και ηθικούς λόγους (Van Vliet et al., 2020).

Για την αντιμετώπιση της αυξανόμενης ζήτησης τροφής και δεδομένου της περιορισμένης διαθεσιμότητας γεωργικών εδαφών, έχει δοθεί έμφαση στην αύξηση της απόδοσης και στη μείωση των απωλειών μέσω του αποτελεσματικότερης αντιμετώπισης των παθογόνων και της αποτελεσματικότερης λίπανσης (Raymaekers et al., 2020). Η γεωργική παραγωγή είναι σε μεγάλο βαθμό εξαρτώμενη από τα φυτοφάρμακα για τη διαχείριση ασθενειών και από τα χημικά λιπάσματα που παρέχουν επαρκή θρεπτικά για τη βελτιστοποίηση της απόδοσης των καλλιεργειών, ενώ η πίεση για ανταπόκριση στην αυξημένη ζήτηση υπό δυσμενείς συνθήκες έχει οδηγήσει στην υπερχρήση τους. Η έλευση της Πράσινης Επανάστασης στο τελευταίο μέρος του 20^{ου} αιώνα προκάλεσε αύξηση των αποδόσεων των καλλιεργειών ανευ προηγούμενου από την εισαγωγή χημικών προϊόντων (λιπάσματα, παρασιτοκτόνα, ζιζανιοκτόνα) καθώς και σπόρων και φυτών με αυξημένες αποδόσεις μέσω γενετικής βελτίωσης (Backer et al., 2018; Basu et al., 2021). Τα αγροχημικά προϊόντα ενέχουν κινδύνους για την υγεία και το περιβάλλον, ενώ η πρακτική των αγροτών να χρησιμοποιούν μεγαλύτερη από τη συνιστώμενη δόση εντείνει το πρόβλημα (Menéndez & Paço, 2020). Η υπερχρήση χημικών λιπασμάτων και φυτοπροστατευτικών σκευασμάτων έχει αρνητικές επιδράσεις στην ποιότητα του εδάφους όσον αφορά τις φυσικές (υφή, διαπερατότητα, απορροή), χημικές (ανισορροπία θρεπτικών στοιχείων, οξίνιση) και βιολογικές του ιδιότητες (ωφέλιμοι μικροοργανισμοί) (Savci, 2012; Carvalho, 2017).

Τα εμπορικά συμβατικά λιπάσματα βασίζονται στα τρία κύρια θρεπτικά στοιχεία, το άζωτο, το φώσφορο και το κάλιο. Γενικά, 60% με 90% του συνολικού λιπάσματος απομακρύνεται από τις καλλιέργειες είτε μέσω έκπλυσης είτε μέσω συμπλοκοποίησης με κατιόντα, με το υπολειπόμενο 10% έως 40% να παραμένει βιοδιαθέσιμο για τα φυτά (Ahemad & Kibret, 2014). Αυτά τα γεγονότα έχουν οδηγήσει σε πιο συχνές εφαρμογές των προϊόντων, εντείνοντας τις αρνητικές επιπτώσεις τους στο οικοσύστημα. Η έκπλυση των θρεπτικών χημικών στοιχείων και η διείσδυσή τους στους υπόγειους υδροφόρους ορίζοντες οδηγούν στη συγκέντρωσή τους στα ύδατα προκαλώντας το φαινόμενο του ευτροφισμού (Basu et al., 2021). Τέλος, συντελούν στην αύξηση των εκπομπών αερίων του θερμοκηπίου λόγω της χρήσης ορυκτών καυσίμων για την παραγωγή τους (Pirttilä et al., 2021).

Κάποιες μελέτες έχουν δείξει πως τα φυτοφάρμακα μειώνουν την αφθονία και την ποικιλότητα του εδαφικού μικροβιώματος (Singh et al., 2020), ενώ επηρεάζουν αρνητικά και άλλους ωφέλιμους οργανισμούς, όπως έντομα επικονιαστές και άλλα μικροασπόνδυλα του εδάφους, που είναι απαραίτητα για την σωστή λειτουργία του οικοσυστήματος (Uhl & Brühl, 2019). Υπολείμματα των φυτοπροστατευτικών προϊόντων ανιχνεύονται στο έδαφος, στο νερό και στα τρόφιμα, απειλώντας την υγεία των καταναλωτών και των οργανισμών στο περιβάλλον ακόμα και αν χρησιμοποιούνται στη συνιστώμενη δόση (Aktar et al., 2009). Η ανάπτυξη ανθεκτικότητας των παθογόνων είναι πολύ συχνό φαινόμενο, όπως η ανθεκτικότητα των μυκήτων στα μυκητοκτόνα των ομάδων Strubilorins και Azoles, γεγονός που οδηγεί στην εφαρμογή ακόμα μεγαλύτερων ποσοτήτων από την προτεινόμενη δόση, και στην ανάγκη εύρεσης εναλλακτικών προϊόντων με διαφορετικό τρόπο δράσης (Raymaekers et al., 2020).

Έτσι, καθίσταται έντονη η ανάγκη για υιοθέτηση βιώσιμων πρακτικών, με χαμηλό περιβαλλοντικό αντίκτυπο, μειώνοντας τη χρήση λιπασμάτων και φυτοφαρμάκων, όπως είναι η ολοκληρωμένη διαχείριση θρεπτικών συστατικών (Integrated Nutrient Management, INM) και η ολοκληρωμένη διαχείριση εχθρών και ασθενειών των καλλιεργειών (Integrated Pest Management, IPM). Σε κάποιες χώρες του κόσμου έχει γίνει προσπάθεια μείωσης της χρήσης των αγροχημικών, κυρίως λόγω των δυσμενών επιπτώσεων στην ανθρώπινη υγεία, αλλά σε πολλές αναπτυσσόμενες χώρες συνεχίζεται η χρήση τους χωρίς κάποιου είδους κανονισμό (Nicolopoulou-Stamati et al., 2016). Η Ευρωπαϊκή Ένωση προωθεί πρακτικές με χαμηλή εισροή φυτοφαρμάκων στη διαχείριση ασθενειών, όπως είναι η ολοκληρωμένη διαχείριση εχθρών και ασθενειών, με την εξαγωγή Κανονισμών (Regulations), όπως τον Ευρωπαϊκό Κανονισμό για τα Φυτοφάρμακα (ΕΚ) 1107/2009 και REACH¹ (<https://echa.europa.eu/regulations/reach/>) και Οδηγιών (Directives) όπως την 128/2009/EC που έχουν ως στόχο τη μείωση των νέων συνθετικών προϊόντων και την επανεκτίμηση πολλών χημικών σκευασμάτων πρώτης γενιάς (European Commission, 2009). Ο Οργανισμός Τροφίμων και Γεωργίας (FAO) δίνει τον εξής ορισμό για την IPM: «Ολοκληρωμένη διαχείριση εχθρών και ασθενειών ορίζεται ως η προσεκτική θεώρηση όλων των διαθέσιμων τεχνικών αντιμετώπισης και η επακόλουθη ενσωμάτωση κατάλληλων μέτρων που αποθαρρύνουν την ανάπτυξη των πληθυσμών των παθογόνων

¹ Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH)

και κρατάνε τα επίπεδα των παρασιτοκτόνων και άλλων παρεμβάσεων σε επίπεδα που είναι διαχειρίσιμα οικονομικά και μειώνουν ή ελαχιστοποιούν τους κινδύνους που σχετίζονται με την ανθρώπινη υγεία και το περιβάλλον. Η IPM δίνει έμφαση στην ανάπτυξη μιας υγιούς καλλιέργειας με την ελάχιστη δυνατή αναστάτωση στα αγρο-οικοσυστήματα ενθαρρύνοντας φυσικούς μηχανισμούς ελέγχου παρασίτων²) (FAO, 2022). Με αυτόν τον τρόπο ο πληθυσμός των παθογόνων μπορεί να μην εξαλείφεται πλήρως, αλλά διατηρείται σε τόσο χαμηλά επίπεδα όσο χρειάζεται ώστε να αποφευχθεί σημαντική ανάπτυξη συμπτωμάτων ασθένειας (Raymaekers et al., 2020). Για παράδειγμα, έχουν επιβληθεί περιορισμοί στη χρήση φυτοφαρμάκων για την αντιμετώπιση της τεφράς σήψης που προκαλείται από το παθογόνο *B. cinerea* μέσα στο πλαίσιο του κανονισμού (ΕΚ) 1107/2009 (Villaverde et al., 2014; Lamichhane et al., 2016).

Ένα ενδιαφέρον μέτρο για την επίτευξη της βιώσιμης γεωργίας ήταν η στρατηγική «Από το Αγρόκτημα στο Πιάτο» (Farm to Fork, F2F) που δημοσιεύτηκε το Μάιο του 2020 από την Ευρωπαϊκή Ένωση, της οποίας σκοπός ήταν να γίνει η Ευρώπη κλιματικά-ουδέτερη (climate neutral) έως το 2050. Η F2F έχει ως στόχο την επίτευξη συστημάτων παροχής τροφής δίκαιων και περιβαλλοντικά-φιλικών με το να επισπεύσει τη μετάβαση σε ένα πιο βιώσιμο, παραγωγικό σύστημα στο οποίο η εξάρτηση από φυτοφάρμακα και η υπερχρήση των λιπασμάτων θα μειωθεί δραστικά (Castiglione et al., 2021). Ακόμη, η F2F υποστηρίζει την αύξηση της γεωργικής γης όπου πραγματοποιούνται βιολογικές καλλιέργειες ώστε να διατηρηθεί η γονιμότητα των εδαφών και να μειωθεί η απώλεια της βιοποικιλότητας (Castiglione et al., 2021).

1.2 Βιοδιεγέρτες (Biostimulants, BS) και Παράγοντες βιολογικής αντιμετώπισης φυτοπαθογόνων (Biological Control Agents, BCAs)

Η παγκόσμια ασφάλεια των τροφίμων χρειάζεται καινοτομίες και ανάπτυξη τεχνολογιών που θα οδηγήσουν σε αυξημένη παραγωγή τροφίμων εξασφαλίζοντας βιώσιμη εναντικοποίηση της γεωργίας. Αρκετές τέτοιες τεχνολογίες έχουν υιοθετηθεί όπως τα έξυπνα συστήματα άρδευσης, τα έξυπνα λιπάσματα (π.χ. λιπάσματα ελεγχόμενης αποδέσμευσης), καθώς και συστήματα απεικόνισης και ανίχνευσης που προσφέρουν πολύτιμες πληροφορίες για την κατάσταση της καλλιέργειας (Telagam et al., 2021). Ακόμη, έχει ενθαρρυνθεί η έρευνα για αγροβιοτεχνολογικά προϊόντα ως εναλλακτική και περιβαλλοντικά φιλική λύση για την προώθηση της ανάπτυξης των φυτών και την καταπολέμηση προ- και μετασυλλεκτικών ασθενειών (Calvo et al., 2017; Morales-Cedeno et al., 2020). Μία τέτοια λύση είναι η ανάπτυξη γενετικά τροποποιημένων φυτών, ωστόσο τα φυτοπαθογόνα καταφέρνουν μέσα σε μερικά χρόνια να αναπτύξουν ανθεκτικότητα, ενώ παράλληλα επικρατεί μία γενική έλλειψη

² “Integrated Pest Management (IPM) means the careful consideration of all available pest control techniques and subsequent integration of appropriate measures that discourage the development of pest populations and keep pesticides and other interventions to levels that are economically justified and reduce or minimize risks to human health and the environment. IPM emphasizes the growth of a healthy crop with the least possible disruption to agro-ecosystems and encourages natural pest control mechanisms.”

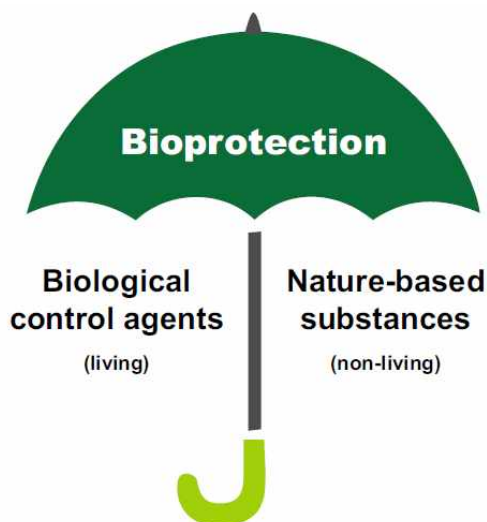
αποδοχής των γενετικά τροποποιημένων φυτών από τους καταναλωτές (Carvalho, 2017; Nelson R. et al., 2018).

Μία άλλη, πολλά υποσχόμενη, λύση είναι η εφαρμογή προϊόντων που ονομάζονται βιοδιεγέρτες (biostimulants). Αυτή η κατηγορία περιλαμβάνει συστατικά βιολογικής προέλευσης, δηλαδή μικροοργανισμούς, βιοδραστικές ενώσεις που προέρχονται από φυτά, φύκη και κομποστ, καθώς και υδρολύματα φυτικών ή ζωικών πρωτεϊνών. Η χρήση τους αποσκοπεί στην επαγωγή ωφέλιμων διεργασιών των φυτών, όπως την πρόσληψη των θρεπτικών, την αποδοτικότητα χρήσης των θρεπτικών και την αντοχή σε αβιοτικές και βιοτικές καταπονήσεις (Yakhin et al., 2017). Οι βιοδιεγέρτες μπορούν να ενσωματωθούν στην ολοκληρωμένη διαχείριση επιβλαβών οργανισμών και θρεπτικών (integrated pest and nutrient management, IPM/INM) με σκοπό τη μείωση των ποσοτήτων των αγροχημικών που χρησιμοποιούνται και όχι την κατάργησή τους, ώστε να διατηρηθεί η αποδοτικότητα της καλλιέργειας, αλλά παράλληλα να επιτευχθεί και η βιωσιμότητα μέσω της μείωσης των επιβλαβών συνεπειών των χημικών εισροών (Adesemoye et al., 2009; Rotolo et al., 2017).

Σύμφωνα με τον ορισμό του du Jardin (2015), φυτικός βιοδιεγέρτης είναι οποιαδήποτε ουσία ή μικροοργανισμός εφαρμόζεται στα φυτά με στόχο την αύξηση της απόδοσης θρέψης, της ανθεκτικότητας σε αβιοτική καταπόνηση και/ή των χαρακτηριστικών ποιότητας της καλλιέργειας ανεξάρτητα του θρεπτικού περιεχομένου του και κατ' επέκταση τα μίγματα τέτοιων ουσιών ή/και μικροοργανισμών. Ο πλέον πρόσφατος ορισμός των βιοδιεγερτών των φυτών στον Ευρωπαϊκό Κανονισμό 2019/1009 είναι ο εξής: «Ένας φυτικός βιοδιεγέρτης θα είναι ένα Ευρωπαϊκό προϊόν λίπανσης, η χρήση του οποίου θα είναι να διεγείρει τις διαδικασίες της φυτικής θρέψης ανεξάρτητα από το θρεπτικό περιεχόμενο του προϊόντος με μοναδικό στόχο τη βελτίωση ενός ή περισσοτέρων από τα παρακάτω χαρακτηριστικά για το φυτό ή τη ριζόσφαιρα: i) απόδοση χρήσης θρεπτικών, ii) αντοχή σε αβιοτική καταπόνηση, iii) αύξηση χαρακτηριστικών ποιότητας, iv) διαθεσιμότητα θρεπτικών στο έδαφος ή τη ριζόσφαιρα» (European Commission, 2019). Ωστόσο, ο χαρακτηρισμός ενός προϊόντος ως βιοδιεγέρτη και η τοποθέτησή του στην αγορά της Ευρωπαϊκής Ένωσης θα πρέπει να γίνει μετά από την πραγματοποίηση δοκιμών με συγκεκριμένες αρχές που έχουν οριστεί από το Ευρωπαϊκό Συμβούλιο Βιομηχανίας Βιοδιεγερτών (European Biostimulant Industry Council) (Rouphael & Colla, 2020). Η χρήση οικολογικών λιπασμάτων, όπως τα βιολιπάσματα που βασίζονται κυρίως σε βακτηριακά προβιοτικά των φυτών, αντιπροσωπεύει μία λύση στα περισσότερα προβλήματα που προέρχονται από την εφαρμογή χημικών λιπασμάτων (Menéndez and Paço, 2020). Τα βιολιπάσματα αποτελούν υποκατηγορία των βιοδιεγερτών (du Jardin, 2015).

Σύμφωνα με τους Stenberg και συνεργάτες (2021) η «βιολογική αντιμετώπιση» (biological control, biocontrol) αφορά την αξιοποίηση ζώντων παραγόντων και ιών για την άμεση ή έμμεση καταπολέμηση όλων των ειδών εχθρών και φυτοπαθογόνων μικροοργανισμών, όπως τα έντομα, τα φυτοπαθογόνα μικρόβια, ζιζάνια, κουνούπια και τρωκτικά. Η βιολογική αντιμετώπιση πρέπει πάντα να συμπεριλαμβάνει έναν παράγοντα αντιμετώπισης, έναν εχθρό ή φυτοπαθογόνο μικρόβιο και έναν

ανθρώπινο παράγοντα που ωφελείται από την υπηρεσία του παράγοντα αντιμετώπισης. Υπάρχει σύγχυση σχετικά με την ορολογία της βιολογικής αντιμετώπισης εμποδίζοντας την αποτελεσματική επικοινωνία μεταξύ ερευνητών, νομοθετών και της βιομηχανίας προϊόντων βιολογικής αντιμετώπισης φυτοπαθογόνων. Ένα σημείο που αποτελεί σύγχυση είναι πως πολλοί ερευνητές χρησιμοποιούν και τις εκκρινόμενες μικροβιακές ενώσεις (χωρίς τα κύτταρα) στον ορισμό (Raymaekers et al., 2020). Ο διεθνής σύλλογος κατασκευαστών προϊόντων βιολογικής αντιμετώπισης φυτοπαθογόνων (International Biocontrol Manufacturers' Association, IBMA) προωθεί τον ευρύτερο όρο «βιοπροστασία (bioprotection)» που περιέχει όλους τους παράγοντες βιολογικής προέλευσης και όχι μόνο τους ζώντες οργανισμούς. Σύμφωνα με εκείνους, οι παράγοντες βιοπροστασίας «θα πρέπει να προέρχονται από τη φύση ή να είναι ίδιοι με τους φυσικούς όταν συντίθενται και γενικά να έχουν μειωμένη επίπτωση στην ανθρώπινη υγεία και το περιβάλλον» (IBMA, 2018). Έχει προταθεί ο όρος βιοπροστασία να διαχωρίζεται σε ζώντες βιοπροστατευτικούς παράγοντες (παράγοντες βιολογικής αντιμετώπισης φυτοπαθογόνων) και σε ουσίες ή εργαλεία φυσικής προέλευσης, όπως είναι ενώσεις φυτών και η τεχνική της σίγησης RNA (Stenberg et al., 2021).



Εικόνα 1.1 Η ομπρέλλα της βιοπροστασίας που καλύπτει ζώντες παράγοντες βιολογικής αντιμετώπισης και ουσίες φυσικής προέλευσης. Και οι δύο κλάσεις παρέχουν ισχυρή προστασία εναντίον των εχθρών και ασθενειών των φυτών. Είναι σημαντική η τήρηση σαφούς εννοιολογικού ορίου μεταξύ των δύο εννοιών για ερευνητικούς και θεσμικούς λόγους. Η εικόνα προέρχεται από το άρθρο των Stenberg και συνεργατών (2021).

Η Ευρώπη και οι ΗΠΑ αποτελούν τις πιο εκτεταμένες αγορές για προϊόντα βιολογικής αντιμετώπισης, ενώ η παγκόσμια αγορά βιομηκτοκτόνων εκτιμάται να φτάσει τα 2877.2 εκατομμύρια USD έως το 2024, καθώς πολλές μεγάλες εταιρίες αγροχημικών διευρύνουν το τμήμα έρευνας και ανάπτυξης προς τη βιολογική αντιμετώπιση εχθρών και ασθενειών των φυτών (Dimoroulou et al., 2021b). Όσον αφορά τους παράγοντες βιολογικής αντιμετώπισης (Biological Control Agents, BCAs), η Ευρωπαϊκή Ένωση τα κατατάσσει στα βιοπαρασιτοκτόνα (biopesticides) κι έτσι υπεσέρχονται στον κανονισμό για τα παρασιτοκτόνα (EC 1107/2009). Στην Ευρώπη υπάρχει σύστημα αξιολόγησης δύο βημάτων ανάλογα με τις απαιτούμενες προδιαγραφές για την δραστική ουσία (ταυτοποίηση, τρόπος δράσης, τοξικότητα) και τη μορφή του σκευάσματος (formulation) με

την εξέταση να γίνεται από όλα τα κράτη-μέλη, την Ευρωπαϊκή Αρχή για την Ασφάλεια των Τροφίμων (EFSA) και την Ευρωπαϊκή Επιτροπή (Dimoroulou et al., 2021b). Η διαδικασία είναι κοστοβόρα και χρονοβόρα, με διάρκεια αναμονής περίπου 10 έτη περιορίζοντας την εμπορική εκμετάλλευση νέων BCAs, ειδικά από μικρές και μεσαίες επιχειρήσεις, και κάνοντας επιτακτική την ανάγκη για βελτιστοποίηση όλης της διαδικασίας ταυτοποίησης, ανάπτυξης και έγκρισης τους (Raymaekers et al., 2020). Αυτός είναι και ο λόγος που πολλά βακτηριακά στελέχη προώθησης της ανάπτυξης των φυτών που μπορεί να έχουν και ικανότητες βιολογικής αντιμετώπισης είναι εγγεγραμμένα ως βιολιπάσματα και όχι ως βιοπαρασιτοκτόνα (Dimoroulou et al., 2021b).

Τα ωφέλιμα για τα φυτά μικρόβια μπορούν να λειτουργούν ως Βιοδιεγέρτες (Biostimulants) ή/και ως Παράγοντες βιολογικής αντιμετώπισης (Biological Control Agents, BCAs). Η γεωργική μικροβιακή βιοτεχνολογία αποτελεί μία υποσχόμενη λύση για την βελτίωση της ποιότητας της αγροτικής παραγωγής μέσω της εκμετάλλευσης ωφέλιμων αλληλεπιδράσεων φυτών-μικροβίων (Basu et al., 2021; Busby et al., 2017; Timmusk et al., 2017). Η ανάπτυξη τέτοιων προϊόντων είναι μία από τις μεγαλύτερες οικολογικές προκλήσεις που αντιμετωπίζουν οι μικροβιολόγοι και οι φυτοπαθολόγοι.

Παρά την ανακάλυψη της παρασιτοκτόνου δράσης των βακτηρίων εδώ και αρκετές δεκαετίες, οι παράγοντες βιολογικής αντιμετώπισης αναπτύχθηκαν σε πρακτικό επίπεδο μόλις την τελευταία δεκαετία, καθώς υπήρχε μειωμένη εμβάθυνση στη βιολογία τους και τους μηχανισμούς αλληλεπίδρασης με το φυτό. Η εξειδίκευση των μικροβιολόγων στους BCAs και τα βιοτεχνολογικά εργαλεία βοήθησε στην ανάδειξη των δυνατοτήτων αυτών των μικροβίων, ενώ οι επιστήμονες και η αγροβιομηχανία μετατοπίζουν διστακτικά το ενδιαφέρον τους από την παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών στην εκμετάλλευση των σχέσεων BCA-ξενιστή-μικροβίωματος για την αντιμετώπιση των ασθενειών στα καλλιεργούμενα φυτά (Dimoroulou et al., 2021b).

Ο συνδυασμός ωφέλιμων μικροβίων με μειωμένη δόση (συγκέντρωση) ανόργανων λιπασμάτων και φυτοπροστατευτικών προϊόντων, μπορεί να έχει καλύτερα ή παρόμοια αποτέλεσμα σε σχέση με τη χρήση πλήρους δόσης (συγκέντρωσης) αποκλειστικά χημικών προϊόντων (Adesemoye et al., 2009; Sharma et al., 2009; Myresiotis et al., 2011; Bargaz et al., 2018; Lin et al., 2019). Για παράδειγμα, καθώς φαίνεται πως τα βιοπροστατευτικά προϊόντα δεν είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικά σε υψηλή πίεση του φυτοπαθογόνου *B. cinerea*, έχει δοκιμαστεί ο συνδυασμός βακτηριακών στελεχών με μειωμένη δόση φυτοπροστατευτικού προϊόντος το οποίο επέφερε εξαιρετικά αποτελέσματα (Rotolo et al., 2017). Ωστόσο, για τη χρήση μικροοργανισμών σε συνδυασμό με φυτοπροστατευτικά προϊόντα και λιπάσματα χρειάζεται η εξακρίβωση της συμβατότητας τους (Rotolo et al., 2017; Newton et al., 2020; Basu et al., 2021). Ακόμη, οι ωφέλιμοι μικροοργανισμοί μπορούν να συνδυαστούν και με εφαρμογές άλλων βιοδιεγερτών, όπως είναι οι μυκόρριζες και τα χουμικά οξέα (Castiglione et al., 2021).

Άλλη μια προσέγγιση ολοκληρωμένης διαχείρισης για την βελτιστοποίηση της αποτελεσματικότητας με παράλληλη μείωση των αρνητικών επιπτώσεων των φυτοπροστατευτικών προϊόντων (ανάπτυξη ανθεκτικότητας και παρουσία υπολειμμάτων) θα ήταν η εφαρμογή τέτοιων

προϊόντων στα αρχικά στάδια της καλλιέργειας και εφαρμογή βιολογικών παραγόντων πριν τη συγκομιδή, ώστε η εξάπλωση των φυτοπαθογόνων να μειώνεται στην αρχή και τα βιολογικά προϊόντα να είναι αποτελεσματικά μετά (Rotolo et al., 2017).

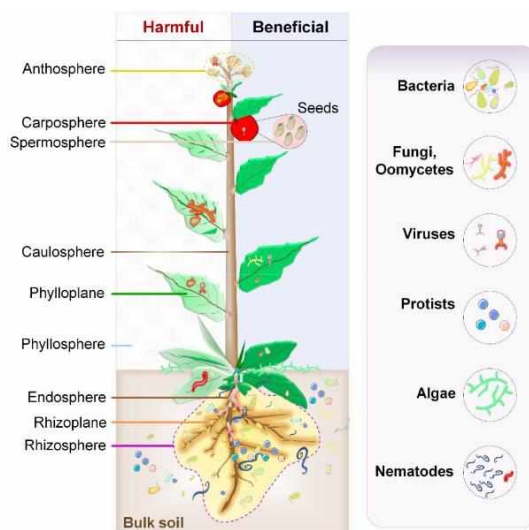
1.3 Μικροοργανισμοί που σχετίζονται με τα φυτά

Όπως τα ζώα και ο άνθρωπος, έτσι και τα φυτά έχουν το δικό τους μικροβίωμα που διασφαλίζει τη βέλτιστη λειτουργία και υγεία τους σε δυσμενείς συνθήκες (Berendsen et al., 2012; Sessitsch & Mitter, 2015; Souza et al., 2015). Μετά την βλάστηση του σπόρου, τα φυτά συνεχώς αλληλεπιδρούν με μικροοργανισμούς που βρίσκονται στο υπέργειο και υπόγειο τμήμα και περιλαμβάνουν κυρίως μύκητες, βακτήρια, αρχαία και πρώτιστα (Hassani et al., 2018). Οι αλληλεπιδράσεις κρίνονται ως ωφέλιμες, ουδέτερες ή επιβλαβείς, ενώ μπορεί ο ρόλος τους να εναλλάσσεται ανάλογα με τις συνθήκες, όπως συμβαίνει για παράδειγμα με τα παθογόνα σε λανθάνουσα μορφή (Santoyo et al., 2016).

Πλέον θεωρείται πως το γονιδίωμα των φυτών συμπληρώνεται από πληθώρα γονιδίων από τους μικροοργανισμούς που διαβιούν στην επιφάνεια, αλλά και το εσωτερικό των φυτών και θεωρείται πως αυτοί αποτελούν ένα δεύτερο γένωμα, αφού φαίνεται να έχουν έντονη επίδραση στην ποιότητα και την παραγωγή των καλλιεργειών, με το φυτικό και το μικροβιακό γονιδίωμα να ορίζονται ως ολογένωμα (hologenome) (Vandenkoornhuysen et al., 2015; Hassani et al., 2018) ή πανγένωμα (pangenome) (Turner et al., 2013). Τα γονιδιώματα των μικροβίων αυτών ορίζονται ως φυτικό μικροβίωμα (Berendsen et al., 2012; Hardoim et al., 2015; Frank et al., 2017). Οι μικροβιακές κοινότητες που σχετίζονται με τα φυτά αναγνωρίζονται πλέον ως κρίσιμες για την υγεία και απόδοση των φυτών (Hardoim et al., 2015; Santoyo et al., 2021).

1.3.1 Κατηγορίες μικροοργανισμών

Οι μικροοργανισμοί που σχετίζονται με τα φυτά μπορεί να διαβιούν στη ριζόσφαιρα (ριζοσφαιρικοί, rhizospheric), στην ενδόσφαιρα (ενδοφυτικοί, endophytic) ή να είναι προσδεδεμένοι στην επιφάνεια των φυτικών ιστών (επιφυτικοί, epiphytic), όπως στη ρίζα (rhizosphere), τα φύλλα (phyllosphere), τα άνθη (anthosphere), τους καρπούς (carposphere) και τα σπέρματα (spermosphere) (**Εικόνα 1.2**) (Hardoim et al., 2015). Ακόμη, κάποιοι μικροοργανισμοί μπορούν να εναλλάσσουν τόπους διαβίωσης ανάλογα με τις συνθήκες, για παράδειγμα ένας ενδοφυτικός μικροοργανισμός μπορεί να αποικίσει τη ριζόσφαιρα και το αντίστροφο (Hardoim et al., 2015).

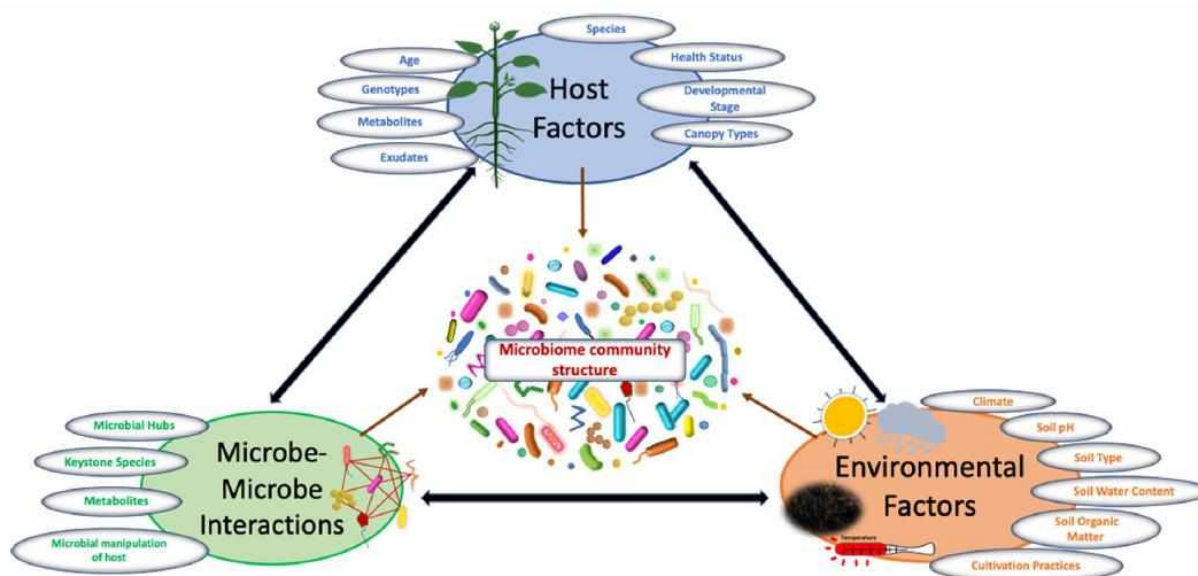


Εικόνα 1.2 Μικροβίωμα στο φυτικό οικοσύστημα. Σχηματική παρουσίαση των μικροοργανισμών που σχετίζονται με τα φυτά και την αποίκηση διαφορετικών οικολογικών θώκων επάνω και μέσα στους φυτικούς ιστούς. Οι επιβλαβείς αλληλεπιδράσεις επηρεάζουν την ανάπτυξη των φυτών μέσω παθογόνων δράσεων (αριστερά), ενώ ωφέλιμες αλληλεπιδράσεις προάγουν την ανάπτυξη των φυτών (δεξιά). Εικόνα από το άρθρο των Shelake και συνεργατών (2019).

Το φυτό φαίνεται να είναι ένας μετα-οργανισμός (meta-organism), καθώς διαφορετικά φυτικά μέρη αντιπροσωπεύουν διακριτά μικροβιακά ενδιαίτηματα, με διαφορετική μικροβιακή σύσταση (Vryzas, 2016; Deyett & Rolshausen, 2020; Dastogeer et al., 2020). Έχει αποδειχθεί πως η αφθονία και η ποικιλία των μικροοργανισμών είναι μεγαλύτερη στα υπόγεια τμήματα του φυτού (Wang et al., 2020c). Η ριζόσφαιρα ορίζεται ως η στενή περιοχή του εδάφους που είναι προσκολλημένη στις ρίζες και επηρεάζεται από τα ριζικά εκκρίματα, ενώ είναι σημείο όπου παρατηρείται έντονη μικροβιακή δραστηριότητα (Bakker et al., 2013; Mendes et al., 2013). Η ριζόσφαιρα είναι η κύρια πηγή μικροβίων για τα φυτά, τα οποία στη συνέχεια μπορούν να αποικίσουν την επιφάνεια και την ενδόσφαιρα της ρίζας και να μεταφερθούν στα υπέργεια φυτικά τμήματα, ωστόσο πηγή μικροβίων αποτελούν και η ατμόσφαιρα και τα σπέρματα (Bergna et al., 2018; Dong et al., 2019; Dastogeer et al., 2020; Deyett & Rolshausen, 2020). Το φαινόμενο της συγκέντρωσης μεγάλων πληθυσμών μικροβίων στο έδαφος γύρω από τις ρίζες των φυτών σε σύγκριση με το υπόλοιπο έδαφος είναι γνωστό ως «η επίδραση της ριζόσφαιρας (the rhizosphere effect)» (Bakker et al., 2013).

Η σύσταση των μικροβίων επηρεάζεται από περιβαλλοντικές συνθήκες, όπως το pH και η αλατότητα του εδάφους, η οργανική ουσία του εδάφους, οι καλλιεργητικές πρακτικές, η θερμοκρασία, η UV ακτινοβολία, αλλά και από βιοτικούς παράγοντες, όπως η παρουσία ανταγωνιστικών μικροοργανισμών και φυτοπαθογόνων (**Εικόνα 1.3**) (Philippot et al., 2013; Compant et al., 2019; Dastogeer et al., 2020; de Souza et al., 2020; Santoyo et al., 2021). Άλλοι παράγοντες που επηρεάζουν είναι η ηλικία των φυτών, το αναπτυξιακό στάδιο, οι καλλιεργητικές πρακτικές και οι εφαρμογές φυτοπροστατευτικών προϊόντων (**Εικόνα 1.3**) (Estendorfer et al., 2017; Cernava et al., 2019; de Souza et al., 2020). Οι ρίζες εκκρίνουν 10-44% του άνθρακα που προέρχεται από τη φωτοσύνθεση στη ριζόσφαιρα με τη μορφή οργανικών ενώσεων χαμηλού μοριακού βάρους όπως αμινοξέα, λιπαρά οξέα, φαινολικά, σάκχαρα και βιταμίνες, αλλά και υψηλού μοριακού βάρους, όπως βλενωδείς εκκρίσεις

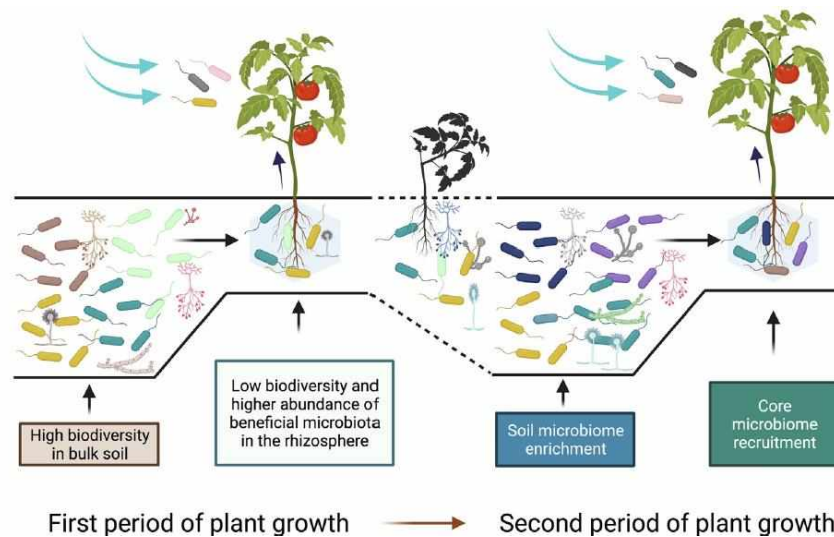
και πρωτεΐνες που χρησιμεύουν ως προσελκυστικές ενώσεις για τους μικροοργανισμούς (Zhalnina et al., 2018). Έτσι, ο γενότυπος του φυτού επηρεάζει τη μικροβιακή σύσταση λόγω των διαφορετικών ουσιών που μπορεί να εκκριθούν και της κατ'επέκταση προσέλκυσης διαφορετικών μικροοργανισμών (Beauregard et al., 2013; Dastogeer et al., 2020).



Εικόνα 1.3 Μια απλή σχηματική αναπαράσταση διάφορων παραγόντων που διαπλάθουν τις μικροβιακές κοινότητες. Το φυτό-ξενιστής, οι αλληλεπιδράσεις των μικροβίων και το περιβάλλον είναι παράγοντες που συνδέονται μεταξύ τους και συμβάλλουν στη σύσταση των μικροβιακών κοινοτήτων. Εικόνα από το άρθρο των Dastogeer και συνεργατών (2020).

Ειδικότερα, έχει παρατηρηθεί πως τα φυτά στρατολογούν συγκεκριμένους επιθυμητούς μικροοργανισμούς από το περιβάλλον τους σε συγκεκριμένες χρονικές στιγμές, ανάλογα με τις ανάγκες τους, μέσω προσαρμογής των ριζικών εκκρίσεων (Εικόνα 1.4) (Corral-Lugo et al., 2016; Berendsen et al., 2018; Bergna et al., 2018; Santoyo, 2021). Για παράδειγμα, η έκκριση μηλικού οξέος (L-malic acid) από τις ρίζες *Arabidopsis* εμπλέκεται στην προσέλκυση του *Bacillus subtilis* FB17 (Rudrappa et al., 2008), η έκκριση σουκρόζης βοηθά στην αποίκιση της ριζόσφαιρας από το στέλεχος *B. subtilis* (Tian et al., 2021), ενώ φυτά *Eruca sativa* επάγουν την παραγωγή του αντιβιοτικού Bacillaene από το στέλεχος *B. subtilis* NCIB 3610 παρουσία παθογόνου βακτηρίου (Ogran et al., 2021). Ακόμη, μόλυνση ζαχαρότευτλων από το μύκητα *Rhizoctonia solani* είχε ως αποτέλεσμα τη προσέλκυση συγκεκριμένων ενδόφυτων για την καταπολέμηση της ασθένειας (Carrión et al., 2019). Κάτι παρόμοιο ισχύει και σε περιπτώσεις μόλυνσης των φύλλων από παθογόνα, γεγονός το οποίο μπορεί να οδηγήσει σε ωφέλιμες αλλαγές στη σύσταση των ριζοσφαιρικών μικροβίων, προστατεύοντας την επόμενη γενιά φυτών (soil borne legacy) (Berendsen et al., 2018).

Οι μικροοργανισμοί που συνδέονται με ένα φυτικό είδος ανεξάρτητα από τις περιβαλλοντικές και άλλες συνθήκες ορίζονται ως κεντρικό μικροβίωμα (core microbiome), ενώ τα μικρόβια που επηρεάζονται και από τις εξωτερικές συνθήκες ονομάζονται δορυφορικό μικροβίωμα (satellite microbiome) (Toju et al., 2018; Compant et al., 2019).



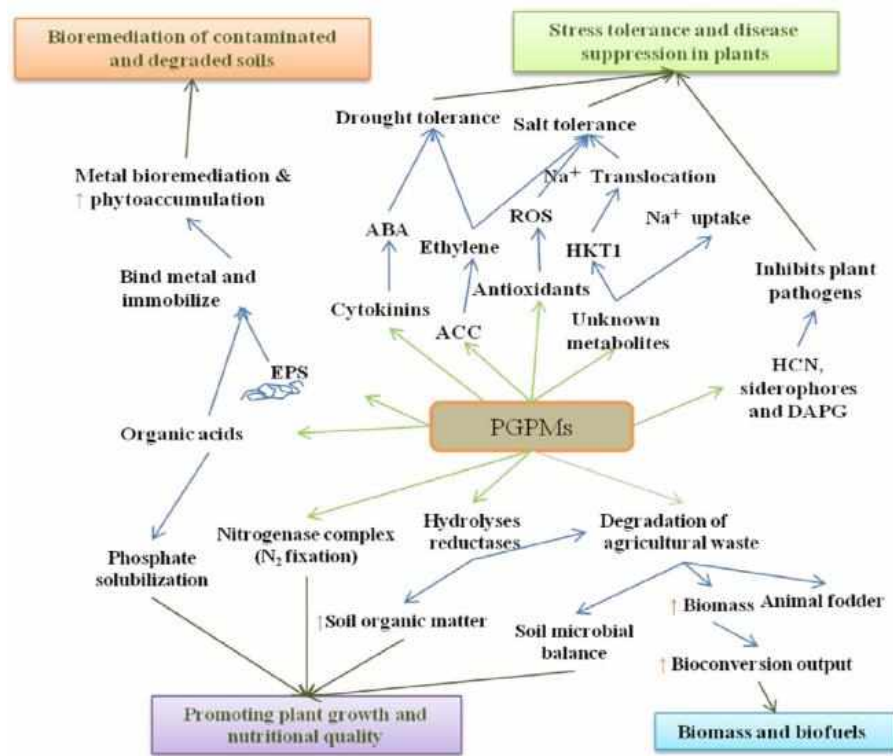
Εικόνα 1.4 Προσέλκυση φυτικού μικροβιώματος σε δύο στάδια της φυτικής ανάπτυξης σε ένα πιθανό υποθετικό γεωργικό οικοσύστημα. Αρχικά, η ποικιλομορφία του εδάφους (bulk soil) είναι υψηλή, ωστόσο η φύτευση σπόρων προωθεί τη προσέλκυση ενός ωφέλιμου μικροβιώματος που μπορεί να περιέχει λίγες ταξινομημένες μονάδες μειώνοντας τη βιοποικιλότητα. Τα στρατολογημένα μικρόβια μπορούν επίσης να αποικίσουν την ενδόσφαιρα και να ταξιδέψουν σε άλλους φυτικούς ιστούς, όπως τα αναερόβια τμήματα. Η φυλλόσφαιρα επίσης μπορεί να προσελκύσει μικρόβια. Μετά το πέρας της πρώτης καλλιεργητικής περιόδου, το έδαφος μπορεί να επανακτήσει τη βιοποικιλότητα μέσω της εισροής οργανικής ουσίας, της αμειψισποράς κ.α. Στη δεύτερη καλλιεργητική περίοδο το φυτό μπορεί να έχει ένα μικροβίωμα που απαρτίζεται από ενδοφυτικά βακτήρια που κληρονομήθηκαν με οριζόντιο τρόπο και έχουν αναπτύξει μακροχρόνιες σχέσεις ή είναι μέρος του κεντρικού μικροβιώματος του φυτού. Επιπλέον, το φυτό μπορεί να προσελκύσει και άλλα μέλη της ριζόσφαιρας και φυλλόσφαιρας. Εικόνα από το άρθρο του Santoyo (2021).

1.3.2 Μικροοργανισμοί που προωθούν την ανάπτυξη των φυτών

Οι μικροοργανισμοί που σχετίζονται με τα φυτά και μπορούν να προωθούν την ανάπτυξη των φυτών άμεσα ή/και έμμεσα ονομάζονται μικροοργανισμοί που προωθούν την ανάπτυξη των φυτών (Plant growth promoting microorganisms-PGPMs) ή προβιοτικά των φυτών (Plant Probiotics, PP) (Berlec et al., 2012). Η υποκατηγορία που αφορά τα βακτήρια που προωθούν την ανάπτυξη των φυτών ονομάζεται Plant Growth Promoting Bacteria (PGPB) και των ενδοφυτικών βακτηρίων ονομάζεται Plant Growth Promoting Endophytic Bacteria (PGPEB) (Santoyo et al., 2016). Αυτοί οι μικροοργανισμοί μπορεί να δρουν άμεσα στην προώθηση της ανάπτυξης ως βιολιπάσματα (biofertilizers) και φυτοδιεγέρτες (phytostimulants) ή/και έμμεσα ως παράγοντες βιολογικής αντιμετώπισης (biological control agents) ή αλλιώς βιοπαρασιτοκτόνα (biopesticides) (Gouda et al., 2018). Με τη δράση τους μπορούν να βελτιώσουν την αρχιτεκτονική της ρίζας, την πρόσληψη θρεπτικών στοιχείων, καθώς και να προστατεύσουν από αβιοτικές ή βιοτικές καταπονήσεις (Santoyo et al., 2021). Η χρήση αυτών των προβιοτικών δε βελτιώνει μόνο την απόδοση της καλλιέργειας, αλλά και την ποιότητα και το θρεπτικό περιεχόμενο των δημητριακών, καρπών, λαχανικών ή άλλων προϊόντων που προέρχονται από καλλιέργεια με αυτού του τύπου μεταχείριση (Jiménez-Gómez et al., 2017; Castiglione et al., 2021), ενώ υπάρχουν μικροοργανισμοί που βοηθούν στη Βιονίσχυση (Biofortification), δηλαδή ενισχύουν την καλλιέργεια με απαραίτητα για τον άνθρωπο ιχνοστοιχεία (Khan et al., 2019).

Οι PGPM μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε πολλαπλές πρακτικές της γεωργίας βοηθώντας στην προώθηση της ανάπτυξης των φυτών, είτε καλλιεργούμενων, είτε καλλωπιστικών, είτε

χρησιμοποιούμενων για βιομάζα και βιοκαύσιμα, στη βιολογική αντιμετώπιση εχθρών και ασθενειών των φυτών, στην αύξηση της αντοχής σε αβιοτική καταπόνηση, καθώς και στην βιοαποκατάσταση εδαφών με βαρέα μέταλλα αλλά και βελτίωση υποβαθμισμένων εδαφών (Εικόνα 1.5) (Syed et al., 2019).



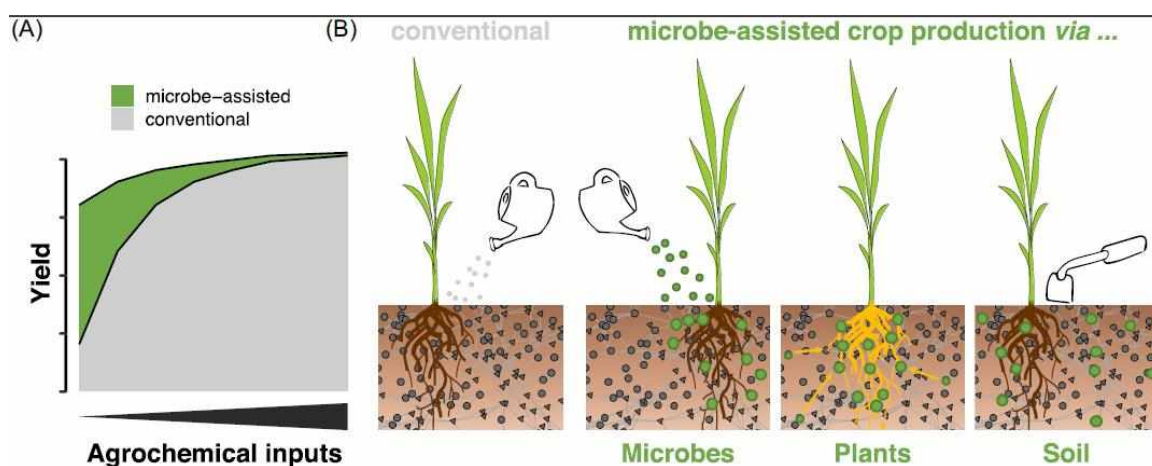
Εικόνα 1.5 Πιθανές εφαρμογές των μικροοργανισμών που προάγουν την ανάπτυξη των φυτών (Plant Growth Promoting Microorganisms, PGPMs) (Syed et al., 2019).

Ο Lorentz Hiltner δήλωσε το 1904: «Είμαι πεπεισμένος ότι η βακτηριολογία του εδάφους εν τέλει θα προσφέρει αποτελέσματα που δεν θα είναι μόνο επεξηγηματικής φύσης, αλλά θα επηρεάσουν άμεσα τη γεωργική πρακτική³» (Hartmann et al., 2008). Έχει αναφερθεί πως η γεωργία του 21^{ου} αιώνα θα περιλαμβάνει ενσωμάτωση των φυτικών μικροβιωμάτων στη γεωργική πρακτική για βελτιωμένη παραγωγή καλλιεργειών και ασφάλεια τροφίμων (Sessitch & Mitter, 2015), η οποία θα μπορούσε να οδηγήσει σε μία νέα επανάσταση, τη «Φρέσκια» Πράσινη Επανάσταση (Fresh Green Revolution), ή Bio-Επανάσταση (Bio-Revolution) όπου θα υπάρχουν λιγότερες χημικές εισροές (Backer et al., 2018). Η επιστημονική κοινότητα επενδύει στη διερεύνηση της κατανόησης του φυτικού μικροβιώματος και των αλληλεπιδράσεων του με τον ξενιστή και το περιβάλλον ώστε να γίνει η εκμετάλλευσή του στα γεωργικά συστήματα, εισάγοντας έννοιες όπως μικροβιακά-υποβοηθούμενα γεωργικά συστήματα (microbe-assisted agricultural systems) και μηχανική φυτικού μικροβιώματος (plant microbiome engineering) (del Carmen Orozco-Mosqueda et al., 2018; Compant et al., 2019; Bakker et al., 2020).

Έτσι, αντί της αλλαγής του γονιδιώματος των φυτών, μπορεί να μεταβληθεί το μικροβίωμά τους ανάλογα με τις εκάστοτε ανάγκες την κάθε χρονική στιγμή με μία προσαρμοσμένη μεταφορά ή

³ “However, I am convinced that soil bacteriology will finally provide results that are not only of explanatory nature, but will also directly affect and determine agricultural practice”

αλλαγή της αναλογίας των μικροβίων (Sessitch et al., 2019; Bakker et al., 2020). Εισαγωγή επιθυμητού μικροβιώματος ή ενώσεων αυτών μπορεί να πραγματοποιηθεί με τη μορφή εμβολίου (inoculant) στην περιοχή της ριζόσφαιρας, του σπόρου ή της φυλλόσφαιρας, ενώ μπορεί να πραγματοποιηθεί και εντοπισμένη επέμβαση στη σύσταση του φυτικού μικροβιώματος μέσω άλλων τεχνικών, όπως η χρήση συγκεκριμένης καλλιεργητικής πρακτικής (Εικόνα 1.6) (Sessitch et al., 2019; Hohmann et al., 2020; Basu et al., 2021).



Εικόνα 1.6 Προσεγγίσεις της φυτικής παραγωγής με τη βοήθεια μικροβίων. Α) Απόδοση καλλιεργειών ως αποτέλεσμα των αγροχημικών εισροών. Η συμβατική παραγωγή καλλιέργειας (γκρι) βασίζεται σε αγροχημικές εισροές όπως τα λιπάσματα και τα φυτοφάρμακα. Φυτική παραγωγή με τη βοήθεια μικροοργανισμών (πράσινο) όπου διατηρείται η απόδοση με μειωμένες αγροχημικές εισροές. Β) Η συμβατική γεωργία συγκρίνεται με την παραγωγή υποβοηθούμενη από μικρόβια, όπου τρεις παράμετροι του αγρο-οικοσυστήματος μπορούν να υποστούν μεταχειρήσεις με ωφέλιμα μικρόβια (πράσινες κουκίδες) ώστε να υποβοηθηθεί η παραγωγή. Ωφέλιμα μικρόβια ή τα προϊόντα τους προστίθενται στο έδαφος ή στα φυτά/σπόρους (μικροβιακοί εμβολιασμοί). Συγκεκριμένα φυτικά είδη ή ποικιλίες προσελκύουν ωφέλιμους μικροοργανισμούς από το περιβάλλον έδαφος. Ειδικές πρακτικές μεταχείρισης του εδάφους δημιουργούν ευνοϊκές συνθήκες για ωφέλιμους μικροοργανισμούς. Εικόνα από το άρθρο των Hohmann και συνεργατών (2020).

Πέραν των άμεσων θετικών επιδράσεων στα καλλιεργούμενα φυτά από την εφαρμογή ωφέλιμων μικροβίων, επιθυμητές λειτουργίες μπορούν να μεταβιβαστούν στην επόμενη γενιά φυτών είτε ως απόρροια τροποποίησης του φυτικού γενώματος από τη δράση των ωφέλιμων μικροβίων (Gkizi et al., 2021a), είτε ως απόρροια της κατακόρυφης διάδοσης ωφέλιμων μικροβίων μέσω των σπερμάτων (Truyens et al., 2015), είτε ως απόρροια στρατολόγησης ωφέλιμων μικροβίων στο έδαφος που παραμένουν κατά τη δεύτερη γενιά των φυτών (Berendsen et al., 2018).

Παρ'όλο που τα PGPB συμπεριλαμβάνουν είδη από διάφορα γένη, η έρευνα στρέφεται κυρίως προς συγκεκριμένα είδη που δείχνουν αυξημένες δυνατότητες ως βιολιπάσματα ή/και ως παράγοντες βιολογικής αντιμετώπισης, όπως είναι στελέχη των γενών *Bacillus*, *Pseudomonas* και *Azotobacter* (Vacheron et al., 2013). Η εξέλιξη στη μελέτη των αλληλεπιδράσεων φυτού-μικροοργανισμών, στη γενετική, τη βιοχημεία και την οικολογία έχει οδηγήσει στην ανάπτυξη και εμπορευματοποίηση αποτελεσματικών ωφέλιμων μικροβιακών στελεχών (Adesemoye & Kloepper, 2009; Sessitsch & Mitter, 2015; Busby et al., 2017). Οι μικροοργανισμοί που έχουν αναπτυχθεί περισσότερο ως βιοπαρασιτοκτόνα και χρησιμοποιούνται στο πεδίο, ανήκουν στο γένος *Bacillus*, λόγω του ότι παράγουν σπόρια ανθεκτικά στη θερμότητα και την αφυδάτωση και είναι πιο διαχειρίσιμα στην ανάπτυξη σκευασμάτων (Πίνακας 1.1).

Πίνακας 1.1 Παραδείγματα βακτηριακών στελεχών που αποτελούν συστατικά εμπορικών σκευασμάτων και χρησιμοποιούνται εναντίον μυκήτων, βακτηρίων ή νηματωδών μέσω εφαρμογών στο έδαφος, τα φύλλα ή τους σπόρους.

Στέλεχος	Σκεύασμα	Εταιρία
<i>Pseudomonas syringae</i>	Bio-Save® 10 LP	Jet Harvest Solutions
<i>Bacillus velezensis</i> QST 713	Serenade Max®	Bayer, formerly BASF
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Amylo-X®	Biogard CBC
<i>Bacillus subtilis</i> GB03	Companion®	Growth products
<i>Pseudomonas syringae</i>	Bio-Save®	Jet harvest solutions
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> D 747	Double Nickel 55WDG/LC™	Certis
<i>Bacillus subtilis</i> IK-1080	Botokira Wettable Powder®	Idemitsu Kosan Inc.
<i>Bacillus megaterium</i>	BioArc®	Sphere Bio-Arc PVT Ltd
<i>Bacillus subtilis</i> MBI600	Subtilex®	Bayer
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> MBI600	Serifel	Bayer
<i>Bacillus velezensis</i> FZB24	Taegro®	Novozymes and Syngenta
<i>Bacillus firmus</i> I-1582	VOTiVO	BASF
<i>Bacillus pumilus</i>	Ballad	AgraQuest
<i>Bacillus pumilus</i>	Sonata	Bayer
<i>Bacillus pumilus</i> GB34	Yield Shield	Bayer
<i>Bacillus velezensis</i> GB03	Kodiak	Gustafson LLC
<i>Bacillus mycoides</i> isolate J	Lifegard WG	Certis

Η Ευρωπαϊκή Αρχή για την Ασφάλεια των Τροφίμων (European Food Safety Authority, EFSA), και συγκεκριμένα το τμήμα των βιολογικών κινδύνων (Panel on Biological Hazards) συστήνει την εφαρμογή της αλληλούχισης ολόκληρου του γονιδιώματος για ξεκάθαρη ταυτοποίηση των στελεχών που χρησιμοποιούνται ως παράγοντες βιολογικής καταπολέμησης. Θεωρείται πλέον κανόνας η σωστή ταξινόμηση των μικροβίων που χρησιμοποιούνται σε σκευάσματα ή σε μελέτες με δοκιμές μικροβίων από την πρώτη μελέτη όπου αναφέρονται, ωστόσο δε συμβαίνει πάντα (Bashan et al., 2016; Menéndez & Paço, 2020).

Τα είδη του γένους *Bacillus*, αρχικά χωρίζονταν σε δύο ομάδες, την ομάδα *B.cereus* και την ομάδα *B. subtilis* όπου έκαστη ομάδα περιείχε τα συγγενέστερα είδη *Bacillus* κατηγοριοποιημένα σε υποομάδες-κλάδους (Mandic-Mulec et al., 2015). Η διαφοροποίηση μεταξύ των στελεχών των κλάδων αλλά και των ειδών μεταξύ τους ήταν δύσκολη καθώς η φυλογενετική ανάλυση του 16S rRNA γονιδίου δεν είναι αρκετή λόγω της υψηλής συντήρησης του γονιδίου και της παρουσίας πολλαπλών αντιγράφων (Rooney et al., 2009; Koul et al., 2016). Πρόσφατες έρευνες έχουν δείξει πως η χρήση ενός μόνο γονιδίου ή ομάδας γονιδίων δεν αντικατοπτρίζει τις ακριβείς φυλογενετικές σχέσεις, καθώς δεν λαμβάνεται υπ' όψιν το ορθόλογο (orthologous) και το βοηθητικό (accessory) γενετικό περιεχόμενο, με αποτέλεσμα ορθότερη μέθοδος να θεωρείται η αλληλούχιση του ολικού γονιδιώματος ενός οργανισμού (Mahato et al., 2017; Chun et al., 2018).

Σύγκριση των γονιδιωμάτων 2116 στελεχών του *B. cereus* group αποκάλυψε 57 genomospecies (είδη βασισμένα μόνο σε ανάλυση DNA), εκ των οποίων 37 ήταν νέα, υποδεικνύοντας την ανάγκη για αναθεώρηση, ενώ αντίστοιχες μελέτες και προτάσεις έχουν προκαλέσει σύγχυση στην επιστημονική κοινότητα (Manno et al., 2020). Η ομάδα *B. cereus* περιέχει είδη όπως είναι τα *B. antracis*, *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B.mycoides*, *B. weidmannii* και άλλα. Τα είδη *B. mycoides* και *B. weihenstephanensis* θεωρούνταν διαφορετικά είδη του ίδιου κλάδου, ενώ πρόσφατα προτάθηκε η συγχώνευση όλων των

στελεχών στο είδος *B. mycoides* (Liu & Shao, 2018). Το σύμπλεγμα *B. subtilis* πλέον αποτελείται από τέσσερις μονοφυλετικές ομάδες (groups): το *B. subtilis* group (Clade I), το οποίο περιέχει και το είδος *B. halotolerans*, το *B. amyloliquefaciens* group (Clade II), το *B. licheniformis* group (Clade III), *B. pumilus* group (Clade IV) (Fan et al., 2017). Ακόμη, έγινε σαφές πως τα είδη *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum*, όπως το γνωστό στέλεχος FZB42, *Bacillus methylophilus* και *Bacillus oryzicola* είναι μεταγενέστερα ετεροτυπικά συνώνυμα (later heterotypic synonyms) του είδους *B. velezensis* (Dunlap et al., 2016b). Έτσι, πολλά στελέχη σχετιζόμενα με φυτά τα οποία είχαν ταξινομηθεί ως *B. amyloliquefaciens* ή *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum*, όπως το γνωστό στέλεχος FZB42, φαίνεται να ανήκουν στο είδος *B. velezensis*, με πρότυπο στέλεχος το KCTC13012. Γίνεται προσπάθεια να αλλάξει η ονοματολογία τους στις βάσεις δεδομένων, καθώς πολλές δημοσιεύσεις μέχρι και σήμερα ονοματίζουν κοντινά στελέχη του *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* ως *B. amyloliquefaciens*. Ακόμη, πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι κάποια στελέχη που είχαν καταχωρηθεί ως *B. subtilis* ή *B. amyloliquefaciens* ανήκουν στην πραγματικότητα στο είδος *B. velezensis* (Palazzini et al., 2016; Fan et al., 2017; Calvo et al., 2019; Mullins et al., 2020), κι έτσι έχουν μετονομαστεί και στελέχη που περιείχονταν σε σκευάσματα όπως το Kodiak® και το Serenade® (Fazole Rabbee & Baek, 2020). Τα είδη *B. velezensis*, *B. siamensis* και *B. amyloliquefaciens* θεωρούνται κλάδος εντός της ομάδας *B. subtilis* και έχει προταθεί να θεωρηθούν μια ταξινομική ομάδα πάνω από το είδος, ονομασμένη ως λειτουργική ομάδα του κλάδου *B. amyloliquefaciens* (*B. amyloliquefaciens* operational group) (Fan et al., 2017). Το γένωμα των στελεχών του είδους *B. velezensis* είναι περισσότερο εμπλουτισμένο με γονίδια που αφορούν δευτερογενείς μεταβολίτες από ότι των ειδών *B. siamensis* και *B. amyloliquefaciens* (Zeng et al., 2021). Ομοίως, στελέχη που είχαν ταξινομηθεί ως *Bacillus malacitensis* και *Bacillus axarquiensis* είναι συνώνυμα του είδους *Brevibacterium halotolerans* (Dunlap et al., 2016b), το οποίο αργότερα μετονομάστηκε σε *Bacillus halotolerans* (Ben-Gad & Gerchman, 2017). Ακόμη, τα υποείδη *B. subtilis* subsp. *inaquorosum* και *B. subtilis* subsp. *spizizenii* θεωρούνται πλέον ξεχωριστά είδη (Dunlap et al., 2020), ενώ στελέχη του κλάδου *B. pumilus* έχουν επίσης υποστεί εσφαλμένη ταξινόμηση (Espariz et al., 2016).

1.4 Άμεσοι μηχανισμοί προώθησης της ανάπτυξης των φυτών

Άμεσοι μηχανισμοί προώθησης της ανάπτυξης των φυτών από τα PGPB θεωρούνται εκείνοι οι μηχανισμοί που βοηθούν την ομαλή λειτουργία και αύξηση της βιομάζας του φυτού, όπως είναι η παραγωγή ρυθμιστών της ανάπτυξης του φυτού ή η ρύθμιση των ενδογενών επιπέδων τους, η αύξηση της βιοδιαθεσιμότητας των θρεπτικών στοιχείων και η προστασία από αβιοτικές καταπονήσεις (Backer et al., 2018; Gouda et al., 2018; Kumar et al., 2019).

1.4.1 Φυτοδιέγερση (Phytostimulation)

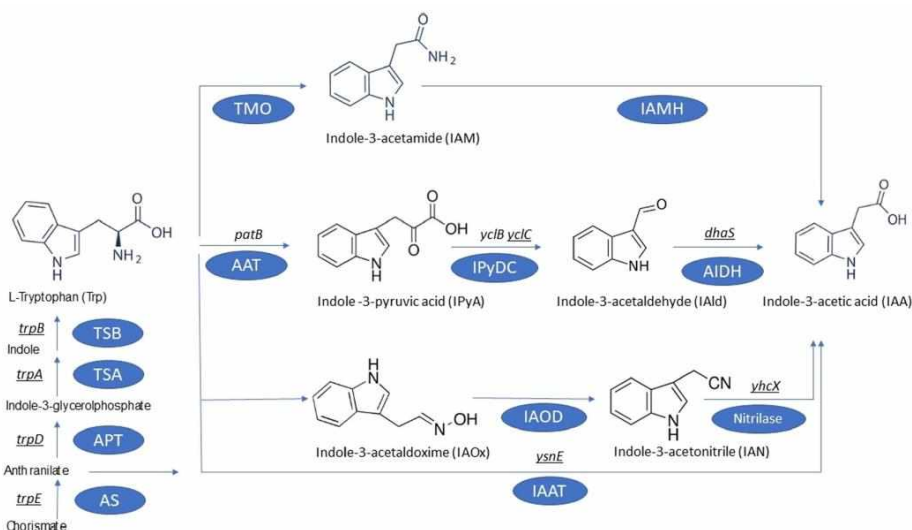
Η Φυτοδιέγερση (Phytostimulation) ή Βιοδιέγερση (Biostimulation) είναι η αύξηση της βιομάζας του φυτού που επιτυγχάνεται από τα PGPB είτε μέσω της μεταβολής των ενδογενών επιπέδων ρυθμιστών της φυτικής ανάπτυξης, όπως οι φυτοορμόνες, είτε μέσω της παραγωγής τους από τα PGPB (Vacheron et al., 2013; Baldan et al., 2015; Gouda et al., 2018). Οι κύριοι ρυθμιστές της ανάπτυξης των φυτών είναι οι φυτικές ορμόνες, όπως αυξίνη, αιθυλένιο, κυτοκινίνες, γιββερελλίνες και αμπισικό οξύ (Gouda et al., 2018). Για παράδειγμα, τα PGPB μπορούν να μειώσουν τα επίπεδα αιθυλενίου του φυτού παράγοντας το ένζυμο ACC απαμινάση (ACC deaminase), το οποίο διασπά το πρόδρομο μόριο του αιθυλενίου, ACC (1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid), σε α -κετοβουτυρικό οξύ και αμμωνία, με αποτέλεσμα την ελάττωση της εκάστοτε καταπόνησης (Glick, 2014; Gupta & Pandey, 2019; Zarei et al., 2020).

Τα ριζικά εκκρίματα περιέχουν ενώσεις χαμηλού μοριακού βάρους που χρησιμεύουν στα PGPB ως πρόδρομες ενώσεις για τη σύνθεση φυτικών ορμονών. Για παράδειγμα, το αμινοξύ τρυπτοφάνη είναι το πρόδρομο μόριο για τη βιοσύνθεση της αυξίνης ινδολοξικό οξύ και βρίσκεται συνήθως συγκεντρωμένο στο άκρο της ρίζας (el Zahar Haichar et al., 2014). Η αυξίνη ινδολοξικό οξύ (IAA) είναι η κύρια φυτοορμόνη που ρυθμίζει τη φυτική αύξηση και ανάπτυξη (Zhao, 2018), ενώ αρκετοί μικροοργανισμοί μπορούν να τη συνθέσουν και να τη χρησιμοποιήσουν ως ρυθμιστή έκφρασης διάφορων γονιδίων (Bianco et al., 2006; Matilla et al., 2018). Η σύνθεση της στα βακτήρια επάγεται από την παρουσία των ριζικών εκκριμάτων και κατά τη διάρκεια της αποίκησης φυτικών επιφανειών (Patten et al., 2013).

Η παραγωγή φυτικών ορμονών από τα PGPB, ειδικότερα των αυξινών, βοηθά στην αύξηση της υπέρχειας βιομάζας του φυτού, αλλά και στην μεταβολή του ριζικού συστήματος (Sukumar et al., 2013; Vacheron et al., 2013). Η αρχιτεκτονική του ριζικού συστήματος (root system architecture, RSA) προσδιορίζεται από την αύξηση της κεντρικής ρίζας, το σχηματισμό πλευρικών ριζών (βαθμός διακλάδωσης), καθώς και το σχηματισμό ριζικών τριχιδίων (Vacheron et al., 2013; Verbon & Liberman, 2016). Η μετα-εμβρυονική ριζική ανάπτυξη ελέγχεται από κυτταρικές διαιρέσεις στη μεριστωματική ζώνη, την αύξηση μεγέθους των κυττάρων στη ζώνη επιμήκυνσης και λειτουργική διαφοροποίηση σε εξειδικευμένους κυτταρικούς τύπους στη ζώνη διαφοροποίησης της ρίζας (Zamioudis et al., 2013). Τα PGPB μπορούν να αυξήσουν τον αριθμό και το μήκος των πλευρικών ριζών και των ριζικών τριχιδίων, γεγονός που βοηθά στην σταθερότητα της ρίζας στο έδαφος και την αύξηση της ικανότητας εξερεύνησης για νερό και θρεπτικά, ιδιαίτερα σημαντικό σε συνθήκες ξηρασίας, αλατότητας ή έλλειψης θρεπτικών (Verbon & Liberman, 2016).

Οι αυξίνες έχουν την ικανότητα να επηρεάζουν πρακτικά όλες τις φυσιολογικές λειτουργίες των φυτών, όπως την κυτταρική επιμήκυνση και διαίρεση και τη ριζοβολία, ενώ επηρεάζουν και τη δραστηριότητα των υπόλοιπων ορμονών. Το IAA είναι η κύρια φυσικά παραγόμενη ορμόνη που μπορεί να παραχθεί από βακτήρια (Etesami et al., 2015). Στις περισσότερες περιπτώσεις το αμινοξύ

τρυπτοφάνη (Trp) χρησιμεύει ως πρόδρομο μόριο στη σύνθεση του IAA (Spraeren et al., 2007). Η βιοσύνθεση του IAA στα βακτήρια περιλαμβάνει τέσσερα μονοπάτια εξαρτώμενα από την Trp, το μονοπάτι indole-3-acetamide (IAM), indole-3-pyruvic acid (IPyA), tryptamine (TAM ή TRAM), indole-3-acetonitrile (IAN) καθώς και ένα μονοπάτι ανεξάρτητο από την παρουσία τρυπτοφάνης (Εικόνα 1.7) (Keswani et al., 2020). Φαίνεται πως το μονοπάτι IAN είναι ειδικό για τα θετικά κατά Gram βακτήρια, ενώ το TAM συναντάται μόνο σε αρνητικά κατά Gram βακτήρια (Keswani et al., 2020). Περισσότερα από ένα μονοπάτι μπορεί να είναι ενεργά σε ένα βακτηριακό στέλεχος. Στο βακτηριακό στέλεχος *B. velezensis* FZB42 η σύνθεση του IAA παρεμποδίστηκε όταν απενεργοποιήθηκε το γονίδιο *ysnE*, προϊόν του οποίου είναι μία πρωτεΐνη με επικράτεια N-ακετυλοτρανσφεράσης. Λόγω της ομοιότητάς του με την ακετυλοτρανσφεράση του IAA (IAAT), υποτέθηκε πως το ένζυμο μπορεί να εμπλέκεται στην μετατροπή της τρυπτοφάνης σε IAA, μέσω ενός άγνωστου μονοπατιού (Keswani et al., 2020).



Εικόνα 1.7 Απλοποιημένο σχήμα βιοσύνθεσης του ινδολοξικού οξέος στα θετικά κατά Gram PGPR. Εικόνα από το άρθρο των Keswani και συνεργατών (2020).

1.4.2 Βιολίπανση (Biofertilization)

Η βιολίπανση αναφέρεται στο όφελος της φυτικής ανάπτυξης λόγω αυξημένης διαθεσιμότητας των θρεπτικών με τη βοήθεια ωφέλιμων μικροοργανισμών (Baldan et al., 2015). Εκτός της αύξησης της επιφάνειας του ριζικού συστήματος, τα PGPB μπορούν να συνεισφέρουν στην καλύτερη πρόσληψη των θρεπτικών και με άλλους τρόπους. Μπορούν να αυξήσουν τη βιοδιαθεσιμότητα των θρεπτικών είτε άμεσα μέσω της αζωτοδέσμευσης, είτε έμμεσα μέσω δράσεων αποσυμπλοκοποίησης και διαλυτοποίησης θρεπτικών, επηρεάζοντας έτσι την αποδοτικότητα χρήσης θρεπτικών (nutrient use efficiency, NUE) (Pii et al., 2015; Jacoby et al., 2017). Τα βιολιπάσματα είναι υποκατηγορία των βιοδιεγερτών και περιλαμβάνουν τα προϊόντα που περιέχουν ζωντανά ή αδρανή μικρόβια (βακτήρια, ακτινομύκητες, μύκητες, φύκη) μεμονωμένα ή σε συνδυασμό που όταν εφαρμόζονται στο σπόρο ή το έδαφος έχουν αζωτοδεσμευτική δράση ή μπορούν να διαλυτοποιήσουν θρεπτικά του εδάφους, ίσως μαζί με την έκκριση ουσιών που προάγουν την ανάπτυξη των φυτών (Basu et al., 2021). Μεταξύ των

βασικών ανόργανων θρεπτικών στοιχείων που είναι απαραίτητα για τα φυτά, ο φώσφορος (P), το άζωτο (N) και ο σίδηρος (Fe) αντιπροσωπεύουν τους κύριους περιοριστικούς παράγοντες για την αποδοτικότητα των καλλιεργειών παγκοσμίως.

Ο σίδηρος στα φυτά είναι αναγκαίος ως συμπάραγοντας ενζύμων που συμμετέχουν σε βασικές λειτουργίες, όπως η σύνθεση του DNA, ενώ είναι απαραίτητος στη σύνθεση της χλωροφύλλης και τη λειτουργία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού (Ahmed & Holmström, 2014). Παρ'όλο που ο σίδηρος είναι άφθονος στα εδάφη, η βιοδιαθεσιμότητά του είναι χαμηλή, καθώς βρίσκεται κυρίως στην οξειδωμένη του μορφή (Fe^{3+}) που είναι μη διαθέσιμη σε ουδέτερο και βασικό pH, σχηματίζοντας αδιάλυτα οξείδια και υδροξείδια (π.χ. Fe_2O_3) και συμπλοκοποιείται με ομάδες οξυγόνου των χουμικών ουσιών (Colombo et al., 2014). Η έλλειψη σιδήρου είναι ιδιαίτερα έντονη σε ασβεστώδη εδάφη, που εκτιμάται πως αποτελούν το 1/3 της καλλιεργήσιμης γης (Briat et al., 2015). Η πιο κοινή πρακτική είναι η εφαρμογή χηλικών ενώσεων στο έδαφος, οι οποίες έχουν υψηλό κόστος και η χρήση τους περιορίζεται σε καλλιέργειες υψηλού κέρδους (Briat et al., 2015).

Πολλά μικρόβια εκκρίνουν σιδηροφόρα μόρια, χηλικές ενώσεις μικρού μοριακού βάρους, που έχουν μεγάλη συγγένεια για την πρόσδεση και ισχυρή συμπλοκοποίηση του τρισθενή σιδήρου, καθιστώντας τον βιοδιαθέσιμο για τα βακτήρια και τα φυτά (Ahmed & Holmström, 2014; Kramer et al., 2020). Τα φυτά στη συνέχεια μπορούν να αφομοιώσουν το σίδηρο μέσω πρόσληψης του συμπλόκου ή μέσω αντίδρασης ανταλλαγής μόνου προσδέτη (ligand) (Schmidt, 1999). Τα σιδηροφόρα μόρια διακρίνονται στους τύπους hydroxamate, catecholate ή carboxylate ανάλογα με την ένωση που συμπλοκοποιεί το σίδηρο (Ahmed & Holmström, 2014). Αυτές οι ενώσεις μπορούν να προσδέσουν και άλλα μέταλλα, όπως ψευδάργυρο, χαλκό, κάδμιο και αλουμίνιο (Kramer et al., 2020). Έχει αναφερθεί πως οι μικροοργανισμοί που παράγουν σιδηροφόρες ενώσεις μπορούν να αυξήσουν την πρόσληψη σιδήρου στα φυτά (Rana et al., 2012; Khalid et al., 2015; Liu D. et al., 2017).

Ο φώσφορος είναι απαραίτητος για τη σύνθεση των νουκλεϊκών οξέων, καθώς και την αποθήκευση και την κατανομή της ενέργειας των κυττάρων. Περίπου το 95% της συνολικής ποσότητας του φωσφόρου στο έδαφος καθίσταται αδιάλυτη μέσω συμπλοκοποίησης είτε με αλουμίνιο και σίδηρο στα όξινα εδάφη είτε με ασβέστιο στα βασικά εδάφη, πριν οι ρίζες το απορροφήσουν στη μορφή του ορθοφωσφορικού οξέος (Alori et al., 2017). Η κινητοποίηση του φωσφόρου, ποσοτικοποιημένη σε τιμές Olsen P, κυμαίνεται από 9 σε 49 mg kg⁻¹ (Recena et al., 2017).

Οι μικροοργανισμοί που μπορούν να προκαλέσουν διαλυτοποίηση του φωσφόρου ονομάζονται PSM (phosphate solubilizing microorganisms) και το επιτυγχάνουν μέσω της έκκρισης οργανικών και ανόργανων οξέων, σιδηροφόρων μορίων και πρωτονίων, με τα οργανικά οξέα να είναι ο κύριος τρόπος (Wei et al., 2018). Οι PSM μπορούν να παράγουν πληθώρα οργανικών οξέων, όπως οξικό, γλουκονικό, προπιονικό και κιτρικό οξύ, τα οποία βοηθούν στη μείωση του pH και έχουν ικανότητα συμπλοκοποίησης κατιόντων (Alori et al., 2017; Rafi et al., 2019; Prabhu et al., 2019). Η ανοργανοποίηση του οργανικού φωσφόρου, όπως είναι το φυτικό οξύ, επιτυγχάνεται μέσω όξινων φωσφατασών και φυτασών και αποτελεί τη βιοχημική ανοργανοποίηση (biochemical P-

mineralization), ενώ η απελευθέρωση φωσφόρου κατά τη διάρκεια διάσπασης οργανικών υποστρωμάτων ονομάζεται βιολογική ανοργανοποίηση (biological P- mineralization) (Sharma et al., 2013; Alori et al., 2017). Ικανότητα διαλυτοποίησης και ικανότητα ανοργανοποίησης φωσφόρου μπορεί να συνυπάρχουν ως επωφελή χαρακτηριστικά σε ένα βακτηριακό στέλεχος (Sharma et al., 2013).

Το άζωτο είναι απαραίτητο για τη βιοσύνθεση πολλών σημαντικών μορίων στα φυτά, όπως είναι τα νουκλεϊκά οξέα, η χλωροφύλλη και το ATP (Pirttilä et al., 2021). Τα περισσότερα φυτά μπορούν να προσλάβουν και να χρησιμοποιήσουν ανόργανες και οργανικές μορφές του αζώτου. Τα νιτρικά (NO_3^-) είναι η κύρια μορφή αζώτου που προσλαμβάνεται από τα φυτά, αλλά και το αμμώνιο NH_4^+ μπορεί να είναι σημαντικό, ειδικά σε μη καλλιεργούμενα εδάφη, ενώ και η ουρία μπορεί να χρησιμοποιηθεί από τα φυτά (Andrews et al., 2013). Μόνο το 30% των αζωτούχων ενώσεων που προστίθενται στις καλλιέργειες μπορεί να απορροφηθεί από τα φυτά, καθώς οι απώλειες του αζώτου μετά την εφαρμογή λιπασμάτων είναι μεγάλες λόγω της έκπλυσης (leaching) η οποία προκαλεί το φαινόμενο του ευτροφισμού, της πτητικοποίησης (volatilization) και απονιτροποίησης, κατά την οποία απελευθερώνεται αέρια του θερμοκηπίου (NO_x) (Robertson & Vitousek, 2009; Pirttilä et al., 2021). Η ουρία είναι ένα από τα πιο χρησιμοποιούμενα λιπάσματα παγκοσμίως, κυρίως λόγω του υψηλού περιεχόμενου σε άζωτο (46%), του σχετικά χαμηλού κόστους ανά μονάδα αζώτου, της υψηλής διαλυτότητας και της υψηλής πρόσληψης από τα φύλλα (Modolo et al., 2018). Ωστόσο, το ένζυμο ουρεάση που διαθέτουν πολλά μικρόβια του εδάφους καταλύει την υδρόλυση της ουρίας σε αμμωνία και καρβαμιδικό οξύ, το οποίο διασπάται περαιτέρω σε αμμωνία και διοξείδιο του άνθρακα, παράγοντας εν τέλει δύο μόρια αμμωνίας (NH_3) και ένα μόριο διοξειδίου του άνθρακα (CO_2). Κατά την παραμονή της ουρίας κοντά στην επιφάνεια του εδάφους, μπορεί να μετατραπεί σε αμμωνία από τη δράση των ουρεασών των μικροβίων και να διαφύγει στην ατμόσφαιρα ή να σχηματίσει οξείδιο του αζώτου που έχει χαρακτηριστεί ως αέριο του θερμοκηπίου (Modolo et al., 2018). Έτσι, κατά τη λίπανση με ουρία, χρησιμοποιούνται συνήθως παρεμποδιστές του ενζύμου ουρεάση, ώστε η ουρία να μετακινηθεί σε βαθύτερα στρώματα ακέραια, μέσω προγραμματισμένης άρδευσης ή βροχόπτωσης (Modolo et al., 2018). Εκεί, πραγματοποιείται η διάσπαση της ουρίας σε αμμωνία, η οποία μετατρέπεται σε αμμώνιο (NH_4^+) στο εδαφικό διάλυμα και μπορεί με τη σειρά του να υποστεί νιτροποίηση σε νιτρικά ιόντα (NO_3^-). Το αμμώνιο και τα νιτρικά ιόντα μπορούν να προσληφθούν από τις ρίζες των φυτών. Ωστόσο, μέρος των νιτρικών μπορεί και να εκπλυθεί προκαλώντας ευτροφισμό σε ποτάμια και λίμνες. Έτσι, φαίνεται πως ανάλογα με το αναπτυξιακό στάδιο του φυτού και τις καλλιεργητικές πρακτικές η ουρία είτε μπορεί να βοηθήσει το φυτό με τη γρήγορη προμήθεια απαραίτητου αζώτου, είτε μεγάλη ποσότητα του αζώτου να χαθεί στο περιβάλλον και να προκαλέσει περιβαλλοντική επιβάρυνση.

Τα PGPB μπορούν να αυξήσουν την απορρόφηση των αζωτούχων ενώσεων πριν την έκπλυσή τους, μέσω της βελτιστοποίησης της αρχιτεκτονικής της ρίζας, αυξάνοντας τη βιομάζα και τις διακλαδώσεις της ρίζας, ενώ κάποια είδη έχουν και δυνατότητα αζωτοδέσμευσης (Gouda et al., 2018). Ακόμη, έχει

αναφερθεί η αύξηση της δραστηριότητας των φυτικών ενζύμων μεταβολισμού αζώτου μετά την εφαρμογή PGPB (NRT2), που σε συνδυασμό με τις μορφολογικές αλλαγές του ριζικού συστήματος μπορεί να οδηγήσει σε βελτίωση της απορρόφησης νιτρικών από το φυτό και τη μείωση της ποσότητας αζωτούχων λιπασμάτων (Lee et al., 2020).

Η εφαρμογή των PGPB μπορεί να επηρεάσει θετικά τις φυτικές παραμέτρους που σχετίζονται με το νερό μέσω αύξησης του υδατικού δυναμικού των φύλλων (leaf water potential), το ρυθμό διαπνοής των φύλλων, την αγωγιμότητα των στομάτων και το σχετικό περιεχόμενο σε νερό (relative water content, RWC) που οδηγούν σε καλύτερη αποδοτικότητα αξιοποίησης του ύδατος (water use efficiency) (Castiglione et al., 2021).

1.5 Έμμεσοι μηχανισμοί προώθησης της ανάπτυξης των φυτών-Βιολογική αντιμετώπιση παθογόνων

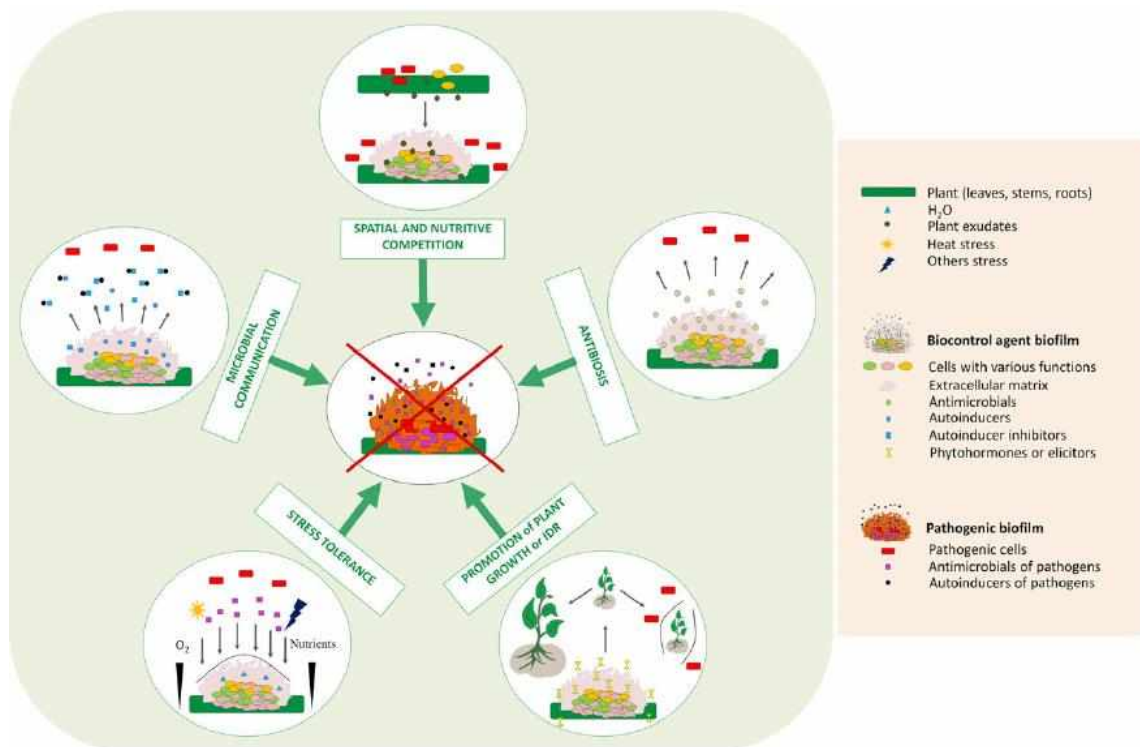
Τα PGPB μπορούν να καταπολεμήσουν φυτοπαθογόνους μικροοργανισμούς μέσω του ανταγωνισμού θέσης και πρόσληψης θρεπτικών συστατικών, παραγωγής λυτικών ενζύμων και αντιμικροβιακών ενώσεων, καθώς και μέσω επαγωγής της φυτικής άμυνας (Bolívar-Anillo et al., 2020; Morales-Cedeño et al., 2021; Oukala et al., 2021). Έτσι, αναφέρεται ότι το φυτικό μικροβίωμα διευρύνει την εγγενή ανοσία των φυτών και αποτελεί ένα επιπλέον επίπεδο άμυνας εναντίον των φυτοπαθογόνων (Teixeira et al., 2019), ενώ το μικροβίωμα συγκεκριμένα της ριζόσφαιρας αποτελεί την πρώτη γραμμή άμυνας του ξενιστή εναντίον εδαφογενών παθογόνων (Bakker et al., 2020).

1.5.1 Ανταγωνισμός για θέση και θρεπτικά

Τα σιδηροφόρα μόρια που εκκρίνονται από τους μικροοργανισμούς που προωθούν την ανάπτυξη των φυτών εμποδίζουν την πρόσληψη του απαραίτητου σιδήρου από τα φυτοπαθογόνα (Ahmed & Holmström, 2014; Hardoim et al., 2015). Αυτό συμβαίνει καθώς τα σιδηροφόρα που παράγουν τα φυτοπαθογόνα έχουν μικρότερη συγγένεια για το σίδηρο από τα σιδηροφόρα των ωφέλιμων μικροβίων (Baldan et al., 2015).

Χαρακτηριστικά των βακτηριακών στελεχών όπως η ταχεία ομαδική κίνηση σε επιφάνειες (swarming), η ταχεία κολυμβητική κίνηση (swimming) και ο σχηματισμός βιοϋμενίου (biofilm) βοηθούν την προσέγγιση και κάλυψη των επιφανειών από τα ωφέλιμα βακτήρια, μην αφήνοντας χώρο για αποικισμό από άλλους μικροοργανισμούς, ενώ παράλληλα καταναλώνουν και τα διαθέσιμα θρεπτικά στο σημείο κάλυψης (Hardoim et al., 2015). Στελέχη PGPB που δεν μπορούν να κινηθούν ομαδικά επιδεικνύουν μειωμένη επίβιωση και είναι λιγότερο ικανά να αποικίσουν τις ρίζες των φυτών (Amaya-Gomez et al., 2020). Ο σχηματισμός βιοϋμενίου θεωρείται ως ένας πολύ σημαντικός μηχανισμός ανταγωνισμού, καθώς δρα ως φυσικό και αλλά και χημικό εμπόδιο έναντι των παθογόνων, λόγω της παραγωγής αντιμικροβιακών ενώσεων (**Εικόνα 1.8**) (Haggag & Timmusk, 2008; Dietel et al., 2013; Herrera et al., 2016; Mousa et al., 2016; Ogran et al., 2018; Rieusset et al.,

2020). Η παρουσία των εξωπολυσακχαριτών (exopolysaccharides, EPS) ή των αμυλοειδών ινιδίων (amyloid fibers) πιθανώς βοηθάει στην προσκόλλησή τους τοπικά ώστε να μη διαχυθούν στο αχανές υδατικό περιβάλλον, γεγονός που ίσως αυξάνει τη δράση τους (Pandin et al., 2017). Η ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου φαίνεται να είναι σημαντική για την αντιμετώπιση φυτοπαθογόνων μικροοργανισμών, ωστόσο δε λαμβάνεται συχνά υπ' όψιν, κι έτσι προτείνεται η διερεύνηση αυτής της ικανότητας σε προκαταρκτική εξέταση στελεχών για παράγοντες βιολογικής αντιμετώπισης (Pandin et al., 2017).

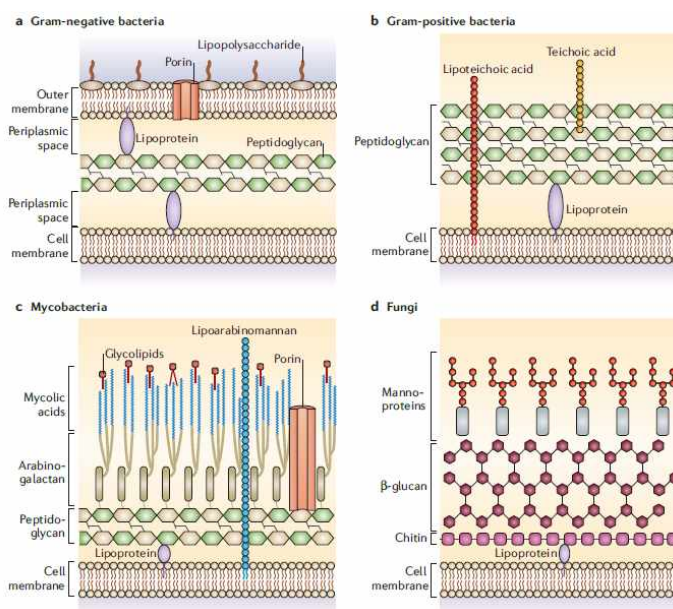


Εικόνα 1.8 Προτεινόμενοι μηχανισμοί των φυτικών αλληλεπιδράσεων με τους παράγοντες βιολογικής αντιμετώπισης και παθογόνα στελέχη (IDR: induced disease resistance). Εικόνα από το άρθρο των Pandin και συναργατών (2017).

Επιπροσθέτως, οι κινητικότητες swarming και swimming, καθώς και η ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου είναι απαραίτητα χαρακτηριστικά ενός βακτηριακού στελεχούς για την προώθηση της φυτικής ανάπτυξης καθώς χρειάζεται να προσεγγίσουν τη ρίζα μέσω χημειοτακτισμού, να αποικίσουν τη ριζόσφαιρα και να προσδεθούν στην επιφάνεια της ρίζας ώστε να εγκατασταθούν και να μπορούν να ωφελίσουν το φυτό. Ο σχηματισμός βιοϋμενίου διευκολύνει την άμεση πρόσβαση του φυτού σε βακτηριακά παραγόμενους ρυθμιστές προώθησης της ανάπτυξης των φυτών, καθώς και την πρόσβαση των βακτηρίων στα θρεπτικά συστατικά του φυτού, ενώ παράλληλα προστατεύει τα βακτήρια από εξωτερικές επιθέσεις άλλων μικροοργανισμών και αντίξοες περιβαλλοντικές συνθήκες, διασφαλίζοντας την παραμονή τους στη θέση αποικισμού τους.

1.5.2 Παραγωγή λυτικών ενζύμων

Τα κυτταρικά τοιχώματα των μυκήτων αποτελούνται κυρίως από χιτίνη (chitin) και την απαμινωμένη μορφή της (chitosan), καθώς και β-γλουκάνες (Brown et al., 2015; Abo Elsoud et al., 2019) (Εικόνα 1.9). Τα ωφέλιμα βακτήρια μπορούν να παράγουν λυτικά ένζυμα τα οποία στοχεύουν τους πολυσακχαρίτες του κυτταρικού τοιχώματος των φυτοπαθογόνων μυκήτων οδηγώντας στη λύση των υφών και τελικά το θάνατο (Baldan et al., 2015; Lastochkina et al., 2020b). Παραδείγματα αποτελούν οι χιτινάσες, που αποδομούν το κύριο συστατικό του κυτταρικού τοιχώματος των μυκήτων, οι γλουκανάσες, αλλά και οι χιτοζανάσες (Seo et al., 2014; Xu et al., 2016; Pirtillä et al., 2021). Η ενσωμάτωση γονιδίου που κωδικοποιεί για τη χιτινάση από στέλεχος *Bacillus subtilis* στο χρωμόσωμα στελέχους *Burkholderia vietnamiensis* οδήγησε σε αυξημένη παρεμπόδιση φυτοπαθογόνων μυκήτων *in vitro* και *in planta* (Zhang et al., 2012).



Εικόνα 1.9 Δομή του κυτταρικού τοιχώματος των βακτηρίων αρνητικών κατά Gram (a), των βακτηρίων θετικών κατά Gram (b), των μυκοβακτηρίων (c) και των μυκήτων (d). Εικόνα από το άρθρο των Brown και συνεργατών (2015).

Ακόμη, έχει βρεθεί συσχέτιση ανταγωνιστικής δράσης έναντι φυτοπαθογόνων μυκήτων και της παραγωγής λυτικών ενζύμων, όπως είναι οι αμυλάσες, πρωτεάσες, λιπάσες και κυτταρινάσες (Ali et al., 2019; Lastochkina et al., 2019, 2020b; Mishra et al., 2020). Έχει αναφερθεί πως το φυτό μπορεί να αυξήσει την παραγωγή παρεμποδιστών των υδρολασών ως απόκριση στην αυξημένη παραγωγή υδρολασών από τα ωφέλιμα βακτήρια, οι οποίοι βοηθούν στην παρεμπόδιση λυτικών ενζύμων των παθογόνων μικροοργανισμών (Lastochkina et al., 2020b). Ακόμη, τα ένζυμα πηκτινάσες (pectinases) και κουτινάσες (cutinases) παρεμβαίνουν στη δράση των τελεστών παθογένειας, μειώνοντας έτσι τη μολυσματικότητα των φυτοπαθογόνων (Raymaekers et al., 2020).

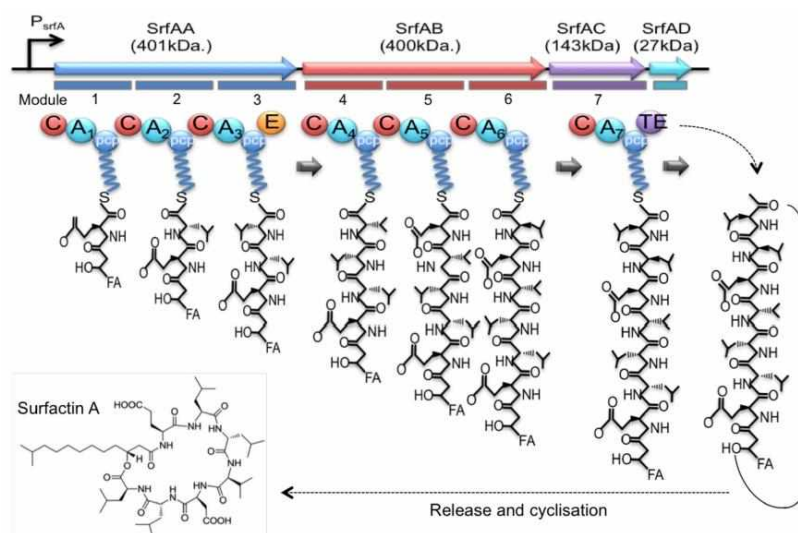
1.5.3 Παραγωγή διαχεόμενων αντιμικροβιακών ενώσεων

Οι δευτερογενείς μεταβολίτες δεν είναι άμεσα συνδεδεμένοι με την ανάπτυξη των βακτηρίων που τους παράγουν, αλλά διαδραματίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στις αλληλεπιδράσεις και την επικοινωνία με τους υπόλοιπους οργανισμούς (Tyc et al., 2017). Οι διαχεόμενοι δευτερογενείς μεταβολίτες δρουν σε μικρές αποστάσεις αλλά διαθέτουν ισχυρότερη βιολογική δράση σε σχέση με τους πτητικούς που δρουν σε μεγαλύτερες αποστάσεις (Tyc et al., 2017). Ακόμη, έχει γίνει η υπόθεση πως η παραγωγή χαμηλότερων συγκεντρώσεων από την ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (Minimal Inhibition Concentration, MIC) μπορεί να μην έχει ως αποτέλεσμα τη θανάτωση του παθογόνου, αλλά την παρεμπόδιση της ανάπτυξής του μέσω παρεμπόδισης της βλάστησης των σπορίων και των υφών (Arseneault & Filion, 2017).

Συνήθως τα γονίδια που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση αυτών των ενώσεων, συμπεριλαμβανομένων γονιδίων που εμπλέκονται στην τροποποίηση, μεταφορά και ανοσία του κυττάρου στην παραγόμενη ένωση, είναι οργανωμένα σε συστάδες, που ονομάζονται συστάδες βιοσυνθετικών γονιδίων (biosynthetic gene clusters, BGCs). Οι κύριες κατηγορίες αντιμικροβιακών μεταβολιτών είναι τα μη ριβοσωμικά πεπτίδια, τα πολυκετίδια και οι βακτηριοσίνες. Για τα μη ριβοσωμικά πεπτίδια και τα πολυκετίδια έχει αναφερθεί πως βρίσκονται συχνά στα γονιδιώματα βακτηρίων που σχετίζονται με τα φυτά, αλλά όχι σε βακτήρια που δε σχετίζονται με τα φυτά (Aleti et al., 2015).

1.5.3.1 Πεπτίδια μη ριβοσωμικής προέλευσης (Non ribosomal peptides, NRPs)

Τα πεπτίδια μη ριβοσωμικής προέλευσης (non ribosomal peptides, NRPs) είναι ολιγοπεπτίδια τα οποία δε συντίθενται από το ριβόσωμα, αλλά από μεγάλες πολύ-ενζυμικές πρωτεΐνες που ονομάζονται Συνθετάσες Μη Ριβοσωμικών Πεπτιδίων (Non-Ribosomal Peptide Synthetases, NRPSs) (**Εικόνα 1.10**) (Fischbach & Walsh, 2006; Walsh, 2014). Η κάθε πρωτεΐνη περιλαμβάνει μονάδες (modules), η καθεμία από τις οποίες είναι υπεύθυνη για την επιλογή, ενεργοποίηση, επεξεργασία και ενσωμάτωση ενός συγκεκριμένου αμινοξέος και περιέχει περισσότερες από μία πρωτεϊνικές επικράτειες (protein domains) που επιτελούν αυτές τις λειτουργίες (Harwood et al., 2018; Reimer et al., 2018). Ως «module» ορίζεται μία επαναλαμβανόμενη μονάδα που περιέχει συγκεκριμένη αλληλουχία νουκλεοτιδίων με ένα ή περισσότερα ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης (ORFs) (Donadio et al., 1991). Ο αριθμός και η σειρά των μονάδων αντιστοιχεί στον αριθμό και τη σειρά των αμινοξέων στο πεπτιδικό προϊόν (Reimer et al., 2018). Οι συνθετάσες μπορεί να είναι από μία έως 18 μονάδες, με μοριακό βάρος που μπορεί να ξεπερνά τα 2 MDa σε μία πρωτεϊνική αλυσίδα. Επιπλέον ένζυμα τροποποίησης που δρουν *in cis* ή *in trans* μπορεί να εμπλακούν στη βιοσύνθεση ενός NRP.



Εικόνα 1.10 Η βιοσύνθεση της ένωσης Surfactin. Το πολυενζυμικό σύμπλοκο υπεύθυνο για τη σύνθεση της Surfactin αποτελείται από επτά μονάδες (modules), ένα για καθένα από τα επτά αμινοξέα. Οι επικράτειες των μονάδων καταλύουν τις 24 χημικές αντιδράσεις που απαιτούνται για τη σύνθεση της ένωσης. Η τελευταία επικράτεια είναι υπεύθυνη για την απελευθέρωση και την κυκλοποίηση του προϊόντος (Harwood et al., 2018).

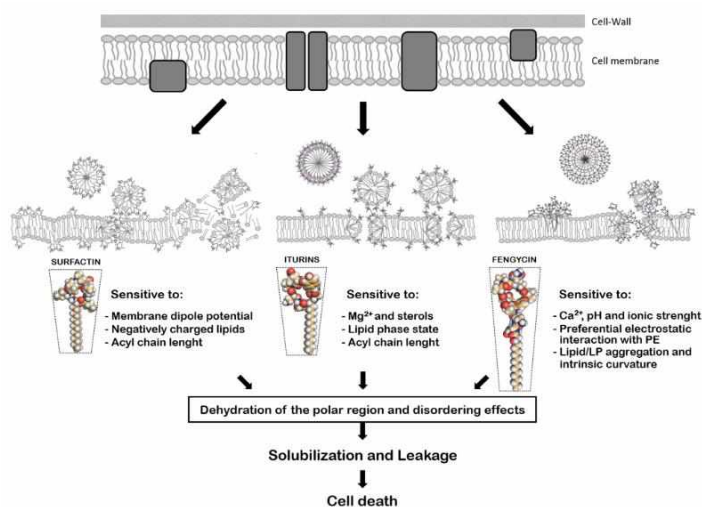
Υπάρχει τεράστια ποικιλία των NRPs καθώς οι συνθετάσες μπορούν να χρησιμοποιήσουν πάνω από 500 διαφορετικά μονομερή ακυλίου ως υπόστρωμα (συμπεριλαμβανομένων των πρωτεινογόνων και μη πρωτεινογόνων αμινοξέων, λιπαρών οξέων και υδροξυ-οξέων (hydroxy-acids), μπορούν να τροποποιηθούν κατά ή μετά τη σύνθεση, ενώ μπορούν να έχουν γραμμική, κυκλική ή διακλαδισμένη τοπολογία (Falardeu et al., 2013). Οι δύο πιο σημαντικές κλάσεις δευτερογενών μεταβολιτών που παράγονται από NRPSs είναι τα λιποπεπτίδια και οι σιδηροφόρες ενώσεις (Tyc et al., 2017).

Τα λιποπεπτίδια είναι αμφίφιλα μόρια, καθώς αποτελούνται από ένα γραμμικό ή κυκλικό ολιγοπεπτίδιο που είναι συνδεδεμένο στο N-τελικό του άκρο με αλειφατική αλυσίδα λιπαρών οξέων (Raaijmakers et al., 2010). Τα δύο αυτά τμήματα συντίθενται ξεχωριστά και μετά ενώνονται μέσω αντίδρασης συμπύκνωσης (Inés & Dhouha, 2015), όπου το λιπαρό οξύ μπορεί να προέρχεται από το μονοπάτι βιοσύνθεσης των λιπαρών οξέων ή από συνθάσες πολυκετιδίων (Polyketide Synthase, PKS), οπότε η ένωση αναφέρεται ως υβριδική NRP-PK (Fischbach & Walsh, 2006; Walsh, 2014). Χωρίζονται σε γραμμικά κατιονικά, κυκλικά κατιονικά και κυκλικά μη κατιονικά με τα πιο γνωστά και μελετημένα να είναι τα τελευταία.

Οι δομικές διαφορές των κυκλικών λιποπεπτιδίων προέρχονται από τη διαφορά στο μήκος και τη σύσταση της αλειφατικής αλυσίδας, καθώς και από τον αριθμό, τύπο και τη διαμόρφωση των αμινοξέων στο πεπτιδικό μέρος. Η αλειφατική αλυσίδα μπορεί να διαφέρει στο μήκος και να έχει γραμμική, iso ή anteiso διαμόρφωση, ενώ το κάθε αμινοξύ μπορεί να έχει L- ή D- διαμόρφωση (Kaspar et al., 2019). Επιπλέον, η κάθε ένωση συνήθως παράγεται ως μίγμα με παρόμοιες αλειφατικές αλυσίδες, π.χ. C₁₄, iso-C₁₅, anteiso-C₁₅. Η παραγωγή των κυκλικών λιποπεπτιδίων εξαρτάται από το μηχανισμό της αίσθησης μεγέθους πληθυσμού (quorum sensing), καθώς απαιτείται συγκεκριμένη συγκέντρωση κυττάρων για την έναρξη της παραγωγής τους (Raaijmakers et al., 2010). Αυτές οι ενώσεις διαθέτουν επιφανειοδραστικές, αντιμικροβιακές και κυτταροτοξικές ιδιότητες κι έτσι είναι

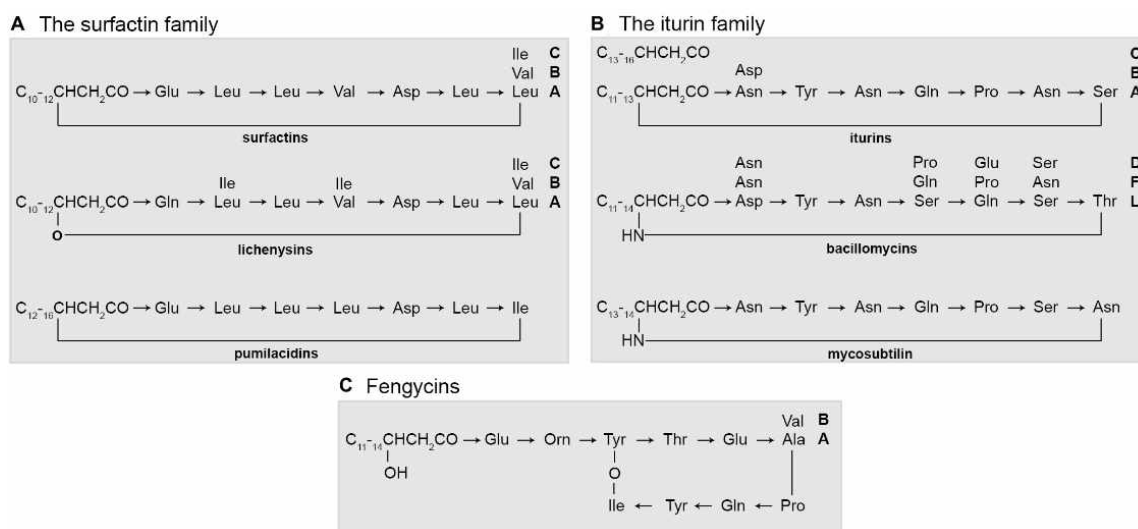
σημαντικές για τον αποικισμό της ρίζας και την καταπολέμηση παθογόνων (Falardeu et al., 2013; Tyc et al., 2017), ενώ μελετώνται και για την επίδρασή τους έναντι μορφών καρκίνου (Zhao H. et al., 2018).

Τα βακτηριακά στελέχη του γένους *Bacillus* παράγουν 3 κύριες οικογένειες κυκλικών μη κατιονικών λιποπεπτιδίων, που ονομάζονται Ιτουρίνες (Iturins), Σουρφακτίνες (Surfactins) και Φενγκισίνες (Fengycins). Η κάθε οικογένεια περιλαμβάνει μια ομάδα ενώσεων ισόμορφων (isoforms) ή αλλιώς παραλλαγών (variants) που διαφέρουν ελάχιστα στην αμινοξική ακολουθία ενώ η κάθε ένωση έχει διαφορετικές ομόλογες (homologs) ενώσεις που διαφέρουν στο μήκος της αλειφατικής αλυσίδας, με αυτές τις διαφοροποιήσεις να επηρεάζουν τη δραστηριότητα σε κάποιες περιπτώσεις (Zhou S. et al., 2020). Οι Σουρφακτίνες (Surfactins) έχουν ισχυρή αιμολυτική δράση και θεωρούνται ανταγωνιστικές κυρίως έναντι βακτηρίων, ενώ οι Ιτουρίνες (Iturins) και Φενγκισίνες (Fengycins) έχουν ηπιότερη αιμολυτική δράση και θεωρείται πως ανταγωνίζονται κυρίως μύκητες (Falardeu et al., 2013). Γενικός μηχανισμός δράσης έναντι βακτηρίων και μυκήτων είναι η διάσπαση της ακεραιότητας της λιπιδικής διπλοστιβάδας μέσω της ενσωμάτωσης της αλειφατικής αλυσίδας (Εικόνα 1.11), ενώ ίσως το πεπτιδικό μέρος λειτουργεί ως οδηγός που βοηθάει το μόριο να περάσει τα πολικά και φορτισμένα μόρια της πεπτιδογλυκάνης του κυτταρικού τοιχώματος (Falardeu et al., 2013; Pueyo et al., 2014).



Εικόνα 1.11 Αλληλεπίδραση με την κυτταρική μεμβράνη και μηχανισμός διάρρηξης των Surfactin, Iturin A και Fengycin, τα πιο μελετημένα βακτηριακά κυκλικά λιποπεπτιδία. Αυτές οι ενώσεις προσδένονται στη μεμβράνη μέσω ηλεκτροστατικών και υδροφοβικών αλληλεπιδράσεων. Ανάλογα με την κρίσιμη συγκέντρωση σχηματισμού μικκυλίων (Critical Micelle Concentration, CMC), η εισαγωγή των υδροφοβικών ουρών κάθε ένωσης στη μεμβράνη οδηγεί στην ασύμμετρη πλευρική επέκταση του επάνω φύλλου της λιπιδικής διπλοστιβάδας που αποσταθεροποιεί τη μεμβράνη. Στην περίπτωση της Fengycin, αυτά τα συσσωματώματα επάγουν τη λέπτυνση της διπλοστιβάδας. Σε όλες τις περιπτώσεις, η εισαγωγή του πεπτιδικού δακτυλίου προκαλεί παροδική διάρρηξη της μεμβράνης ή τοπική αταξία της διπλοστιβάδας που οδηγούν σε αλλαγές στη διαπερατότητα. Στην περίπτωση της Surfactin, το μικρό της μέγεθος ευνοεί μια ασύμμετρη κατανομή μεταξύ εσωτερικού και εξωτερικού φύλλου και κατ'επέκταση αποδιοργάνωση των λιπιδίων και διαπερατότητα, όπως η επίδραση απορροπαντικού. Η Iturin A αλληλεπιδρά με τη μεμβράνη και αυξάνει τη διαπερατότητα των ιόντων λόγω σχηματισμού καναλιών ιόντων. Αυτά τα κανάλια σχηματίζονται πιθανώς από την παρουσία μικελλών του λιποπεπτιδίου και συσσωματωμάτων λιποπεπτιδίου-φωσφολιπιδίων. Αυτές οι δραστηριότητες είναι ευαίσθητες σε αρκετούς ηλεκτροστατικούς και μηχανικούς παράγοντες, με τους δύο σημαντικότερους να είναι το μήκος της αλειφατικής αλυσίδας του λιποπεπτιδίου και η εγγενής καμπυλότητα της μεμβράνης-στόχου. Εικόνα από το άρθρο των Balleza και συναεργατών (2019).

Η οικογένεια των Ιτουρινών αποτελείται από ενώσεις που ανήκουν στην κατηγορία Cyclopeptides και είναι επταπεπτίδια συνδεδεμένα σε μια β-αμινο αλειφατική αλυσίδα με μήκος 14-17 άνθρακες (Εικόνα 1.12). Μεταξύ των τριών οικογενειών οι Iturins είναι η μικρότερη σε μέγεθος με μοριακό βάρος περίπου 1.1 kDA (Ongena et al., 2008; Meena & Kanwar, 2015). Οι Iturins αναφέρθηκαν πρώτη φορά το 1950 ως αντιβιοτικό που παράγει το βακτήριο *B. subtilis* και πήραν το όνομά τους από την περιοχή Ituri στο Κονγκό, όπου απομονώθηκε το συγκεκριμένο στέλεχος (Delcambe et al., 1950).



Εικόνα 1.12 Η δομή των κυριότερων οικογενειών κυκλικών λιποπεπτιδίων και αντιπροσώπων τους που παράγονται από είδη του γένους *Bacillus*. Εικόνα από το άρθρο των Müllner et al., 2020.

Η οικογένεια περιέχει τις ισόμορφες ενώσεις Iturin, Bacillomycin D (Peypoux et al., 1980, 1981), Bacillomycin L (Besson et al., 1977), Bacillomycin F (Peypoux et al., 1980, 1981), Mojavensin A (Ma et al., 2012), Mycosubtilin (Peypoux et al., 1986). Το χαρακτηριστικό αυτής της οικογένειας είναι ότι τα πρώτα 3 αμινοξέα είναι κοινά μεταξύ όλων των ενώσεων, ενώ τα υπολειπόμενα 4 αμινοξέα μεταβάλλονται ανάλογα με την ένωση (Εικόνα 1.13) (Dunlap et al., 2019). Οι ομόλογες ενώσεις, δηλαδή εκείνες με ίδια αμινοξέα και διαφορετική αλειφατική αλυσίδα, μπορεί να αναφέρονται με άλλες ονομασίες. Για παράδειγμα, οι Iturins D και E διαφέρουν από την Iturin A λόγω της παρουσίας ενός ελεύθερου καρβοξυλίου στην D και μιας καρβοξυμεθυλο ομάδας στην Iturin E.

ItuD	ItuA	ItuB				ItuC	
	Asn-AA#1	Tyr-AA#2	Asn-AA#3	AA#4	AA#5	AA#6	AA#7
conserved regions				variable regions			
Compound	AA#4	AA#5	AA#6	AA#7			
Iturin A	Gln	Pro	Asn	Ser			
Mycosubtilin	Gln	Pro	Ser	Asn			
Bacillomycin L	Ser	Glu	Ser	Thr			
Bacillomycin D	Pro	Glu	Ser	Thr			
Bacillomycin F	Gln	Pro	Asn	Thr			
Mojavensin	Gln	Pro	Asn	Asn			

Εικόνα 1.13 Γενική γονιδιακή οργάνωση μιας συστάδας βιοσυνθετικών γονιδίων κυκλικού λιποπεπτιδίου που ανήκει στην οικογένεια των Iturins και αλληλουχία του επταπεπτιδίου διάφορων ισομορφών. Τα πρώτα τρία αμινοξέα είναι Asn-Tyr-Asn για όλες τις ενώσεις. Εικόνα από το άρθρο των Dunlap και συνεργατών (2019).

Ο τρόπος δράσης τους κατά των μυκήτων φαίνεται να διαφέρει από ένωση σε ένωση, περιλαμβάνοντας τη δημιουργία πόρων και ιοντικών καναλιών στις κυτταρικές μεμβράνες μέσω συσσωμάτωσης και εισαγωγής στη λιπιδική διπλοστιβάδα, την αλληλεπίδραση με ενδοκυττάρους στόχους ή το κυτταρικό τοίχωμα, καθώς και πρόκλησης οξειδωτικής καταπόνησης που επηρεάζει τη λειτουργία του μιτοχονδρίου (Etchegaray et al. 2008; Ma et al., 2012; Zhang et al., 2013; Gong et al., 2014; Gu et al., 2017; Cob-Calan et al., 2019; Kaspar et al., 2019; Jin et al., 2020; Wang et al., 2020a), ενώ εξαρτάται από τον τύπο στερολών που υπάρχει στις μεμβράνες (Falardeu et al., 2013). Παρ'όλο που οι Iturins θεωρείται ότι δεν έχουν ιδιαίτερη αντιβακτηριακή δράση, υπάρχουν μελέτες που αναφέρουν τις ενώσεις Iturin A και Bacillomycin L ως τον κύριο παράγοντα έναντι φυτοπαθογόνων βακτηρίων, όπως το *Xanthomonas campestris* pv. *cucurbitae* (Zerriouh et al., 2011; Falardeau et al., 2013; Mora et al., 2015; Dimkić et al., 2017).

Η οικογένεια των Φενγκισινών περιλαμβάνει τις Fengycins A, B και C καθώς και τις Plipastatins, ενώσεις που κατατάσσονται στις Macrolactones και περιέχουν αλυσίδα δέκα αμινοξέων συνδεδεμένη με β-υδροξυ αλυσίδα λιπαρών οξέων (Falardeau et al., 2013; Villegas-Escobar et al., 2013). Υπάρχει σύγχυση στη διαφοροποίησή των Fengycins από τις Plipastatins, ενώ αρκετές μελέτες τις αναφέρουν λανθασμένα ως όμοιες ενώσεις. Η διαφορά της A και της B μορφής είναι η διαφορά στο έκτο αμινοξύ, που είναι αλανίνη (Ala) ή βαλίνη (Val), αντίστοιχα (Falardeau et al., 2013), ενώ η C έχει Val₆ και Tyr₁₀ (Villegas-Escobar et al., 2013). Δύο διαφορές είχαν προσδιοριστεί αρχικά μεταξύ των Fengycins και Plipastatins. Το αμινοξύ στη θέση 8 είναι Gln στις Plipastatins και Glu στις Fengycins. Η δεύτερη διαφορά είναι ότι το αμινοξύ τυροσίνη στη θέση 3 έχει L διαμόρφωση στις Plipastatins και D διαμόρφωση στις Fengycins, και το αμινοξύ τυροσίνη στη θέση 9 έχει D διαμόρφωση στις Plipastatins και L διαμόρφωση στις Fengycins. Ωστόσο, έχουν αναφερθεί αποκλίσεις αυτών των «κανόνων» και έτσι επικρατεί σύγχυση ως προς την ονοματολογία (Hussein, 2019).

Η Fengycin μπορεί να δράσει κατά των μυκήτων άμεσα μέσω πρόσδεσης στην κυτταρική μεμβράνη προκαλώντας διαροή και λύση (Gonzalez-Jaramillo et al., 2017). Ενώ η πρόσδεση της Fengycin διαταράσσει τη λιπιδική υδροφοβική περιοχή ανεξάρτητα από τον τύπο της κεφαλής ομάδας (headgroup) των λιπιδίων, οι τάσεις συσσωμάτωσης διαφέρουν ανάλογα με τη σύσταση των λιπιδίων. Επιπλέον, η ένωση διαταράσσει τη μεμβράνη ανεξάρτητα από τη σύνθεση των πεπτιδίων αλλά η έκταση της διαροής έχει σχέση με το σχηματισμό των συσσωματωμάτων (Sur et al., 2018). Με βάση μία μελέτη προσομοίωσης η ένωση Fengycin είναι πιο πιθανό να σχηματίσει σταθερά ολιγομερή σε κυτταρική μεμβράνη μυκήτων σε σύγκριση με τη μεμβράνη βακτηρίων (Sur et al., 2018) και γενικά αναφέρεται πως έχει περιορισμένη αντιβακτηριακή δράση (Falardeu et al., 2013). Οι Φενγκυσίνες έχουν μεγαλύτερο μέγεθος από τις Ιτουρίνες, κάτι που συνεπάγεται ότι η διπλοστιβάδα της κυτταρικής μεμβράνης πρέπει να είναι σε ρευστή μορφή, ώστε να επιτραπεί η ευκολότερη ενσωμάτωση της αλειφατικής αλυσίδας (Deleu et al., 2008). Μύκητες με υψηλότερη περιεκτικότητα σε φωσφολιπίδια και εργοστερόλη έχουν περισσότερη ανθεκτικότητα σε μικρές συγκεντρώσεις της ένωσης Fengycin (Falardeu et al., 2013; Wise et al., 2014). Σε μικρή αναλογία Fengycin τα

μορφολογικά χαρακτηριστικά της λιπιδικής διπλοστιβάδας δεν επηρεάζονται σημαντικά αλλά το κύτταρο ενεργοποιεί τη διαδικασία της απόπτωσης (Tang et al., 2014), σε μέτριες συγκεντρώσεις η μεμβράνη γίνεται πιο ρευστή, ενώ σε υψηλότερες συγκεντρώσεις μπορεί να επιτευχθεί σχηματισμός πόρων στη μεμβράνη και πλήρης διαλυτοποίηση της (Deleu et al., 2005, 2008; Tang et al., 2014). Ακόμη, επάγουν την παραγωγή Ενεργών Μορφών Οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS) και την συμπύκνωση της χρωματίνης (Zhang & Sun, 2018).

Η τελευταία κύρια οικογένεια ενώσεων κυκλικών λιποπεπτιδίων που συναντάται στο γένος *Bacillus* είναι αυτή των Σουρφακτινών. Οι ενώσεις αυτές ανήκουν στην κατηγορία των Macrolactones και αποτελούνται από ένα επταπεπτίδιο συνδεδεμένο με μία β-υδροξυ αλειφατική αλυσίδα. Είναι ισχυρά επιφανειοδραστικές, αναγκαίες για την εκτέλεση της ομαδικής κίνησης και το σχηματισμό βιοϋμενίου, ενώ επιδεικνύουν ισχυρή αντιβακτηριακή και αντιϊκή δραστηριότητα (Ongena & Jacques, 2008). Υπάρχουν διάφορες ισόμορφες και ομόλογες για την κάθε ένωση που μπορεί να έχουν και ίδια ονομασία (A, B, C) προκαλώντας σύγχυση. Ανάλογα με την αμινοξική αλληλουχία του πεπτιδίου, χωρίζονται σε Surfactin, Esperin, Lichenysin, Pumilacidin, και WH1 fungin (**Πίνακας 1.2**), η καθεμία από τις οποίες συναντάται σε συγκεκριμένα είδη (Falardeu et al., 2013; Gao et al., 2013). Η ένωση Surfactin έχει αναφερθεί για τα είδη *B. subtilis* και *B. velezensis*, η ένωση Pumilacidin για το είδος *B. pumilus*, ενώ η ένωση Lichenysin για το είδος *B. licheniformis* (Théatre et al., 2021).

Πίνακας 1.2 Αμινοξική αλληλουχία για τις ισόμορφες ενώσεις που ανήκουν στην οικογένεια των κυκλικών λιποπεπτιδίων που ονομάζονται Σουρφακτίνες (Surfactins).

Ισόμορφη ένωση	Αμινοξική αλληλουχία							Αναφορά
Surfactin A (ή [Leu] ⁻ ή [Leu ₇])	Glu	Leu	Leu	Val	Asp	Leu	Ile	Peypoux et al., 1999
Surfactin B	Glu	Ile	Leu	Val	Asp	Leu	Val	Peypoux et al., 1999
Surfactin C	Glu	Leu	Leu	Val	Asp	Leu	Ile	Peypoux et al., 1999
Lichenysin	Gln	Leu	Leu	Val	Asp	Leu	Ile	Horowitz et al., 1990
Lichenysin	Glu	Leu	Leu	Val	Asn	Leu	Ile	Horowitz et al., 1990
Pumilacidin	Glu	Leu	Leu	Leu	Asp	Leu	Ile	Naruse et al., 1990
Pumilacidin	Glu	Leu	Leu	Leu	Asp	Leu	Val	Naruse et al., 1990

Οι Σουρφακτίνες είναι ισχυρές επιφανειοδραστικές ενώσεις με εξαιρετικές γαλακτοματοποιητικές (emulsifying) και αφρώδεις (foaming) ιδιότητες. Λόγω της αμφίφιλης δομής τους μπορούν να προσδεθούν στο λιπιδικό μέρος της κυτταρικής μεμβράνης και να διαταράξουν την ακεραιότητά τους με δοσο-εξαρτώμενο τρόπο. Τα δύο αρνητικά φορτισμένα αμινοξικά κατάλοιπα (Asp και Glu) σχηματίζουν μια δομή «δαγκάνα» που μπορεί να προσδεθεί σε μονο- και δισθενή κατιόντα, ενώ η αλειφατική αλυσίδα προεκτείνεται στην αντίθετη μεριά του πεπτιδικού δακτυλίου. Σε συγκεντρώσεις μικρότερες ή κοντά στην κρίσιμη συγκέντρωση σχηματισμού μικκυλίων (Critical Micelle Concentration, CMC) (περίπου 0.01-0.025 g/L) μόρια Surfactin μπορούν να εισέλθουν στις διπλοστιβάδες προκαλώντας ήπια διαρροή του περιεχομένου (Li et al., 2015). Ακόμα υψηλότερη συγκέντρωση (ίση με την τιμή CMC) οδηγεί σε πλήρη κατάρρευση και διαλυτοποίηση της λιπιδικής διπλοστιβάδας (Deleu et al., 2013). Η παρουσία χοληστερόλης στη φωσφολιπιδική στιβάδα εξασθενεί την επίδραση των Σουρφακτινών, το οποίο υποδεικνύει ότι η ευαισθησία των οργανισμών-

στόχων εξαρτάται από το περιεχόμενο των στερολών. Έτσι, εξηγείται το γιατί οι συγκεκριμένες ενώσεις επιδεικνύουν αιμολυτική, αντιακή, αντιμυκοπλασματική και αντιβακτηριακή δραστηριότητα αλλά όχι ιδιαίτερη αντιμυκητιακή. Η ένωση WH1 fungin σε χαμηλές συγκεντρώσεις ενεργοποιεί τη διαδικασία απόπτωσης, σε υψηλές συγκεντρώσεις δημιουργεί πόρους στη μεμβράνη, ενώ μπορεί και να παρεμποδίσει τη σύνθεση γλουκάνης οδηγώντας σε μειωμένη σύνθεση καλλόζης στο κυτταρικό τοίχωμα του μύκητα (Qi et al., 2010). Έχει, επίσης, προταθεί πως η Surfactin προσδένεται και εισέρχεται στη μεμβράνη των φυτικών κυττάρων προκαλώντας μικρές αλλαγές στη δυναμική των λιπιδίων που επάγουν τη φυτική άμυνα, γεγονός που υποστηρίζεται και από το ότι μόνο ομόλογες ενώσεις με μεγάλη αλειφατική αλυσίδα μπορούν να επάγουν την άμυνα σε κύτταρα καπνού επειδή παρουσιάζουν ισχυρότερη αλληλεπίδραση με τη μεμβράνη (Pršic & Ongena, 2020).

Άλλες οικογένειες μη κατιονικών κυκλικών λιποπεπτιδίων που παράγονται από τα είδη του γένους *Bacillus* αποτελούν οι Kurstakins και οι Locillomycins. Οι Kurstakins παράγονται από βακτηριακά στελέχη *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* και είναι επταπεπτίδια με κυκλοποιημένη ή γραμμική πεπτιδική αλυσίδα (Thr-Gly-Ala-Gln-His-Gln-Ser) συνδεδεμένη με μια αλειφατική αλυσίδα 11-14 ανθράκων (με β-υδροξυλομάδες ή όχι) (Béchet et al., 2012; Cochrane & Vederas, 2016). Η ένωση Locillomycin παράγεται από το στέλεχος *B. subtilis* 916, ενώ η δομή της είναι ξεχωριστή από τα υπόλοιπα LPs καθώς περιέχει 9 αμινοξέα (Thr-Gln-Asp-Gly-Asn-Asp-Gly-Tyr-Val) και υπόκειται σε μακροκυκλοποίηση (macrocyclization) (Luo et al., 2015a). Επιδεικνύει μέτρια αντιμικροβιακή δράση έναντι ιών και βακτηρίων, αλλά ο μηχανισμός δράσης δεν έχει προσδιοριστεί.

Κυκλικά λιποπεπτίδια παράγονται και από βακτηριακά στελέχη του γένους *Pseudomonas*, με μερικές γνωστές ενώσεις να είναι οι Viscosins, Massetolide A, Syringomycin E, Orfamide A (Falardeu et al., 2013; Inés & Dhouha, 2015; Kurniawan et al., 2018).

1.5.3.2 Πολυκετίδια (Polyketides, PKs)

Η οικογένεια των Πολυκετιδίων (Polyketides) περιέχει ενώσεις που συντίθενται μη ριβοσωμικά από τις συνθάσες πολυκετιδίων (Polyketide Synthases, PKS), μια οικογένεια ενζύμων με πολλαπλές πρωτεϊνικές επικράτειες (Harwood et al., 2018). Ο μηχανισμός σύνθεσης των πολυκετιδίων ομοιάζει πολύ στη βιοσύνθεση των λιπαρών οξέων, αλλά επιτρέπει μεγαλύτερη ποικιλομορφία στα δομικά στοιχεία καθώς και τροποποιήσεις κατά την επιμήκυνση της αλυσίδας. Οι συνθάσες πολυκετιδίων κατηγοριοποιούνται σε 3 κύριους τύπους (Harwood et al., 2018). Οι Τύπου I περιλαμβάνουν μεγάλες πρωτεΐνες οργανωμένες σε modules με το καθένα να περιέχει περισσότερες από μία πρωτεϊνικές επικράτειες. Οι Τύπου II και οι Τύπου III αποτελούνται από ξεχωριστές πρωτεΐνες και όχι από πολλαπλές επικράτειες μέσα στην ίδια πρωτεΐνη, ενώ συνθέτουν αρωματικά Polyketides και polyhydroxy phenols, αντίστοιχα. Μία τέτοια φαινολική ένωση είναι η γνωστή 2,4 DAPG, η οποία παράγεται από στελέχη του γένους *Pseudomonas*. Μία σημαντική ομάδα PKS τύπου I είναι τα trans-AT PKS, τα οποία δε διαθέτουν AT (acetyltransferase) επικράτειες σε κάθε module, αλλά οι επικράτειες αυτές κωδικοποιούνται *in trans*, συνήθως μέσα στη συστάδα των βιοσυνθετικών γονιδίων

(Harwood et al., 2018). Ακόμη, ένα μεγάλο ποσοστό των PKS βρίσκεται συσχετιζόμενο με NRPS μέσα στη συστάδα, κι έτσι αναφέρονται ως υβριδικά ένζυμα PKS-NRPS. Παράδειγμα πολυκετιδίων αποτελούν οι ενώσεις Bacillaene, Difficidin και Macrolactin που συντίθενται από στελέχη ειδών του γένους *Bacillus* και έχουν αντιβακτηριακή δράση (Olishevskaya et al., 2019; Fazle-Rabbee & Baek, 2020).

1.5.3.3 Βακτηριοσίνες (Bacteriocins)

Οι ενώσεις Βακτηριοσίνες (Bacteriocins) είναι ριβοσωμικά συντιθέμενα πεπτιδία που έχουν ανταγωνιστική δράση έναντι βακτηρίων του ίδιου είδους ή άλλου γένους και χρησιμεύουν ώστε τα στελέχη που τα παράγουν να αποκτήσουν ανταγωνιστικό πλεονέκτημα στην περιοχή τους (Perez et al., 2018; Romero-Severson et al., 2021). Αυτές οι ενώσεις είναι χρήσιμες καθώς είναι θεωρητικά αποτελεσματικές σε συγκεντρώσεις nM, σταθερές σε εύρος τιμών pH και θερμοκρασιών, έχουν χαμηλή τοξικότητα ενώ είναι λιγότερο πιθανό να οδηγήσουν σε ανάπτυξη ανθεκτικότητας (Romero-Severson et al., 2021). Οι περισσότερες βακτηριοσίνες, με εξαίρεση κάποιες κλάσεις, συντίθενται ως ένα λιγότερο δραστικό πρόδρομο μόριο που περιέχει ένα αμινοτελικό πεπτιδιο-οδηγό συνδεδεμένο στο καρβοξυτελικό άκρο του κύριου ενεργού πεπτιδίου, το οποίο απομακρύνεται από πρωτέαση, ενώ μπορεί να λειτουργήσει και ως σήμα (Zimini et al., 2020).

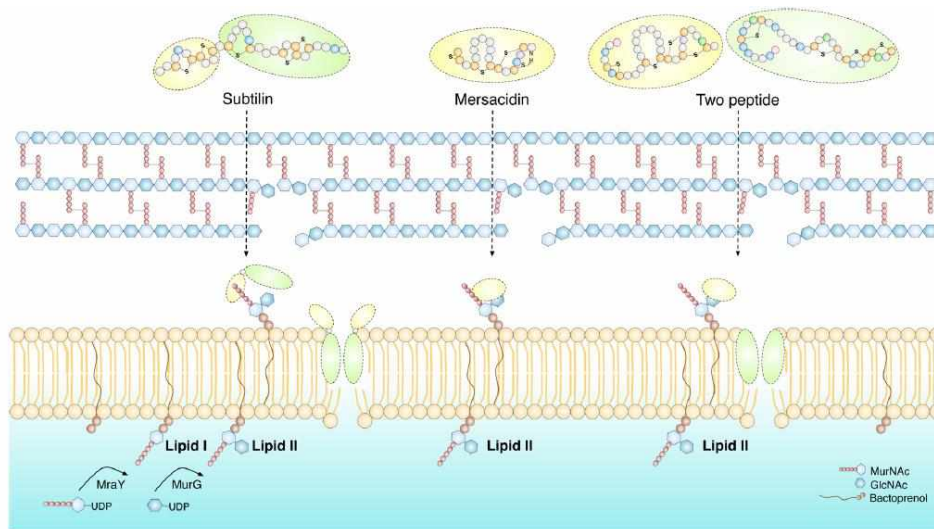
Ερευνώνται με μεγάλο ενδιαφέρον για την καταπολέμηση ανθρωποπαθογόνων ανθεκτικών σε ήδη υπάρχοντα αντιβιοτικά (Darbandi et al., 2021). Το ενδιαφέρον, μέχρι πρόσφατα, ήταν στραμμένο κυρίως σε εκείνες που παράγονται από τα βακτήρια του γαλακτικού οξέος και στην εφαρμογή τους στη βιομηχανία τροφίμων, ωστόσο τα τελευταία χρόνια μελετώνται για την καταπολέμηση του καρκίνου, αλλά και την καταπολέμηση φυτοπαθογόνων στη γεωργία (Zimini et al., 2020; Romero-Severson et al., 2021).

Γενικά, η ταξινόμηση των βακτηριοσινών δεν είναι αρκετά ξεκάθαρη, καθώς εμφανίζονται συνεχώς νέα δεδομένα που αφορούν τη δομή, αμινοξική αλληλουχία και μηχανισμό δράσης (Maqueda et al., 2008; Gabrielsen et al., 2014; Acedo et al., 2018; Perez et al., 2018; Zimini et al., 2020). Μπορούν να διαχωριστούν σε 4 κλάσεις (I, II, III, IV), από τις οποίες μόνο οι 3 πρώτες παράγονται από βακτηριακά στελέχη θετικά κατά Gram (Acedo et al., 2018; Zimini et al., 2020). Η κλάση I ή αλλιώς «Τροποποιημένα» («Modified») περιέχει τα πεπτιδία που τροποποιούνται, τα οποία επίσης ανήκουν στη γενικότερη κατηγορία των ριβοσωμικά συντιθέμενων και μετα-μεταφραστικά τροποποιημένων πεπτιδίων (Ribosomally synthesized and post-translationally modified peptides-RiPPs), καθώς υπόκεινται σε μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις όπως γλυκοσυλίωση, κυκλοποίηση από άκρη σε άκρη (head-to-tail), ετεροκυκλοποίηση (heterocyclization). Η συγκεκριμένη κλάση περιέχει οικογένειες πεπτιδίων όπως τα Lanthipeptides, Sactibiotics, Lassopeptides, Linear Azole containing peptides (LAPs). Η κλάση II περιέχει πεπτιδία που δεν υπόκεινται σε τροποποίηση, εκτός από τον πιθανό σχηματισμό δισουλφιδικών γεφυρών. Τέλος, η κλάση III περιέχει μεγάλα πεπτιδία (>10kDa), τις ενώσεις Vacteriolysins και τις πρόσφατα ανακαλυφθείσες Tailocins (Acedo et al., 2018; Perez et

al., 2018). Ο πιο απλός διαχωρισμός είναι σε κυκλικές (circular) και γραμμικές (linear) (Perez et al., 2018). Κυκλικές Βακτηριοσίνες (Circular Bacteriocins) ονομάζονται οι ενώσεις που έχουν υποστεί κυκλοποίηση μέσω ομοιοπολικής σύνδεσης του καρβοξυτελικού και αμινοτελικού άκρου και όχι εκείνες που περιέχουν άλλου τύπου κυκλοποίηση, όπως οι δακτύλιοι λανθειονίνης των Lanthipeptides (Perez et al., 2018), και κατηγοριοποιούνται στην κλάση I των Bacteriocins σύμφωνα με την πρώτη ταξινόμηση. Έτσι, άλλες ταξινομήσεις των βακτηριοσινών αναφέρονται σε κυκλικές και γραμμικές ή σε τροποποιημένες (κλάση I) και μη τροποποιημένες (κλάση II) (Acedo et al., 2018). Οι ενώσεις της κατηγορίας Microcins είναι βακτηριοσίνες πολύ μικρού μεγέθους, μόλις μερικών αμινοξέων, και γι' αυτό θεωρούνται διακριτή κατηγορία από αυτές.

Μία πολύ μελετημένη κατηγορία των βακτηριοσινών είναι τα Lanthipeptides που ανήκουν στην Κλάση I των Bacteriocins, τα οποία χωρίζονται με τη σειρά τους περαιτέρω σε 4 κλάσεις (Hegemann & Sussmuth, 2020). Είναι πεπτίδια που υπόκεινται σε εκτενείς μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις και περιέχουν ασυνήθιστα αμινοξέα, όπως λανθειονίνη (Lan), μεθυλ-λανθειονίνη (MeLan), διυδροαλανίνη (Dha), διυδροβουτιρίνη (Dhb), D-αλανίνη (D-ala) (Zimini et al., 2020). Γνωστά πεπτίδια με αγρονομικό ενδιαφέρον εναντίον φυτοπαθογόνων μικροοργανισμών είναι οι ενώσεις Subtilin και Mersacidin που ανήκουν στην Κλάση I και II των Lanthipeptides, αντίστοιχα (Barbosa et al., 2014).

Ο τρόπος δράσης των βακτηριοσινών μπορεί να είναι η δημιουργία καναλιών ή πόρων στην κυτταρική μεμβράνη μέσω μη ειδικής πρόσδεσης στην κυτταρική μεμβράνη ή αλληλεπίδρασης με συγκεκριμένους μεμβρανικούς υποδοχείς προκαλώντας διαρροή ηλεκτρολυτών, η παρεμπόδιση βιοσύνθεσης του κυτταρικού τοιχώματος ή η παρέμβαση σε βασικές λειτουργίες και μεταβολικά μονοπάτια του κυττάρου, όπως η μεταγραφή, αντιγραφή, πολλαπλασιασμός και σχηματισμός του κυτταρικού τοιχώματος (Perez et al., 2018; Zimini et al., 2020; Darbandi et al., 2021). Κάποιοι από τους στόχους των ενώσεων αυτών μπορεί να είναι το μόριο lipid II, πρόδρομο μόριο της πεπτιδογλυκάνης, όπως συμβαίνει με τα Lanthipeptides (**Εικόνα 1.14**), ο ABC μεταφορέας της μαλτόζης, όπως συμβαίνει με τη κυκλική βακτηριοσίνη Garvicin, και η ριβοσωμική υπομονάδα 50S, όπως συμβαίνει με τις ενώσεις Thioreptides (Zimini et al., 2020). Οι φορτισμένες θετικά ενώσεις κυκλικών βακτηριοσινών θεωρείται ότι μπορούν να αλληλεπιδράσουν με την αρνητικά φορτισμένη βακτηριακή μεμβράνη μέσω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων χωρίς να χρειάζονται συγκεκριμένο υποδοχέα, αν και ο ακριβής τρόπος δράσης δεν έχει εξακριβωθεί για τις περισσότερες ενώσεις πέραν των Enterocin AS-48, Carnocyclin A και Gassericin A (Perez et al., 2018).



Εικόνα 1.14 Σχηματική παρουσίαση του τρόπου δράσης των ενώσεων Lanthipeptides, που περιλαμβάνει πρόσδεση στο μόριο-στόχο, το λιπίδιο II, αποτρέποντας τη σωστή σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος. Επιπλέον, μπορεί να προκληθεί σχηματισμός πόρων και διάρρηξη της κυτταρικής μεμβράνης. Εικόνα από το άρθρο των Barbosa και συνεργατών (2014).

1.5.4 Επαγωγή της φυτικής άμυνας

Ένας έμμεσος τρόπος βιολογικής αντιμετώπισης από τα PGPB είναι η επαγωγή της φυτικής άμυνας, γεγονός το οποίο προετοιμάζει το ανοσοποιητικό σύστημα των φυτών για αντοχή σε μελλοντικές επιθέσεις από παθογόνα (Pieterse et al., 2014). Τα πλεονεκτήματα των μικροοργανισμών που έχουν ως τρόπο δράσης την πρόκληση διασυστηματικής αντοχής είναι ότι η εφαρμογή τους δε θα έχει αρνητικά αποτελέσματα στους υπόλοιπους ωφέλιμους μικροοργανισμούς, ότι υπάρχει μειωμένη εξελικτική πίεση προς το παθογόνο για ανάπτυξη ανθεκτικότητας, καθώς και το γεγονός πως η εφαρμογή των βακτηρίων μπορεί να γίνει σε τμήματα του φυτού που δεν προορίζονται για κατανάλωση (Raymaekers et al., 2020).

Διεγέρτες της φυτικής άμυνας μπορεί να προέρχονται από τους μικροοργανισμούς ή από το ίδιο το φυτό. Το αμυντικό σύστημα των φυτών περιέχει δύο επίπεδα, με τις ορμόνες να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο και στα δύο. Στο πρώτο επίπεδο, τα φυτά αναγνωρίζουν μικρά συντηρημένα μόρια που προέρχονται από τα μικρόβια ή τα έντομα και ονομάζονται μοριακά πρότυπα σχετιζόμενα με παθογόνα ή μικρόβια (microbe/pathogen associated molecular patterns, MAMPs/PAMPs), ενώ μόρια προερχόμενα από φυτοφάγα ζώα ονομάζονται μοριακά πρότυπα σχετιζόμενα με φυτοφάγα ζώα (herbivore-associated molecular patterns, HAMPs). Μοριακά πρότυπα σχετιζόμενα με ζημιές (damage associated molecular patterns, DAMPs) προέρχονται από νεκρωτικό ή τραυματισμένο φυτικό ιστό και από φυτικά κύτταρα σε κατάσταση καταπόνησης και περιλαμβάνουν μονομερή κουτίνης, μικρά πεπτίδια, μόρια του κυτταρικού τοιχώματος και άλλα, τα οποία αναγνωρίζονται από το φυτό και ενεργοποιούνται μηχανισμοί άμυνας. Τα MAMPs περιλαμβάνουν μόρια από την εξωτερική επιφάνεια των μικροβιακών κυττάρων ή εκκρίματα των βακτηριακών κυττάρων, όπως είναι η πρωτεΐνη Flagellin, οι λιποπολυσακχαρίτες, η ένωση Surfactin ή οι πτητικές ενώσεις (Zehra et al., 2021). Και οι τρεις κατηγορίες μορίων ενεργοποιούν την ανοσία που επάγεται από πρότυπα (pattern-triggered

immunity, PTI), η οποία έχει αναφερθεί και ως ανοσία που επάγεται από μόρια MAMPs (MAMP-triggered immunity, MTI) αν πρόκειται για μικρόβια, μέσω αναγνώρισης τους από εξωκυττάριους διαμεμβρανικούς υποδοχείς αναγνώρισης προτύπων (Pattern Recognition Receptors, PRRs) (Dangl et al., 2013).

Ωστόσο, κάποια μικρόβια που μπορεί να είναι είτε παθογόνα, είτε ωφέλιμα, είτε σαπροφυτικά, καθώς και τα έντομα μπορούν να εκκρίνουν διαφορους τελεστές (effectors) στο φυτό ώστε να καταστείλουν την PTI, τις Avr (avirulence) πρωτεΐνες (Nguyen et al., 2021). Αυτό είναι γνωστό ως ευαισθησία που επάγεται από τελεστές (effector-triggered susceptibility, ETS) και συνήθως περιλαμβάνει την καταστολή των ορμονικών αμυντικών μονοπατιών (Han & Kahmann, 2019). Ανθεκτικά φυτά μπορούν να αναγνωρίσουν αυτούς τους τελεστές ή τη δράση τους μέσω των πρωτεϊνών αντοχής (plant resistance proteins, R), συνήθως υποδοχείς που είναι πλούσιοι σε λευκίνη (nucleotide-binding and leucine-rich-repeat-containing receptors), ενεργοποιώντας έτσι ένα δεύτερο επίπεδο άμυνας που ονομάζεται άμυνα που επάγεται από τελεστές (Effector-triggered immunity, ETI) (Nguyen et al., 2021).

Στην περίπτωση αλληλεπίδρασης με βιοτροφικά παθογόνα η ETI συχνά έχει ως αποτέλεσμα την αντίδραση υπερευαισθησίας (hypersensitive response, HR) κατά την οποία παράγονται μεγάλες ποσότητες ενεργών μορφών οξυγόνου (reactive oxygen species, ROS) στο σημείο εισβολής του παθογόνου. Κατά τη διάρκεια των PTI, ETS και ETI, οι φυτικές ορμόνες προκαλούν εκτενή μεταγραφικό επαναπρογραμματισμό και ρυθμίζουν αυστηρά τις φυτικές αποκρίσεις άμυνας οδηγώντας στην εξάλειψη των παθογόνων μικροβίων και εντόμων και εγκατάσταση των ωφέλιμων οργανισμών (Aerts et al., 2021). Η PTI και ETI γενικά θεωρούνταν ως διακριτοί μηχανισμοί του αμυντικού συστήματος των φυτών, ωστόσο πολύ πρόσφατες μελέτες υπέδειξαν αλληλοεξάρτηση σε φυτά *Arabidopsis thaliana* (Nguyen et al., 2021).

Επίκτητη ή Επαγόμενη διασυστηματική αντοχή (ανοσοποίηση) είναι η βιολογική, βιοχημική ή χημική διέγερση λανθάνοντων μηχανισμών αντοχής, ώστε ένα φυτό ευπαθές σε ένα συγκεκριμένο σύστημα ξενιστή-παθογόνου να καθίσταται ανθεκτικό στο ίδιο σύστημα (Τζάμος, 2007). Η Επίκτητη (Systemic Acquired Resistance, SAR) ενεργοποιείται κατόπιν μόλυνσης του ξενιστή με ένα βιοτροφικό (biotrophic) παθογόνο. Αρχικά εκφράζεται στο σημείο εισβολής του παθογόνου με νέκρωση και ξήρανση των ιστών μετά από αντίδραση υπερευαισθησίας (τοπική επίκτητη αντοχή) και στη συνέχεια η αντοχή εκφράζεται και διασυστηματικά σε απομακρυσμένα και μη προσβεβλημένα μέρη του φυτού. Η Επαγόμενη Διασυστηματική Αντοχή (Induced Systemic Resistance, ISR) επιτυγχάνεται με βιολογικούς παράγοντες που δεν προκαλούν τοπική νέκρωση, κατά την οποία οι αμυντικοί μηχανισμοί του φυτού εκφράζονται και μακράν του σημείου διεγέρσεως, ενώ είναι συνήθως επιτυχής έναντι νεκροτροφικών παθογόνων (Pieterse et al., 2012). Έτσι, ο τύπος του φυτοπαθογόνου επηρεάζει τον τύπο των ορμονών που συσσωρεύονται (Aerts et al., 2021). Η βιοτική καταπόνηση επάγει την παραγωγή ελεύθερων ριζών παράγωγων του οξυγόνου, όπως είναι το υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2) που μαζί με τις ορμόνες SA, JA, ET εμπλέκονται στην έναρξη

παραγωγής των φυτοαλεξινών, εναπόθεσης καλλόζης, ενίσχυση του κυτταρικού τοιχώματος και παραγωγή άλλων πρωτεϊνών και μεταβολιτών που εμπλέκονται στην άμυνα (Vlot et al., 2021).

Η SAR θεωρείται πως εξαρτάται από δύο μονοπάτια, ένα εξαρτώμενο από τη σύνθεση του σαλικυλικού οξέος (Salicylic acid, SA), και ένα εξαρτώμενο από το μη πρωτεϊνογόνο αμινοξύ pipecolic acid, ενώ η ISR εξαρτάται από τα σηματοδοτικά μονοπάτια του ιασμονικού οξέος (Jasmonic acid, JA) και αιθυλενίου (ethylene, ET). Το μονοπάτι του JA μπορεί να διαχωριστεί σε δύο παρακλάδια (Pieterse et al., 2012; Vlot et al., 2021). Το παρακλάδι ERF ρυθμίζεται και από το αιθυλένιο (ethylene-ET) και ενεργοποιείται από νεκροτροφικά παθογόνα. Το παρακλάδι MYC ρυθμίζεται και από το αμπσιτικό οξύ (abscisic acid, ABA) και προσφέρει προστασία από τα έντομα μασητικού τύπου, αλλά συντελεί και στο κλείσιμο των στομάτων για περιορισμό των παθογόνων μικροβίων (Vlot et al., 2021). Ο μεταγραφικός παράγοντας MYC2 διαδραματίζει βασικό ρόλο στην ISR στα φύλλα, ενώ στη ρίζα μπορεί να συντελέσει στην παρεμπόδιση της PTI για να διευκολύνει την αποίκιση ωφέλιμων μικροβίων (Vlot et al., 2021). Εκτός από αυτές τις ορμόνες, οι αυξίνη, γιββερελλίνες και κυτοκινίνες επίσης λειτουργούν, σε συνεργισμό ή ανταγωνισμό, ως δευτερογενείς ρυθμιστές της φυτικής ανοσίας, ενώ εμπλέκονται και μόρια όπως το Azelaic Acid και Strigolactones, των οποίων η ακριβής λειτουργία δεν έχει αποσαφηνιστεί (Vlot et al., 2021).

Η SAR χαρακτηρίζεται από αυξημένα επίπεδα της ορμόνης SA που μέσω της πρωτεΐνης NRP1 (NON-EXPRESSOR OF *PR* GENES1) ενεργοποιεί την έκφραση των *PR* (PATHOGENESIS-RELATED) πρωτεϊνών που εμπλέκονται στις αποκρίσεις άμυνας (Pieterse et al., 2014). Αντιθέτως, η ISR περιλαμβάνει μονοπάτι ανεξάρτητο από το SA, με κεντρικά μόρια τα JA και ET όπου τυπικά δεν ενεργοποιούν τα *PR* γονίδια (Pieterse et al., 2014). Ωστόσο, η πρωτεΐνη NRP1 απαιτείται και για την ISR, αν και σε αυτήν την περίπτωση δρα στο κυτταρόπλασμα, ενώ στη SAR δρα στον πυρήνα (Pieterse et al., 2014). Η συσσώρευση του JA εξαρτάται από την έκφραση του γονιδίου της πρωτεΐνης Lipoxygenase (LOX) (Kazan et al., 2008). Τα ένζυμα 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase (ACS) και 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase (ACO) είναι τα κύρια ένζυμα στη βιοσύνθεση του ET (Wang et al., 2002). Η SAR έχει επίσης ιδιότητες μεταβίβασης στην επόμενη γενιά μέσω επιγενετικών αλλαγών που αφορούν τα μοτίβα της μεθυλίωσης του φυτικού DNA σε εκκινητές γονιδίων που σχετίζονται με την άμυνα (Luna et al., 2012; Gkizi et al., 2021a).

Τα σηματοδοτικά μονοπάτια SAR και ISR επηρεάζουν το ένα το άλλο μέσω ενός περίπλοκου δικτύου κυρώς ανταγωνιστικών αλληλεπιδράσεων, που επιτρέπει στα φυτά να τους δίνουν προτεραιότητα ανάλογα με τον τύπο των επιτιθέμενων οργανισμών (Aerts et al., 2021). Το αιθυλένιο μπορεί να καταστείλλει το μονοπάτι του SA και να ενεργοποιήσει το μονοπάτι του JA και το αντίστροφο. Για παράδειγμα, μεταχείριση με το βακτηριακό στέλεχος *Bacillus velezensis* FZB42 προκάλεσε αύξηση των γονιδίων *pr1*, που είναι δείκτης του SA μονοπατιού, και του *pdf1.2* που είναι γονίδιο δείκτης του JA/ET μονοπατιού σε φυτά μαρουλιού, ενώ κατά τη μεταχείριση με το FZB42 και το παθογόνο *Rhizoctonia solani* ενεργοποιήθηκε περισσότερο η έκφραση του *pdf1.2* σε σύγκριση με το *pr1*, του οποίου τα επίπεδα έκφρασης ήταν χαμηλότερα από τη μεταχείριση FZB42 (Chowdhury et

al., 2015). Παρόλο που έχει επικρατήσει η ιδέα της ανταγωνιστικότητας των δύο μονοπατιών, έχουν γίνει παρατηρήσεις που δείχνουν συνεργιστική σχέση μεταξύ SA και JA (Kim et al., 2014; Mine et al., 2017). Ακόμη, έχει αναφερθεί πως αρκετοί ωφέλιμοι μικροοργανισμοί επάγουν ISR που εξαρτάται από το SA (Pieterse et al., 2014; Raymaekers et al., 2020) ή πως ενεργοποιούν και τα δύο μονοπάτια (Niu et al., 2011; Wu et al., 2018; Dimopoulou et al., 2019).

Η ανίχνευση MAMPs παθογόνων οδηγεί σε γρήγορη και ισχυρή αμυντική απόκριση αλλά και σε μείωση της φυτικής ανάπτυξης (Pršic & Ongena, 2020). Οι ωφέλιμοι μικροοργανισμοί δεν ενεργοποιούν τις αμυντικές αποκρίσεις αμέσως, αλλά ευαισθητοποιούν το φυτό για πιο γρήγορη και δυνατή ενεργοποίηση της άμυνας κατά την εμφάνιση του παθογόνου (Pieterse et al., 2014; Pršic & Ongena, 2020), λειτουργώντας ως «εμβόλια» (Kang et al., 2018). Γενικά, η αποίκιση της ρίζας από μικροοργανισμούς που μπορούν να επάγουν την ISR δεν οδηγεί σε άμεση ενίσχυση της βιοσύνθεσης ET και JA στις περισσότερες περιπτώσεις, ωστόσο η έκφραση των γονιδίων που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση και σηματοδότηση του ET βρίσκονται συχνά υπερκφρασμένα (Zamioudis et al., 2015; Roupin et al., 2016).

Ένα ενδιαφέρον βιολογικό ερώτημα που απασχολεί την έρευνα της αλληλεπίδρασης φυτών-μικροβίων είναι με ποιο τρόπο τα φυτά μπορούν να διακρίνουν τη διαφορά μεταξύ παθογόνων και ωφέλιμων μικροβίων. Έχει αναφερθεί πως τα μόρια MAMPs δε φτάνουν για την επαγωγή αποκρίσεων άμυνας στις ρίζες, αλλά απαιτείται συνυπάρχουσα ζημιά στα φυτικά κύτταρα (Zhou F. et al., 2020). Επίσης, τα ωφέλιμα μικρόβια μπορούν να διασπάζουν τα MAMPs πριν αναγνωριστούν από το αμυντικό σύστημα των φυτών (Pel & Pieterse, 2013), αλλά και να καταστείλουν την MTI (Pieterse et al., 2012; Stringlis et al., 2018a; Yu et al., 2019). Έχει αναφερθεί πως η έκφραση κάποιων από τα γονίδια των οποίων οι πρωτεΐνες λειτουργούν ως MAMPs, όπως η Flagellin, καταστέλλεται για να επιτραπεί η εγκατάσταση ωφέλιμης σχέσης με τη ρίζα του φυτού ξενιστή (Stringlis et al., 2018a).

1.6 Ενδοφυτικοί μικροοργανισμοί

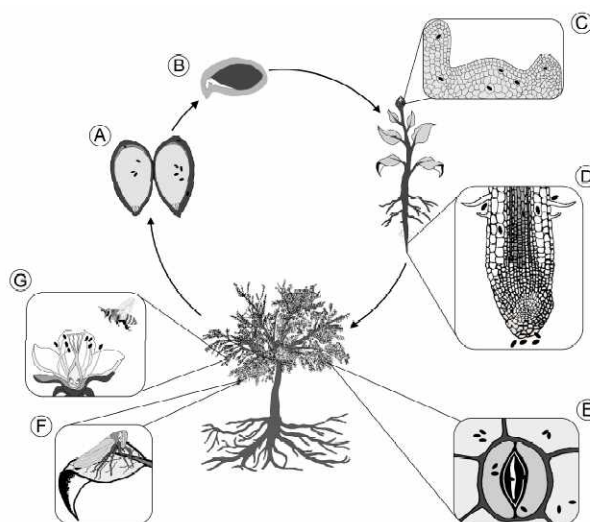
Έχουν διατυπωθεί αρκετοί ορισμοί από τότε που ανακαλύφθηκαν οι ενδοφυτικοί μικροοργανισμοί και όλοι ουσιαστικά αναφέρονται σε μικροοργανισμούς οι οποίοι καθ'όλη τη διάρκεια ή μέρος του βιολογικού τους κύκλου διαβιών στο εσωτερικό των ιστών ζωντανών φυτών χωρίς να προκαλούν ασθένεια (Santoyo et al., 2016). Σε αυτόν τον ορισμό, κάποιες επιστήμονες συμπεριλαμβάνουν τα παθογόνα που βρίσκονται σε λανθάνουσα κατάσταση (Compant et al., 2010; Fesel & Zuccaro, 2016), ή και όχι (Card et al., 2015), ενώ υπάρχει η πρόταση να θεωρούνται όλοι οι μικροοργανισμοί ενδοφυτικοί έως αποδειχθεί η φυτοπαθογόνος δράση τους (Cocq et al., 2017).

Οι ενδοφυτικοί μικροοργανισμοί χωρίζονται σε 3 κατηγορίες σύμφωνα με τους Hardoim και συνεργάτες (2015). Τα «υποχρεωτικά ενδόφυτα» ("obligate endophytes") απαιτούν φυτικό ιστό για την ανάπτυξή τους, με παράδειγμα τις μυκόρριζες. Τα "ευκαιριακά ενδόφυτα" ("opportunistic

endophytes") μπορούν να διαβιούν στην επιφάνεια των φυτικών ιστών ή τη ριζόσφαιρα και σποραδικά να εισέρχονται στην ενδόσφαιρα με τυχαίο τρόπο. Τέλος, τα «προαιρετικά ενδοφυτικά» («facultative endophytes») μπορούν να διαβιούν εκτός του φυτού και να εισέρχονται στην ενδόσφαιρα είτε ενεργητικά είτε παθητικά. Τα ενδοφυτικά των δύο τελευταίων κατηγοριών μπορούν να απομονωθούν μετά την επιφανειακή απολύμανση των φυτικών ιστών (Baldan et al., 2015).

Δεν υπάρχει σχεδόν κανένα φυτό που να μην περιέχει ενδοφυτικούς μικροοργανισμούς (Partida-Martinez & Heil, 2011; Hardoim et al., 2015; Esposito-Polesi et al., 2017). Ενδοφυτικοί μικροοργανισμοί έχουν βρεθεί σε ποικίλους φυτικούς ιστούς, όπως ρίζες, φύλλα, αγγειακό χυμό, κόνδυλους, σπέρματα, καρπούς, φλούδα και πολτός λαχανικών, ακόμη και γύρη (Glassner et al., 2015; Truyens et al., 2015; Zasloff, 2017; Misganaw et al., 2019; de Melo et al., 2021). Ενδοφυτικά βακτήρια βρίσκονται με μεγαλύτερη συγκέντρωση και ποικιλομορφία στο ριζικό σύστημα και το βλαστό, παρά στα φύλλα και τις αναπαραγωγικές δομές (Compant et al., 2011; Bergna et al., 2018), καθώς κύρια πηγή ενδοφυτικών μικροοργανισμών είναι η ριζόσφαιρα.

Τα ενδοφυτικά βακτήρια μπορούν να εισέλθουν στους φυτικούς ιστούς ενεργητικά ή παθητικά (Εικόνα 1.15). Η ενεργητική είσοδος επιτυγχάνεται με τη χρήση ενζύμων που στοχεύουν στη χαλάρωση του κυτταρικού τοιχώματος, τα οποία βοηθούν και στη μετακίνηση από ιστό σε ιστό (Reinhold-Hurek et al., 2006; Compant et al., 2008, 2010; Baldan et al., 2015). Η παθητική είσοδος επιτυγχάνεται από φυσικά ανοίγματα στην επιφάνεια του φυτού, όπως είναι τα στόματα, πληγές, σημεία σχηματισμού πλευρικών ριζών και ριζικών τριχιδίων, φακίδια, καθώς και «hydathodes», τα οποία είναι φυσικά ανοίγματα στην άκρη του φύλλου συνδεδεμένα με τα αγγεία του ξύλου (xylem) (Prieto et al., 2011; Compant et al., 2021; Papik et al., 2020). Έχει επίσης παρατηρηθεί η μεταφορά ενδόφυτων μέσω εντόμων (Frank et al., 2017; Galambos et al., 2021).



Εικόνα 1.15 Οδοί μεταβίβασης των βακτηριακών ενδόφυτων κατά τη διάρκεια ζωής μίας μηλιάς. Α) Κάθετη μετάδοση μέσω σπόρου, Β) Αποίκηση της σπερμόσφαιρας, εικονιζόμενη ως γκρι περιοχή που περιβάλλει το σπόρο, C) Αποίκηση των αναπτυσσόμενων αναπαραγωγικών οργάνων μέσω του κορυφαίου μεριστώματος του βλαστού ως μέρος της κάθετης διαβίβασης, D) Αποίκηση της ρίζας από το έδαφος, E) Αποίκηση των φύλλων από τα στόματα λόγω εναπόθεσης από τον αέρα, F) Μεταβίβαση μέσω μυζητικών εντόμων, G) Μεταβίβαση στα άνθη μέσω γονιμοποιητικών εντόμων. Δεν έχει σχεδιαστεί σε κλίμακα. Εικόνα από το άρθρο των Frank και συνεργατών (2017).

Έχουν γίνει αναφορές για μετακίνηση των ενδόφυτων μεταξύ των υπέργειων και υπόγειων μερών του φυτού μέσω του αγγειακού χυμού (Haruna et al., 2017; Deyett & Rolshausen, 2020; Fazle-Rabbee & Baek 2020). Τα βακτήρια τυπικά αποικίζουν την ενδόσφαιρα της ρίζας στο φλοιό ή το αγγειακό σύστημα και από εκεί μεταφέρονται στο υπέργειο τμήμα του φυτού ενώ κάποια χρησιμοποιούν την αποπλαστική οδό (Hardoim et al., 2015; Miotto-Vilanova et al., 2016; Santoyo et al., 2016; Compant et al., 2020). Τα ενδόφυτα διαβιούν κυρίως στους μεσοκυττάριους χώρους, αλλά έχουν παρατηρηθεί και ενδοκυτταρικά, συγκεκριμένα στο κυτταρόπλασμα και το περίπλασμα (μεταξύ κυτταρικού τοιχώματος και κυτταρικής μεμβράνης) με τους ορισμούς «Cytobacts» και «Peribacts», αντίστοιχα, να χρησιμοποιούνται τα ενδοκυττάρια ενδόφυτα (Thomas & Reddy, 2013; Thomas & Sekhar, 2014; Esposito-Polesi et al., 2017; White et al., 2019), ενώ έχει αναφερθεί η ύπαρξη τους και στον πυρήνα του φυτικού κυττάρου (White et al., 2019).

Για παράδειγμα, κατά την ενδοφυτική αποίκιση της ρίζας, τα βακτήρια πρέπει να περάσουν το εξωδερμικό φράγμα της ρίζας όπου μπορούν να παραμείνουν ή να συνεχίσουν στον αποπλαστικό χώρο του φλοιού της ρίζας. Για να προχωρήσουν περαιτέρω θα πρέπει να ξεπεράσουν την ενδοδερμίδα είτε ενεργητικά μέσω υδρολυτικών ενζύμων, είτε παθητικά μέσω κάποιου σημείου που έχει υποστεί διάρρηξη λόγω σχηματισμού πλευρικής ρίζας ή επίθεση παθογόνων (Compant et al., 2010). Τέλος, πρέπει να διαπεράσουν το περικύκλιο ώστε να φτάσουν στα αγγεία και να μετακινηθούν στο εναέριο τμήμα του φυτού (Compant et al., 2010).

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα ενδόφυτα των σπόρων, καθώς φαίνεται να μεταφέρονται στην επόμενη γενιά των φυτών (Glassner et al., 2017; Shade et al., 2017). Η μεταβίβαση των ενδόφυτων μέσω των σπόρων ονομάζεται κάθετη μεταβίβαση (vertical transmission). Τα ενδοφυτικά βακτήρια πιθανώς μπορούν να επιβιώσουν για μεγάλο χρονικό διάστημα σε ληθαργικούς σπόρους και όταν αυτοί βλαστήσουν, τα ενδόφυτα αποικίζουν το νέο φυτό περνώντας στην επόμενη γενιά ως ωφέλιμα μικρόβια για τη βλάστηση, τη φυτική ανάπτυξη και την παρεμπόδιση παθογόνων (Cherlick, 2017; Verma et al., 2017; Shahzad et al., 2018). Φαίνεται πως τα μικρόβια που βρίσκονται στους σπόρους περιλαμβάνουν το κεντρικό μικροβίωμα για την επόμενη γενιά (Quesada-Moraga et al., 2014). Τα περισσότερο συχνά συναντώμενα βακτηριακά γένη στους σπόρους των φυτών είναι τα *Bacillus*, ίσως λόγω της ικανότητάς του να σχηματίζουν ενδοσπόρια (Truyens et al., 2015; Xu et al., 2014). Τα βακτήρια των σπόρων μπορεί να προέρχονται από τη ριζόσφαιρα και τη φυλλόσφαιρα μέσω μετακίνησης των ενδόφυτων σε άλλους ιστούς, ή από την ανθόσφαιρα και σπερμόσφαιρα, δηλαδή την εξωτερική επιφάνεια ανθέων και καρπών (Nelson, 2018). Μάλιστα, έχει παρατηρηθεί πως ψεκάσμος ταξιανθιών με βακτήρια έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνισή τους στο σπόρο (van der Wolf et al., 2019).

Η σύσταση των ενδοφυτικών στο σπόρο, αλλά και μέσα στο φυτό, όπως και των υπόλοιπων μικροοργανισμών που σχετίζονται με τα φυτά εξαρτάται από διάφορους παράγοντες. Αρχικά, σημαντικό ρόλο διαδραματίζουν παράγοντες σχετιζόμενοι με τον ξενιστή, όπως ο γονότυπος, το στάδιο ανάπτυξης, καθώς και το είδος και η ηλικία των φυτικών ιστών (Andreolli et al., 2016;

Schlemper et al., 2017; Arrigoni et al., 2018; López et al., 2018; Liu et al., 2020; Wu W. et al., 2021). Ακόμη, το περιβάλλον διαδραματίζει επίσης σημαντικό ρόλο, όπως ο τύπος του υποστρώματος, οι κλιματικές συνθήκες, η αβιοτική καταπόνηση, οι καλλιεργητικές πρακτικές και η παρουσία παθογόνων (Griffiths et al., 2019; Eissenberger et al., 2020; Wu W. et al., 2021; Samuel et al., 2022). Στη μελέτη των Bergna και συνεργατών (2018) φάνηκε πως η μικροβιακή σύσταση των σπόρων άλλαζε ανάλογα με τις περιβαλλοντικές συνθήκες που αντιμετώπισε το φυτό, όπως είναι η παρουσία παθογόνων και η έλλειψη θρεπτικών, και κατ'επέκταση το φυτό της επόμενης γενιάς απέκτησε με αυτόν τον τρόπο το κατάλληλο μικροβίωμα ώστε να ανταπεξέλθει στην εκάστοτε συνθήκη.

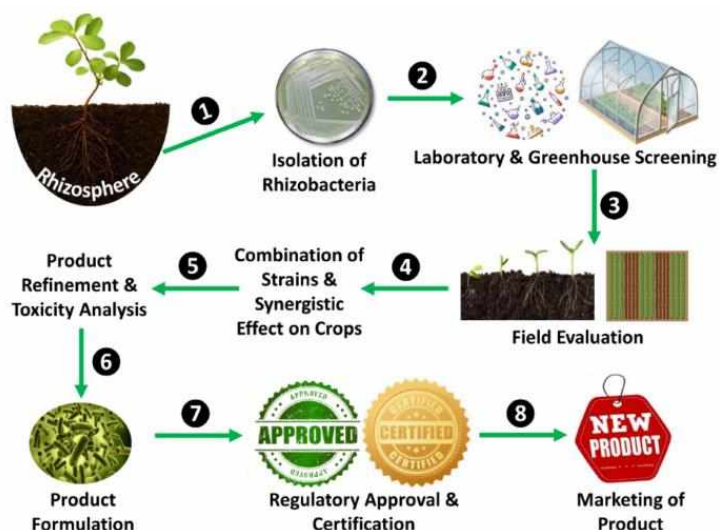
Τα ενδοφυτικά βακτήρια μπορούν να ανήκουν στην κατηγορία των PGPB, προάγοντας τη φυτική ανάπτυξη άμεσα (Liu H. et al., 2017; Afzal et al., 2019; Eid et al., 2021), αλλά και έμμεσα λειτουργώντας ως παράγοντες βιολογικής αντιμετώπισης (Falade et al., 2021; Morales-Cedeno et al., 2021; De Silva et al., 2019), ενώ μπορούν να βελτιώσουν την αντοχή των φυτών σε αβιοτικές καταπονήσεις (Verma et al., 2021). Ακόμη, φαίνεται να είναι χρήσιμα και σε άλλες βιοτεχνολογικές εφαρμογές, όπως στην παραγωγή ενζύμων που χρησιμοποιούνται στις βιομηχανίες (Eid et al., 2021; Falade et al., 2021).

Τα ενδόφυτα παρουσιάζουν κάποια πλεονεκτήματα έναντι των ριζοσφαιρικών μικροβίων. Αρχικά, είναι προστατευμένα από τις ακραίες κλιματικές συνθήκες του περιβάλλοντος και έχουν καλύτερη πρόσβαση σε θρεπτικά, έτσι είναι πιο σίγουρη η επιβίωση και η δράση τους (Santoyo et al., 2016). Ακόμη, έχουν πιο άμεση και έντονη επίδραση στο φυτό, για παράδειγμα κατά την παραγωγή φυτικών ορμονών (Hardoim et al., 2015). Επίσης, μπορούν να είναι πολύ αποτελεσματικά τόσο σε προ- όσο και μετασυλλεκτικές ασθένειες (Morales-Cedeño et al., 2021), ενώ είναι ιδανικά για την καταπολέμηση διασυστηματικών (π.χ. *Fusarium oxysporum*) (Eljounaidi et al., 2016) και λανθάνοντων (π.χ. *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum acutatum*) (Bolívar-Anillo et al., 2020) παθογόνων, αλλά και για την περισσότερο άμεση επαγωγή της διασυστηματικής αντοχής (del Carmen Orozco-Mosqueda et al., 2021; Oukala et al., 2021). Τα προαιρετικά ενδόφυτα μπορούν να επιβιώσουν και στο περιβάλλον της ριζόσφαιρας, οπότε να έχουν ευρεία ωφέλιμη δράση και στο εξωτερικό και στο εσωτερικό του φυτού (Hardoim et al., 2015). Τέλος, κάποια ενδοφυτικά βακτήρια μπορούν να διασπάζουν οργανικές ενώσεις, όπως τα οργανοχλωρικά (organochlorine) ζιζανιοκτόνα, καθιστώντας τα ιδανικά για να μειώσουν τα υπολείμματα στα καλλιεργούμενα φυτά (Germaine et al., 2006). Ακόμη, έχει αναφερθεί πως το φυτό χρησιμοποιεί τα ενδοφυτικά βακτήρια ως πηγή θρέψης επάγοντας τη λύση του βακτηριακού κυττάρου στον περιπλασματικό χώρο των φυτικών κυττάρων της ρίζας μέσω πρόκλησης οξειδωτικής καταπόνησης, μια διαδικασία που ονομάζεται μικροβιοφαγία (microbivory) ή ριζοφαγία (rhizophagy) (Paungfoo-Lonhienne et al., 2010; White et al., 2018).

1.7 Έρευνα βακτηριακών στελεχών για χρήση στη γεωργική πρακτική

Η πορεία προς την ανάπτυξη προϊόντων που περιέχουν μικροοργανισμούς περιέχει συγκεκριμένα βήματα (Εικόνα 1.16) (Backer et al., 2018; Basu et al., 2021). Τα βήματα που προτείνεται να ακολουθούνται είναι τα εξής:

- Απομόνωση βακτηρίων από τη ριζόσφαιρα ή φυτικούς ιστούς
- Γρήγορη διερεύνηση επιθυμητών χαρακτηριστικών σε *in vitro* συνθήκες
- Μελέτη σε συνθήκες ελεγχόμενου περιβάλλοντος, όπως το θερμοκήπιο
- Πειραματισμός σε συνθήκες αγρού σε εύρος φυτικών ειδών, γεωγραφικές περιοχές, τύπους εδαφών και άλλων μεταβλητών παραγόντων
- Αξιολόγηση των πιθανών συνδυασμών στελεχών
- Προσδιορισμός οικότοξικότητας
- Επιλογή μορφής του τελικού σκευάσματος
- Έγκριση του συγκεκριμένου σκευάσματος ώστε να είναι διαθέσιμο στο εμπόριο



Εικόνα 1.16 Χάρτης για την εμπορευματοποίηση των βιολιπασμάτων βασισμένων σε PGPR. Εικόνα από το άρθρο των Basu και συνεργατών (2021).

Ένας από τους παράγοντες που δυσκολεύει τη χρήση των μικροοργανισμών σε μεγάλη κλίμακα από τους αγρότες είναι η έλλειψη αποτελεσματικών και εμπορικά διαθέσιμων στελεχών. Υπάρχουν αρκετές μελέτες για τη δράση βακτηριακών στελεχών έναντι ασθενειών σε προ- και μετασυλλεκτικό στάδιο, αν και όχι τόσες μελέτες σε συνθήκες πεδίου, ωστόσο λίγα σκευάσματα είναι διαθέσιμα στο εμπόριο (Pertot et al., 2015; Calvo et al., 2017; Dimoroulou et al., 2021a). Επίσης, παρατηρείται ασυνέπεια της δράσης και απόδοσης των σκευασμάτων από αγρό σε αγρό ή ακόμα και στον ίδιο αγρό, η οποία μπορεί να οφείλεται σε διάφορους παράγοντες (Basu et al., 2021). Διαφορετικές περιβαλλοντικές συνθήκες, ανταγωνιστικές αλληλεπιδράσεις με το μικροβίωμα του εδάφους και του φυτού, διαφορετικοί τύποι εδαφών και διαθεσιμότητα νερού είναι κάποιοι από τους παράγοντες που ίσως επηρεάζουν την επιβίωση, τον αποικισμό και τους παραγόμενους μεταβολίτες των μικροβίων, μεταβάλλοντας έτσι το ποσοστό επιτυχίας (Fedele et al., 2020; Niu et al., 2021; Pirttillä et al., 2021).

Μάλιστα, έχει παρατηρηθεί διαφορετική επίδραση μικροβιακού εμβολίου σε διαφορετικά σημεία του ίδιου αγρού (Gange & Gadhave, 2018).

Έτσι, πραγματοποιείται μια συνεχής αναζήτηση για νέα αποτελεσματικά βακτηριακά στελέχη. Έχει προταθεί πως η έρευνα τέτοιων μικροβίων πρέπει να στραφεί προς την απομόνωση από το φυτικό «holobiont» και όχι μόνο από τη ριζόσφαιρα, με απομόνωση στελεχών από όλα τα φυτικά όργανα (Pirttillä et al., 2021). Η συνεχής αναζήτηση νέων ικανών βακτηριακών στελεχών, η προσπάθεια βαθύτερης κατανόησης του μηχανισμού δράσης, η ακριβής ταυτοποίηση και η ανάλυση του γονιδιώματος είναι βασικά βήματα για την ανάπτυξη νέων αποτελεσματικών σκευασμάτων (Grady et al., 2019; Raymaekers et al., 2020; Pirttillä et al., 2021).

Εκτός από την εύρεση νέων στελεχών, η έρευνα έχει στραφεί και προς την ανάπτυξη μιγμάτων βακτηρίων που αναφέρεται ότι παρέχουν καλύτερα αποτελέσματα από τα μεμονωμένα στελέχη (Sharma et al., 2009; Hohmann et al., 2020). Ο συνδυασμός ωφέλιμων μικροβιακών στελεχών με αυτό το στόχο αναφέρεται από τη δεκαετία του 1980 (Janisiewicz, 1980), ωστόσο τελευταία έχει αρχίσει η πιο έντονη διερεύνησή τους (Thomloundi et al., 2019).

Η μία προσέγγιση δημιουργίας μίγματος είναι ο συνδυασμός δύο ή περισσότερων στελεχών με επιθυμητά χαρακτηριστικά με βάση διάφορες *in vitro* δοκιμές. Τα στελέχη μπορεί να ανήκουν σε διαφορετικά είδη ή γένη και να έχουν διαφορετικούς συμπληρωματικούς τρόπους δράσης (Niu et al., 2020; Pirttillä et al., 2021; Santoyo et al., 2021). Ακόμη, τα στελέχη μπορεί να ανήκουν στο ίδιο είδος και να έχουν παρόμοια δράση, αλλά να παρουσιάζουν αυξημένη αποτελεσματικότητα (Niu et al., 2020; Santoyo et al., 2021). Πέραν της προσθετικής δράσης, όπου η αποτελεσματικότητα οφείλεται στο άθροισμα των δράσεων των μικροβίων που αποτελούν το μίγμα, μπορεί να παρατηρηθεί και συνεργιστική δράση, δηλαδή ενεργοποίηση μιας νέας ικανότητας λόγω αλληλεπίδρασης των μικροβίων, όπως είναι η παραγωγή νέων αντιμικροβιακών μεταβολιτών (Santoyo et al., 2021). Τέλος, δύο στελέχη μπορεί να έχουν παρόμοιο τρόπο δράσης αλλά να έχουν διαφορετικό εύρος αντοχής σε περιβαλλοντικές ή άλλες συνθήκες ώστε η αποτελεσματικότητα να μην επηρεάζεται από αβιοτικούς παράγοντες (Compant et al., 2019).

Άλλη προσέγγιση δημιουργίας μίγματος είναι ο συνδυασμός μικροβιακών στελεχών με επιθυμητές ιδιότητες, τα οποία είναι αντιπροσωπευτικά στελέχη μιας μικροβιακής κοινότητας εδάφους με κατασταλτικές ιδιότητες ή του φυτικού μικροβιώματος συγκεκριμένου φυτικού είδους, με στόχο τη δημιουργία μιας συνθετικής κοινότητας (Synthetic Community, SynCom) (Antonioni et al., 2017; Tsolakidou et al., 2019; De Souza et al., 2020). Αυτή είναι και μία προσέγγιση μηχανικής του φυτικού μικροβιώματος (plant microbiome engineering) (Pirttillä et al., 2021). Σε αυτές τις κοινότητες φαίνεται πως η συμβατότητα και η ποικιλομορφία στελεχών με μεγάλη γενετική απόσταση είναι σημαντικοί παράγοντες επιτυχίας (Niu et al., 2020).

Μίγματα βακτηρίων έχει αναφερθεί πως παρουσιάζουν βελτιωμένη δράση σε σχέση με τα μεμονωμένα στελέχη, καθώς καλύπτουν ένα ευρύ φάσμα μηχανισμών προώθησης ανάπτυξης των φυτών και βιολογικής αντιμετώπισης, καθώς και εύρος φυτοπαθογόνων μικροοργανισμών (Santoyo et

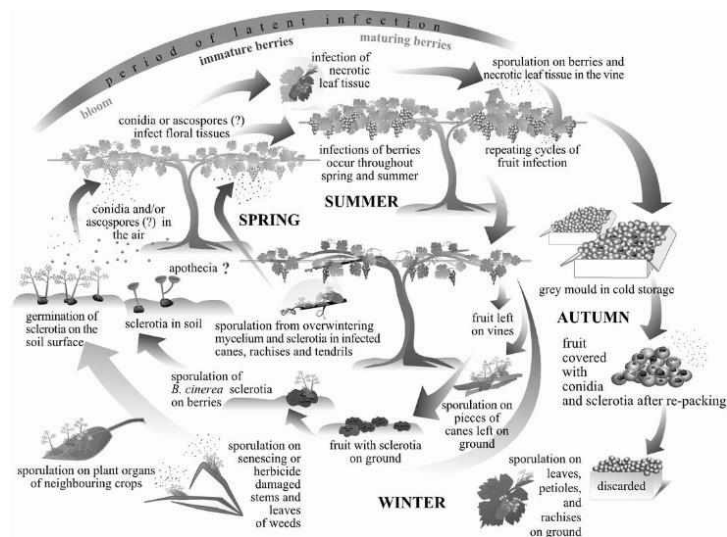
al., 2021). Αντιμικροβιακοί μεταβολίτες μπορεί να βρίσκονται σε χαμηλές συγκεντρώσεις ή να μην παράγονται κατά την αξενική καλλιέργεια, αλλά μπορεί να αυξάνονται κατά τη συγκαλλιέργεια με άλλα μικρόβια, ενώ υπάρχει περίπτωση να παράγονται και νέοι μεταβολίτες (Niu et al., 2020). Ακόμη, έχει αναφερθεί ότι μίγματα μικροβίων είναι καλύτερα στην επαγωγή της φυτικής άμυνας σε σύγκριση με μεμονωμένα στελέχη (Sarma et al., 2015), πιθανώς λόγω παραγωγής μεγαλύτερων ποσοτήτων αντιμικροβιακών ενώσεων και άλλων διεγερτών (Niu et al., 2020). Επιπλέον, έχει αναφερθεί πως μικρόβια σε μίγμα σχηματίζουν περισσότερο ισχυρό βιοϋμένιο απ' ό,τι ως μεμονωμένα (Santhanam et al., 2019). Ωστόσο, η εφαρμογή κάποιων μιγμάτων έχει αναφερθεί πως είχε ως αποτέλεσμα μείωση της ωφέλιμης επίδρασης σε σύγκριση με τα μεμονωμένα στελέχη, υποδεικνύοντας πως πρέπει να γίνει προσεκτική επιλογή των στελεχών που θα απαρτίσουν το μίγμα (Thomloui et al., 2019). Μελέτη μετα-ανάλυσης μελετών με συνδυασμούς BCAs έδειξε πως 10 από τις 465 μεταχειρίσεις έδειξαν συνεργιστική δράση, 70 έδειξαν βελτιωμένη απόδοση και 64 έδειξαν ανταγωνισμό (Xu et al., 2011).

Στην πλειοψηφία των μελετών τα μικρόβια που απαρτίζουν το μίγμα επιλέχθηκαν με βάση τις μεμονωμένες τους ιδιότητες χωρίς να λαμβάνεται υπ' όψιν η πιθανή ανταγωνιστικότητά τους στο μίγμα που ίσως να μειώσει την ωφέλιμη δράση τους (Thomloui et al., 2019). Η συμβατότητα των στελεχών σε ένα μίγμα, δηλαδή η απουσία παρεμπόδισης της ανάπτυξης κάποιου από αυτά, φαίνεται να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο για την επιτυχία τους και πρέπει να εξετάζεται (Thomloui et al., 2019; Niu et al., 2020).

Άλλες μελέτες έχουν δοκιμάσει τη διαδοχική εφαρμογή μικροβιακών ανταγωνιστών και όχι μίγματα, με γνώμονα ποιο μικρόβιο διαθέτει τον τρόπο δράσης ή ανταγωνισμού που συνάδει με τις ανάγκες του φυτού σε κάθε χρονική στιγμή (Pertot et al., 2017; Calvo-Garrido et al., 2019).

1.8 Ο φυτοπαθογόνος μύκητας *Botrytis cinerea*

Ο νεκροτροφικός μύκητας *B. cinerea* είναι ένα από τα σημαντικότερα φυτοπαθογόνα που προκαλεί μεγάλες καταστροφές σε πάνω από 500 φυτικά είδη, ειδικά σε φρέσκους καρπούς και λαχανικά, όπως τομάτα, φράουλα, αγγούρι και σταφύλι οδηγώντας σε απώλειες 10 έως 100 δις δολαρίων παγκοσμίως (Williamson et al., 2017; Hua et al., 2018). Ο μύκητας αυτός διεισδύει σχεδόν σε όλα τα τμήματα ενός φυτού, συμπεριλαμβανομένων των βλαστών, φύλλων, ανθέων, καρπών και σπόρων σε προ- ή μετασυλλεκτικά στάδια (**Εικόνα 1.17**) (Hua et al., 2018). Υπό τις κατάλληλες περιβαλλοντικές συνθήκες, ειδικά σε υψηλή υγρασία και χαμηλή θερμοκρασία, αλλά και απότομη αλλαγή της θερμοκρασίας που μπορεί να προκαλέσει υγρασία, τα τυπικά συμπτώματα της ασθένειας είναι ορατά στους καρπούς και σε όλα τα σημεία του φυτού που έχουν προσβληθεί από το παθογόνο.



Εικόνα 1.17 Προτεινόμενος κύκλος ζωής του φυτοπαθογόνου *Botrytis cinerea* και κύκλος της ασθένειας τεφρά σήψη στους αμπελώνες με οινοποιήσιμα και επιτραπέζια σταφύλια. Εικόνα από το άρθρο των Elmer και Michailidis (2007).

Σπόρια του μύκητα βρίσκονται συνήθως στην επιφάνεια των φυτικών ιστών, τα οποία στην πορεία βλαστάνουν και μολύνουν μέσω επιφανειακών πληγών που προκαλούνται κατά τη διάρκεια της συγκομιδής και των μετέπειτα χειρισμών, ενώ ο μύκητας αναπτύσσεται κατά τη φύλαξη ακόμα και στους 0 °C, και εξαπλώνεται μέσω των μυκηλίων και των κονιδίων που διασπείρονται στον αέρα (De Simone et al., 2020). Επιπλέον, μπορεί να βρεθεί σε ιστούς των ανθέων και να εισέλθει στους καρπούς, αλλά και σε άλλα όργανα, ως ενδοφυτικός μύκητας σε λανθάνουσα κατάσταση (latent, cryptic), όπου μπορεί να αρχίσει τη διαδικασία της μόλυνσης σε ευνοϊκές για εκείνον περιβαλλοντικές συνθήκες ή μετά τον τραυματισμό των καρπών (Shaw et al., 2016; Fedele et al., 2020; Riquelme-Toledo et al., 2020). Υπάρχουν μελέτες που αναφέρουν πως ίσως μπορεί να κινηθεί και διασυστηματικά εντός του φυτού (Sowley et al., 2020; Shaw et al., 2016). Ακόμη, μπορεί να επιβιώσει σε φυτικά υπολείμματα και στο έδαφος κατά τη διάρκεια του χειμώνα, με τη βοήθεια ανθεκτικών δομών που ονομάζονται σκληρώτια. Ωστόσο, μπορεί να αναπτυχθεί και ως σαπρότροφο, για παράδειγμα σε νεκρούς ιστούς πάνω στο βότρυ του σταφυλιού, απ'όπου μπορεί να μολύνει τους ωριμαζόμενους καρπούς αμπέλου (Fedele et al., 2020).

Η καταπολέμηση του *B. cinerea* είναι δύσκολος λόγω του μεγάλου εύρους των ξενιστών του, των διάφορων τρόπων δράσης, καθώς και της δυνατότητας εγγενούς και αγενούς αναπαραγωγής. Ακόμη, ο συγκεκριμένος μύκητας θεωρείται παθογόνο υψηλού κινδύνου για ανάπτυξη ανθεκτικότητας στα φυτοφάρμακα, λόγω του γονιδιώματός του, της γρήγορης αναπαραγωγής του και του μικρού κύκλου ζωής. Έχουν καταγραφεί απομονώσεις με ανθεκτικότητα σε διάφορες ενώσεις φυτοφαρμάκων όπως οι dicarboximides, benzimidazole, phenylpyrrole and hydroxyanilide, η οποία επιτυγχάνεται πολύ πιο γρήγορα όταν γίνεται μεγαλύτερη χρήση των φυτοπροστατευτικών προϊόντων από την προβλεπόμενη (Rotolo et al., 2017; Hua et al., 2018).

1.9 Ενδοφυτικοί μικροοργανισμοί απομονωμένοι από φαρμακευτικά φυτά

Τα αρωματικά και φαρμακευτικά φυτά έχουν αναγνωρισθεί ως παραγωγοί εύρους βιοδραστικών ενώσεων εναντίον πολλών ασθενειών (Alvin et al., 2014). Χρησιμοποιούνται στις πρακτικές της παραδοσιακής ιατρικής, ενώ είναι πηγές βιοδραστικών ενώσεων και στη σύγχρονη ιατρική (Castronovo et al., 2021). Ωστόσο, λόγω της μεγάλης χρήσης των φαρμακευτικών φυτών για την ανακάλυψη φαρμάκων, πολλά από αυτά είναι προστατευόμενα είδη ή κινδυνεύουν από εξαφάνιση (Stojanovic et al., 2013; Alvin et al., 2014). Έτσι, η προσοχή τελευταία έχει στραφεί προς τους ενδοφυτικούς μικροοργανισμούς των φαρμακευτικών φυτών, καθώς φαίνεται να παράγουν καινοφανείς δευτερογενείς μεταβολίτες που αποτελούν ισχυρούς αντιμικροβιακούς παράγοντες (Venieraki et al., 2017; Barman & Bhattacharjee, 2020).

Μάλιστα, έχει βρεθεί πως οι ενδοφυτικοί μικροοργανισμοί μπορούν να παράγουν φυτικούς μεταβολίτες ή να βοηθούν σε κάποιο βήμα του μονοπατιού βιοσύνθεσης. Περισσότερο έχουν μελετηθεί οι ενδοφυτικοί μύκητες όσον αφορά αυτή την ικανότητα και έχει βρεθεί πως παράγουν σημαντικές φυτικές βιοδραστικές ενώσεις, όπως η υπερικίνη και η ταξόλη (Alvin et al., 2014; Venieraki et al., 2017; Ezeobiora et al., 2021). Κάποια ενδοφυτικά βακτήρια επάγουν την παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών στους ξενιστές τους μέσω άγνωστων μηχανισμών, πιθανώς στο πλαίσιο της προώθησης της φυτικής ανάπτυξης (Tripathi et al., 2020). Έχουν βρεθεί και ενδοφυτικά βακτήρια που μπορούν να παράγουν δευτερογενείς μεταβολίτες των φυτών-ξενιστών τους, όπως την αντικαρκινική ένωση Camptothecin από το φυτό *Miquelia dentata* (Shweta et al., 2013), τη βιοδραστική ένωση Theanine από το τσάι *Camellia sanensis* (Sun et al., 2019), ενώ τα περισσότερα βήματα της βιοσύνθεσης της αντικαρκινικής ένωσης Maytansine εκτελούνται από ενδοφυτικά βακτήρια του φυτού *Maytenus serrata* (Kusari et al., 2016). Έχει διατυπωθεί η υπόθεση πως μπορεί να πραγματοποιηθεί οριζόντια γενετική μεταφορά (Horizontal Gene Transfer, HGT) μεταξύ φυτών και ενδοφυτικών μικροοργανισμών και προς τις δύο κατευθύνσεις (Tan et al., 2001; Sudhakar et al., 2013; Tiwari & Bae, 2020).

Φαίνεται πως τα ενδοφυτικά βακτήρια των φαρμακευτικών φυτών έχουν ισχυρή δράση έναντι ανθρωποπαθογόνων βακτηρίων (Cardoso et al., 2020). Ακόμη, έχει αναφερθεί η αυξημένη ανταγωνιστικότητα ενδοφυτικών βακτηρίων των φαρμακευτικών φυτών έναντι φυτοπαθογόνων μικροοργανισμών (Egamberdieva et al., 2017; Wicaksono et al., 2018; Castronovo et al., 2021). Έτσι, τα τελευταία χρόνια έχουν αυξηθεί οι μελέτες των ενδοφυτικών βακτηρίων από φαρμακευτικά φυτά για εύρεση υποσχόμενων PGPB και BCAs. Τέτοιες μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί για ενδόφυτα φυτών όπως τα *Echinacea purpurea* και *Echinacea angustifolia* (Chiellini et al., 2014), *Zingiber officinale* (Jasim et al., 2014), *Stellera chamaejasme* (Jin et al., 2014), *Aloe vera* (Silva et al., 2020) και άλλα.

1.9.1 Το φυτό *Hypericum hircinum*

Το γένος *Hypericum* περιλαμβάνει περισσότερα από 450 είδη και ανήκει στην οικογένεια *Clusiaceae*, που αναφέρεται και ως *Hypericaceae* λόγω των πολυάριθμων μελών του γένους *Hypericum*. Το συγκεκριμένο γένος μπορεί να βρεθεί σχεδόν σε όλο τον κόσμο με εξαίρεση ερήμους, καθώς και τροπικές ή αρκτικές περιοχές.

Πολλά από τα είδη του γένους αυτού παράγουν ένα ευρύ φάσμα βιοδραστικών ενώσεων με αντιμικροβιακές, αντικές, αντιοξειδωτικές, αντικαταθλιπτικές και αντινεοπλασματικές ιδιότητες, ενώ χρησιμοποιείται και στην επάλειψη πληγών και ως ανακουφιστικός παράγοντας σε δερματοπάθειες (Grafakou et al., 2020; Zhang et al., 2020). Οι πιο γνωστές ενώσεις είναι η υπερικίνη και η ψευδοϋπερικίνη που έχουν αντικαταθλιπτική δράση, ωστόσο, αυτές οι ενώσεις βρίσκονται σε συγκεκριμένα είδη (π.χ. *Hypericum perforatum*), ενώ οι υπόλοιπες βιοδραστικές ενώσεις είναι κοινές σε όλα τα είδη (Ayan & Çirak, 2008; Stojanovic et al., 2013). Μελέτη εκχυλισμάτων του φυτού *Hypericum hircinum* ανέδειξε τις εξαιρετικές αντιμικροβιακές του ιδιότητες έναντι στελεχών *Penicillium* spp., *Aspergillus* spp. και non-*albicans Candida* spp. ευαίσθητα και ανθεκτικά στην ένωση fluconazole, ενώ δεν είχε κυτταροτοξικότητα σε ανθρώπινα κύτταρα, υποδεικνύοντας τη χρήση του για παθήσεις του αναπνευστικού (Tocci et al., 2018).

Δεν έχει πραγματοποιηθεί κάποια μελέτη για τα ενδοφυτικά βακτήρια του φυτού *Hypericum hircinum*, ωστόσο έχουν πραγματοποιηθεί προκαταρκτικές σαρώσεις ενδοφυτικών βακτηρίων από τα φυτά *Hypericum perforatum* και *Hypericum sileonides* (López-Fuentes et al., 2012; Egamberdieva et al., 2017).

1.9.2 Το φυτό *Teucrium polium*

Το *Teucrium polium* L. (συν. *Teucrium capitatum* L.) ανήκει στην οικογένεια *Lamiaceae*, και είναι ένα από τα περίπου 300 είδη του γένους *Teucrium*. Συναντάται στην Ευρώπη, Βόρεια Αφρική και τις εύκρατες περιοχές της Ασίας.

Μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τις διαταραχές του πεπτικού συστήματος, διάφορες φλεγμονές, για την αντιμετώπιση του διαβήτη και των ρευματισμών, ενώ θεωρείται και τονωτικό (Rahmouni et al., 2021). Οι αρχαίοι Έλληνες πίστευαν ότι γιατρεύει όλες τις παθήσεις, κάτι σαν πανάκεια, ενώ στο στο φυτολογικό λεξικό του Θεόφραστου αναφέρεται ότι στην λαϊκή θεραπευτική χρησιμοποιείται για παθήσεις της αναπνευστικής οδού και δερματικά προβλήματα. Ακόμη, φαίνεται να έχει αντινεοπλασματικές και αντιμεταλλαξιγόνες επιδράσεις σε διάφορες κυτταρικές σειρές (Alfreshidi et al., 2020). Τέλος, φαίνεται να είναι αποτελεσματικό έναντι εύρους κλινικών παθογόνων (Darabpour et al., 2010).

Υπάρχουν δύο μελέτες που αφορούν ενδοφυτικά βακτήρια από φυτό *T. polium* στην Αίγυπτο, οι οποίες αναφέρονται σε προκαταρκτική διερεύνηση αντιμικροβιακών και άλλων ιδιοτήτων τους *in vitro* (Selim et al., 2011; Hassan et al., 2017).

2. ΣΚΟΠΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Πρωταρχικός στόχος της διδακτορικής διατριβής ήταν η εύρεση υποσχόμενων ενδοφυτικών βακτηρίων για χρήση ως εμβόλια στη γεωργία, προερχόμενα από τα αρωματικά φυτά *Teucrium polium* και *Hypericum hircinum*, τα οποία δεν έχουν μελετηθεί προς αυτή την κατεύθυνση. Υποσχόμενα βακτηριακά στελέχη θα αναδειχθούν μέσα από πολλαπλές σαρώσεις και θα συγκεντρώνουν επιθυμητά χαρακτηριστικά προώθησης της ανάπτυξης των φυτών, περιβαλλοντικής προσαρμογής, κινητικότητας, ενώ θα έχουν και θετική επίδραση στην *in vitro* ανάπτυξη των φυτών *Arabidopsis thaliana* Col-0 και *Solanum lycopersicum* var. Chondrokatsari Messinias (τομάτα). Μέσα από τις δοκιμές των επιλεγμένων στελεχών θα αναδειχθούν τα περισσότερο κατάλληλα στελέχη που θα προκαλούν άμεση προώθηση της ανάπτυξης φυτών τομάτας, αλλά και έμμεση προώθηση της ανάπτυξης μέσω επαγωγής της διασυστηματικής αντοχής των φυτών εναντίον του φυτοπαθογόνου *Botrytis cinerea*. Ένας ακόμη στόχος είναι η μελέτη μιγμάτων ζευγών βακτηριακών στελεχών όσον αφορά τη συμβατότητα και τη δράση τους, αλλά και η διερεύνηση της συσχέτισης μεταξύ συμβατότητας *in vitro* και *in planta*, καθώς και η συσχέτιση συμβατότητας και δράσης. Η συγκεκριμένη διδακτορική διατριβή θα συμβάλλει στην προώθηση της γνώσης για τις λειτουργίες και γεωργικές εφαρμογές των ενδοφυτικών βακτηρίων.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Θρεπτικά μέσα ανάπτυξης μικροοργανισμών και φυτών

Τα υγρά θρεπτικά μέσα που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών ήταν τα ακόλουθα:

- Nutrient Broth (NB, CONDA)
- Potato Dextrose Broth (PDB)

Τα στερεά θρεπτικά μέσα που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών ήταν τα ακόλουθα:

- Nutrient Agar (NA, CONDA)
- Potato Dextrose Agar (PDA, CONDA)

Στην περίπτωση που απαιτούνταν διαφορετική συγκέντρωση άγαρ τα στερεά θρεπτικά παρασκευάζονταν από τα υγρά προσθέτοντας την απαιτούμενη ποσότητα άγαρ (bacteriological agar, OXOID ή Agar, FLUKA)

Το θρεπτικό υπόστρωμα που χρησιμοποιήθηκε για την ανάπτυξη των φυτών *in vitro* ήταν το Moorashige & Skoog (με βιταμίνες) (MS), χρησιμοποιώντας τη μισή συγκέντρωση (2.22 gr/L) (1/2 MS). Στο θρεπτικό αυτό, ανάλογα με τις συνθήκες του πειράματος, πραγματοποιούταν η προσθήκη σουκρόζης (0.5% w/v), η προσθήκη άγαρ (0.8% w/v). Όλα τα θρεπτικά μέσα, μετά την παρασκευή τους, αποστειρώνονταν σε αυτόκαστο στους 121 °C για 20 λεπτά.

3.2 Ενδοφυτικά βακτηριακά στελέχη

3.2.1 Προέλευση

Τα ενδοφυτικά βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή τη μελέτη προέρχονται από φύλλα και ριζικό σύστημα δύο αρωματικών-φαρμακευτικών φυτών, συγκεκριμένα του *Teucrium polium* και *Hypericum hircinum* και είχαν απομονωθεί σε προηγούμενες μεταπτυχιακές μελέτες του εργαστηρίου (Θωμλούδη, 2018; Δάβαρη, 2019). Τα συγκεκριμένα φυτά συλλέχθηκαν από τον πειραματικό αγρό του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών στα Σπάτα το Δεκέμβριο του 2016 σε συνεργασία με την κ. Γαρυφαλλιά Οικονόμου, Καθηγήτρια του Εργαστηρίου Γεωργίας του ΓΠΑ, που μας παρείχε τον προσδιορισμό των φυτικών ειδών.

Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε για την απολύμανση των φυτικών ιστών βασίστηκε στους Kusari και συνεργάτες (2008, 2012). Αρχικά, ακέραια φύλλα και ρίζα καθαρίστηκαν σε τρεχούμενο νερό βρύσης και στη συνέχεια με απιονισμένο νερό. Στη συνέχεια εμβαπτίστηκαν σε 70% αιθανόλη

για 1 λεπτό με παράλληλη ανάδευση. Οι επόμενες ενέργειες πραγματοποιήθηκαν μέσα σε αποστειρωμένο θάλαμο νηματικής ροής. Οι φυτικοί ιστοί εμβαπτίστηκαν σε διάλυμα 5% (v/v) εμπορικής χλωρίνης και 0.1% (v/v) Tween 20 για 3 λεπτά με παράλληλη ανάδευση. Στη συνέχεια, οι ιστοί εμβαπτίστηκαν σε διάλυμα αιθανόλης 70% (v/v) για 30 δευτερόλεπτα με παράλληλη ανάδευση. Τέλος, οι ιστοί εκπλύθηκαν διεξοδικά με αποστειρωμένο διπλά απιονισμένο ύδωρ (ddH₂O) ώστε να απομακρυνθούν τα αποστειρωτικά μέσα που χρησιμοποιήθηκαν και τοποθετήθηκαν σε αποστειρωμένο απορροφητικό χαρτί για να στεγνώσουν. Το σύνολο του κάθε φυτικού ιστού πολτοποιήθηκε σε ιγδίο με τη βοήθεια ποσότητας 2 ml αποστειρωμένου διπλά απιονισμένου ύδατος (ddH₂O). Ποσότητα από τη φυτική πάστα και από τις διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις της επιστρώθηκαν σε στερεό υπόστρωμα Nutrient Agar (NA) και ακολούθησε επώαση στους 30 °C. Δείγματα ακέραιων και επιφανειακά απολυσμένων ιστών, καθώς και δείγματα από την τελευταία έκπλυση χρησιμοποιήθηκαν για την επιβεβαίωση της επιτυχούς απολύμανσης. Στο τέλος, επιλέχθηκαν 50 μοναδιαίες αποικίες από κάθε ιστό, με τρόπο ώστε να επιλεγθούν όλες οι αποικίες με διαφορετική μορφολογία, για αποθήκευση και περαιτέρω χαρακτηρισμό. Οι κωδικές ονομασίες υποδηλώνουν το φυτό και τον ιστό προέλευσης. Για παράδειγμα, το κωδικό όνομα Ter υποδηλώνει ότι το στέλεχος απομονώθηκε από το ριζικό σύστημα του φυτού *Teucrium polium*, ενώ το Hil υποδηλώνει ότι το στέλεχος απομονώθηκε από τα φύλλα του *Hypericum hircinum*. Τα απομονωμένα στελέχη είναι θεωρούμενα ενδοφυτικά (putative endophytes), ωστόσο, για χάριν συντομίας, θα αναφέρονται ως ενδοφυτικά.

3.2.2 Συντήρηση-Καλλιέργεια

Καλλιέργειες μοναδιαίων αποικιών των αρχικών ενδοφυτικών απομονώσεων φυλάσσονται σε σωλήνες με 20% (v/v) γλυκερόλη στους -80 °C για μακροχρόνιο διάστημα. Από αυτό το stock έγινε ανακαλλιέργεια όσες φορές χρειάστηκε σε αποστειρωμένο υγρό θρεπτικό μέσο NB και γραμμωτή ανακαλλιέργεια σε στερεό θρεπτικό μέσο NA για βραχυχρόνια φύλαξη του στελέχους στους 4 °C.

3.2.3 Δημιουργία εμβολίου

Ως εμβόλιο για χρήση σε πειραματικές διαδικασίες χρησιμοποιήθηκε καλλιέργεια μικρής ή μεγάλης κλίμακας. Για την ανάπτυξη καλλιέργειας μικρής κλίμακας (προκαλλιέργεια) μοναδιαία αποικία εμβολιάστηκε σε 5 ml υγρού αποστειρωμένου θρεπτικού μέσου NB και ακολούθησε επώαση στους 30 °C υπό συνεχή ανάδευση για 18-20 ώρες στα 200-250 rpm. Σε περίπτωση που χρησιμοποιήθηκαν στελέχη ανθεκτικά σε αντιβιοτικά, στο υγρό θρεπτικό μέσο προστέθηκε αντιβιοτικό rifampicin (50 µg/ml), streptomycin (100 µg/ml), ampicillin (100 µg/ml) ή tetracyclin (10 µg/ml), ανάλογα με το στέλεχος. Για την ανάπτυξη καλλιέργειας μεγάλης κλίμακας ποσότητα 100 µl από την προκαλλιέργεια εμβολιάστηκε σε 50 ml αποστειρωμένου υγρού θρεπτικού υλικού NB και ακολούθησε επώαση στους 30 °C υπό συνεχή ανάδευση για 4-6 ώρες μέχρις ότου η συγκέντρωση των κυττάρων να είναι 10⁸ CFU/ml. Αυτό ελέγχθηκε με τη μέτρηση της οπτικής πυκνότητας σε μήκος

κύματος 600 nm (OD_{600}) με χρήση φωτόμετρου, ώστε $OD_{600}=0.45-0.55$, ανάλογα με το βακτηριακό στέλεχος. Για τα πειράματα θερμοκηπίου η ανάπτυξη καλλιέργειας σε μεγάλη κλίμακα πραγματοποιήθηκε με τον εμβολιασμό 1 ml από την προκαλλιέργεια σε 250 ml ml αποστειρωμένου υγρού θρεπτικού υλικού NB, ενώ ακολούθησε επώαση 18-20 ωρών για την απόκτηση $OD_{600}=1$, που αντιστοιχεί σε 10^8 CFU/ml.

3.2.4 Προσδιορισμός συγκέντρωσης ζωντανών κυττάρων (Colony Forming Units, CFU)

Για να προσδιοριστεί η συγκέντρωση των ζωντανών κυττάρων σε ορισμένη τιμή οπτικής πυκνότητας (OD_{600}), ποσότητα 100ml από την καλλιέργεια υπέστη διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις με αποστειρωμένο υγρό θρεπτικό NB. Από κάθε αραιώση ποσότητα 100 μl επιστρώθηκε σε στερεό θρεπτικό μέσο NA, τα τρυβλία επώαστηκαν για 20 ώρες στους 30 °C και καταμετρήθηκαν οι αποικίες. Για κάθε αραιώση πραγματοποιήθηκαν 3 τεχνικές επαναλήψεις. Για κάθε στέλεχος, αυτή η διαδικασία επαναλήφθηκε 3 ανεξάρτητες φορές. Μετά τον προσδιορισμό της τιμής OD_{600} που αντιστοιχεί σε 10^8 CFU/ml για κάθε βακτήριο, γίνονταν επιβεβαιωτικές διαδοχικές αραιώσεις με 3 τεχνικές επαναλήψεις μετά από κάθε πείραμα. Η συγκέντρωση των ζωντανών κυττάρων (CFU/ml) προσδιορίστηκε με βάση τον παρακάτω τύπο:

$$\frac{\text{Αριθμός αποικιών}}{\text{Όγκος επίστρωσης (ml) x Αραίωση}}$$

3.3 Φυτοπαθογόνοι μύκητες

Οι φυτοπαθογόνοι μύκητες που χρησιμοποιήθηκαν στη συγκεκριμένη μελέτη ήταν στελέχη των *Rhizoctonia solani* (Εργαστήριο Γενικής και Γεωργικής Μικροβιολογίας, ΓΠΑ), *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* (Εργαστήριο Γενικής και Γεωργικής Μικροβιολογίας, Τμήμα Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής, ΓΠΑ), *Botrytis cinerea* (Εργαστήριο Γενικής και Γεωργικής Μικροβιολογίας, Τμήμα Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής, ΓΠΑ), *Colletotrichum acutatum* (Εργαστήριο Γεωργικής Γενετικής και Βιοτεχνολογίας, Τμήμα Γεωπονίας, ΠΑ.ΠΕΛ), *Pythium debaryanum* (Μπενάκειο Φυτοπαθολογικό Ινστιτούτο). Οι συγκεκριμένοι μύκητες επιλέχθηκαν καθώς αποτελούν παθογόνα σε εύρος φυτικών ξενιστών και οργάνων, με σημαντικές απώλειες παγκοσμίως.

3.3.1 Συντήρηση των μυκήτων

Οι φυτοπαθογόνοι μύκητες ανακαλλιεργούνταν σε στερεό θρεπτικό μέσο PDA μέσω μεταφοράς κομματιού από παλαιά καλλιέργεια, επώαζονταν στους 25 °C έως την πλήρη κάλυψη του τρυβλίου και φυλάσσονταν στους 4°C.

3.3.2 Δημιουργία εμβολίου μόλυνσης

Οι φυτοπαθογόνοι μύκητες εμβολιάζονταν είτε σε στερεή μορφή (υφές), είτε σε υγρή μορφή (σπόρια). Για τη δημιουργία στερεού εμβολίου, αφαιρέθηκε κομμάτι θρεπτικού υλικού με υφές από ανακαλλιέργεια μύκητα σε PDA που έχει καλύψει το τρυβλίο με τη βοήθεια φελλοτρυπητήρα με σπή διαμέτρου 8 mm και τοποθετήθηκε σε καινούργιο τρυβλίο PDA. Για τη δημιουργία υγρού εμβολίου, ποσότητα αποστειρωμένου απιονισμένου νερού προστέθηκε σε στερεή καλλιέργεια μύκητα 10-15 ημερών και ακολούθησε ελαφρύ ξύσιμο των υφών με λυγισμένη πιπέτα Pasteur, ώστε να ελευθερωθούν τα σπόρια. Στη συνέχεια το εναιώρημα αυτό συλλέχθηκε και φιλτραρίστηκε με αποστειρωμένο τούλι ή γάζα. Η συγκέντρωση των σπορίων προσδιορίστηκε με τη βοήθεια αντικειμενοφόρου πλάκας Neubauer και προσαρμόστηκε με αραιώση ή συμπύκνωση στην εκάστοτε επιθυμητή συγκέντρωση.

Για τον εμβολιασμό του μύκητα *B. cinerea* σε φύλλα φυτών τομάτας, προστέθηκε διάλυμα 0.5% (v/v) 20 mM γλυκόζης και 0.25% (v/v) 20 mM φωσφορικού καλίου (K_2HPO_4) στο εναιώρημα των σπορίων, καθώς φαίνεται να συμβάλλει στην παθογένεια (Harel et al., 2013).

3.4 Φυλογενετική ταξινόμηση ενδοφυτικών βακτηρίων

Για τη φυλογενετική ταξινόμηση των επιλεγμένων βακτηρίων χρησιμοποιήθηκε η ήδη αλληλουχημένη περιοχή 16S rDNA. Οι αλληλουχίες υποβλήθηκαν ως ερώτημα (query) στο πρόγραμμα BLASTn® (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) στοχεύοντας τη βάση δεδομένων των 16S rDNA αλληλουχιών, χωρίς αλλαγή των προκαθορισμένων ρυθμίσεων του προγράμματος. Αφού βρέθηκαν τα πιο κοντινά στελέχη, όλες οι αλληλουχίες υποβλήθηκαν σε πολλαπλή στοίχιση και περικόπηκαν με το πρόγραμμα MUSCLE, ενώ στη συνέχεια κατασκευάστηκε το φυλογενετικό δέντρο με το λογισμικό MEGA X (Kumar et al., 2018). Για την κατασκευή του δέντρου χρησιμοποιήθηκε ο αλγόριθμος Neighbour-Joining (NJ) (Saitou & Nei, 1987) και οι παράμετροι που επιλέχθηκαν ήταν το μοντέλο kimura-2-parameter, μερική διαγραφή (partial deletion) και 1000 επαναλήψεις (bootstraps). Οι αλληλουχίες έχουν κατατεθεί στη βάση δεδομένων NCBI US National Center of Biotechnological Information (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) και έχουν λάβει τα παρακάτω accession numbers (Πίνακας 3.1).

Πίνακας 3.1 Αριθμοί πρόσβασης των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών του 16S rRNA γονιδίου των στελεχών που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή τη διατριβή, οι οποίες έχουν καταταχθεί στη βάση δεδομένων NCBI.

Φυτό (και ιστός) προέλευσης	Στέλεχος	Accession Number (NCBI)
<i>Hypericum hircinum</i> -φύλλα	Hir14	MW672513
<i>Hypericum hircinum</i> -ριζικό σύστημα	Hir102	MW673769
<i>Hypericum hircinum</i> -ριζικό σύστημα	Hir105	MW673768
<i>Hypericum hircinum</i> -ριζικό σύστημα	Hir110	MW673780
<i>Hypericum hircinum</i> -ριζικό σύστημα	Hir115	MW672122
<i>Hypericum hircinum</i> -ριζικό σύστημα	Hir119	MW672517
<i>Hypericum hircinum</i> -ριζικό σύστημα	Hir127	MW672595
<i>Hypericum hircinum</i> -ριζικό σύστημα	Hir131	MW672398
<i>Hypericum hircinum</i> -ριζικό σύστημα	Hir138	MW673767
<i>Hypericum hircinum</i> -ριζικό σύστημα	Hir139	MW673772
<i>Hypericum hircinum</i> -ριζικό σύστημα	Hir147	MW672515
<i>Hypericum hircinum</i> -ριζικό σύστημα	Hir148	MW672518
<i>Hypericum hircinum</i> -ριζικό σύστημα	Hir149	MW672520
<i>Teucrium polium</i> -φύλλα	Tel31	MW669573
<i>Teucrium polium</i> -φύλλα	Tel34	MW672501
<i>Teucrium polium</i> -φύλλα	Tel36	MW698959
<i>Teucrium polium</i> -φύλλα	Tel40	MW672516
<i>Teucrium polium</i> -φύλλα	Tel42	MW669574
<i>Teucrium polium</i> -φύλλα	Tel43	MW672583
<i>Teucrium polium</i> -φύλλα	Tel46	MW672514
<i>Teucrium polium</i> -φύλλα	Tel51	MW672519
<i>Teucrium polium</i> -φύλλα	Tel52	MW673771
<i>Teucrium polium</i> -φύλλα	Tel54	MW672114
<i>Teucrium polium</i> -ριζικό σύστημα	Ter61	MW672512
<i>Teucrium polium</i> -ριζικό σύστημα	Ter67	MW698957
<i>Teucrium polium</i> -ριζικό σύστημα	Ter70	MW698955
<i>Teucrium polium</i> -ριζικό σύστημα	Ter74	MW672581
<i>Teucrium polium</i> -ριζικό σύστημα	Ter78	MW698956
<i>Teucrium polium</i> -ριζικό σύστημα	Ter80	MW698960
<i>Teucrium polium</i> -ριζικό σύστημα	Ter82	MW673781
<i>Teucrium polium</i> -ριζικό σύστημα	Ter90	MW672116

3.5 Αλληλεπιδράσεις βακτηριακών στελεχών

3.5.1 Δοκιμή σχηματισμού γραμμής οριοθέτησης κατά την ομαδική κίνηση σε επιφάνειες (Swarm boundary assay)

Αρχικά, ποσότητα από βακτηριακές καλλιέργειες μεγάλης κλίμακας (Κεφ. 3.2.3) φυγοκεντρήθηκε στις 8000 στροφές για 10 λεπτά και έγινε επαναδιάλυση του ιζήματος με αποστειρωμένο υγρό θρεπτικό NB. Στη συνέχεια, ποσότητα 4 μl από τα επαναδιαλυμένα κύτταρα ενός στελέχους τοποθετήθηκε με τη μορφή κηλίδας (spot) 2 cm από την άκρη τρυβλίου που περιείχε ημιστερεό θρεπτικό μέσο NA με περιεκτικότητα σε άγαρ 0.5% (w/v). Ακολούθως, ποσότητα 4 μl από τα επαναδιαλυμένα κύτταρα ενός άλλου στελέχους τοποθετήθηκε με τη μορφή κηλίδας (spot) σε απόσταση 2 cm αντιδιαμετρικά της πρώτης κηλίδας. Με αυτή τη διαδικασία εξετάστηκαν όλα τα πιθανά ζεύγη στελεχών. Τα τρυβλία επωάστηκαν στους 30 °C για 8-15 ημέρες και φωτογραφίζονταν ανά τακτά χρονικά διαστήματα για την αξιολόγηση του φαινοτύπου αλληλεπίδρασης.

3.5.2 Μέθοδος υπερκείμενης έγχυσης άγαρ (Soft agar overlay assay)

Ποσότητα από βακτηριακές καλλιέργειες μεγάλης κλίμακας (Κεφ. 3.2.3) είτε φυγοκεντρήθηκε στις 8000 στροφές για 10 λεπτά και έγινε επαναδιάλυση του ιζήματος με αποστειρωμένο υγρό θρεπτικό NB είτε χρησιμοποιήθηκε αυτούσια μαζί με το υπερκείμενο. Ποσότητα 2 ml από αυτό το εναιώρημα αναμίχθηκε με 20 ml θρεπτικού NA με περιεκτικότητα σε άγαρ 0.7% (w/v), πριν ακόμα αυτό πήξει (top agar). Το μίγμα που προέκυψε περιχύθηκε ομοιόμορφα σε τετράγωνο τρυβλίο (12x12 cm) που περιείχε στερεοποιημένο θρεπτικό NA με περιεκτικότητα σε άγαρ 1.5 % (w/v) (bottom agar) και αφήθηκε να πήξει. Στη συνέχεια, σχηματίστηκαν πηγαδάκια διαμέτρου 8 mm με τη βοήθεια αποστειρωμένου φελλοτρυπητήρα (cork borer) και εμβολιάστηκε ποσότητα 50 μl από τις φυγοκεντρημένες καλλιέργειες όλων των βακτηρίων (1 στέλεχος/πηγαδάκι). Αυτή η διαδικασία επαναλήφθηκε για όλα τα εξεταζόμενα στελέχη την ίδια ημέρα, όπου ένα στέλεχος βρισκόταν στο top agar ενώ όλα τα στελέχη βρίσκονταν στα πηγαδάκια. Τέλος, τα τρυβλία επώαστηκαν στους 30 °C για 20 ώρες και καταγράφηκε η ύπαρξη διαφανούς ζώνης (νεκρά κύτταρα) γύρω από το κάθε πηγαδάκι. Υπήρχαν 3 τεχνικές επαναλήψεις για κάθε στέλεχος και το πείραμα πραγματοποιήθηκε ανεξάρτητα 3 φορές.

3.6 Δοκιμές για χαρακτηριστικά προώθησης ανάπτυξης των φυτών *in vitro*

3.6.1 Διαλυτοποίηση φωσφόρου

Η ικανότητα των απομονωμένων ενδοφυτικών βακτηρίων να διαλυτοποιούν το φώσφορο εξετάστηκε με την ανάπτυξή τους σε θρεπτικό μέσο στερεό θρεπτικό μέσο Pikovskaya (PVK agar) (Pikovskaya, 1948; Paul & Sinha, 2017).

Το μέσο αυτό παρασκευάστηκε με προσθήκη όλων των στερεών συστατικών του (1% γλυκόζη, 0.5% $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, 0.05% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.01% $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 0.02% KCl, 0.05% εκχύλισμα ζύμης, 0.0002% $\text{MnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 0.0002% $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ και 1.5% άγαρ) σε απιονισμένο νερό και αποστείρωση στους 121 °C για 20'. Μετά την αποστείρωση, ακολούθησε καλή ανάδευση του θρεπτικού και διαμοίραση στα τρυβλία. Στη συνέχεια, σχηματίστηκε ένα πηγαδάκι διαμέτρου 2mm στο κέντρο του τρυβλίου με τη βοήθεια φελλοτρυπητήρα, όπου εμβολιάστηκε ποσότητα 10 μl από βακτηριακή καλλιέργεια 18-20 ωρών. Πραγματοποιήθηκε επώαση στους 30 °C για 7 ημέρες. Η δημιουργία διαφανής άλω γύρω από το σημείο εμβολιασμού του βακτηρίου υποδήλωσε τη διαλυτοποίηση του ιζηματοποιημένου φωσφόρου του θρεπτικού μέσου. Πραγματοποιήθηκαν 3 τεχνικές επαναλήψεις, ενώ συνολικά το πείραμα πραγματοποιήθηκε ανεξάρτητα άλλες 2 φορές για επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων. Η ένταση διαλυτοποίησης του ιζηματοποιημένου φωσφόρου προσδιορίστηκε από τη διάμετρο της διαφανούς άλω μετά από 7 ημέρες επώασης χρησιμοποιώντας μια αυθαίρετη κλίμακα διαβάθμισης που συγκρίνει τα εξεταζόμενα στελέχη μεταξύ τους. Συγκεκριμένα, η παραγωγή ορίστηκε ως αρνητική (-, negative, neg) σε απουσία διαφανούς άλω,

χαμηλή (+, low) σε παρουσία άλω διαμέτρου μικρότερη από 0.6 cm, μέτρια (++, moderate, mod) σε παρουσία άλω διαμέτρου 0.6-1.2 cm και υψηλή (+++, high) σε παρουσία άλω διαμέτρου μεγαλύτερη των 1.2 cm.

3.6.2 Παραγωγή σιδηροφόρων μορίων

Τα σιδηροφόρα μόρια είναι μικρά μόρια με ισχυρή ικανότητα να συμπλοκοποιούν τον δεσμευμένο σίδηρο και να τον καθιστούν βιοδιαθέσιμο. Η παραγωγή τέτοιων μορίων ελέγχεται σε στερεό θρεπτικό μέσο Chrome Azurol S (CAS) (Schwyn και Neilands, 1987). Αυτό το στερεό θρεπτικό μέσο περιέχει 2 βασικά διαλύματα. Το πρώτο είναι ο δείκτης Fe-CAS (100 ml) και το δεύτερο είναι το θρεπτικό μέσο King's B με 1 % γλυκερόλη και 1,5% αγαρ (900ml). Το πρώτο διάλυμα περιέχει 10 ml 1mM $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ σε 10 mM HCl, 50 ml υδατικού διαλύματος CAS (1.21 mg/ml) και 40 ml υδατικού διαλύματος HDTMA (CTAB) (1.82 mg/ml). Το CAS προστέθηκε στο διάλυμα σιδήρου με συνεχές ανακάτεμα και τέλος προστέθηκε το διάλυμα HDTMA. Ο δείκτης Fe-CAS και το θρεπτικό μέσο King's B αποστειρώθηκαν ξεχωριστά στους 121 °C και αφέθηκαν να κρυώσουν έως τους 50 °C. Τέλος, ο δείκτης προστέθηκε στο μέσο, υπό συνεχή ανάδευση ώστε να γίνει ομογενοποίηση του διαλύματος και το ομογενοποιημένο διάλυμα διαμοιράστηκε στα τρυβλία. Μετά την πήξη, αυτά φυλάχθηκαν στους 4 °C για 24-48 ώρες ώστε να αποκτήσουν το μπλε χρώμα. Στη συνέχεια, σχηματίστηκε ένα πηγαδάκι διαμέτρου 2mm στο κέντρο του τρυβλίου με τη βοήθεια φελλοτρυπητήρα, όπου εμβολιάστηκε ποσότητα 10 μl από βακτηριακή καλλιέργεια 18-20 ωρών. Πραγματοποιήθηκε επώαση στους 30 °C για 4 ημέρες, με καθημερινό έλεγχο και φωτογράφιση. Μεταχρωματισμός του μέσου γύρω από το σημείο εμβολιασμού του βακτηρίου από μπλε σε πορτοκαλί υποδήλωσε την έκκριση σιδηροφόρων.

Πραγματοποιήθηκαν 3 τεχνικές επαναλήψεις, ενώ συνολικά το πείραμα πραγματοποιήθηκε ανεξάρτητα άλλες 2 φορές για επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων. Η ένταση παραγωγής σιδηροφόρων προσδιορίστηκε από τη διάμετρο της πορτοκαλί άλω μετά από 4 ημέρες επώασης χρησιμοποιώντας μια αυθαίρετη κλίμακα διαβάθμισης που συγκρίνει τα εξεταζόμενα στελέχη μεταξύ τους. Συγκεκριμένα, η παραγωγή ορίστηκε ως αρνητική (-, negative, neg) σε απουσία πορτοκαλί άλω, χαμηλή (+, low) σε παρουσία άλω διαμέτρου μικρότερη από 1 cm, μέτρια (++, moderate, mod) σε παρουσία άλω διαμέτρου 1-3 cm και υψηλή (+++, high) σε παρουσία άλω διαμέτρου μεγαλύτερη των 3 cm.

3.6.3 Παραγωγή κυτταρινολυτικών ενζύμων

Η ικανότητα παραγωγής κυτταρινολυτικών ενζύμων από τα βακτηριακά στελέχη ανιχνεύθηκε μετά την ανάπτυξή τους σε κατάλληλο στερεό θρεπτικό μέσο που περιείχε πηγή κυτταρίνης (Caruccino & Sherman, 2005; Baldan et al., 2015)

Το μέσο αυτό παρασκευάστηκε με προσθήκη 1% CMC (Carboxymethyl cellulose) σε θρεπτικό μέσο CYEA (0.5% casein, 0.25% yeast extract, 0.1% glucose, 1.8% agar) και αποστείρωση στους 121 °C για 20'. Μετά την αποστείρωση, ακολούθησε καλή ανάδευση του θρεπτικού και διαμοίραση στα τρυβλία. Στη συνέχεια, σχηματίστηκε ένα πηγαδάκι διαμέτρου 2mm στο κέντρο του τρυβλίου με τη βοήθεια φελλοτρυπητήρα, όπου εμβολιάστηκε ποσότητα 10 μl από βακτηριακή προκαλλιέργεια. Τέλος, πραγματοποιήθηκε επώαση στους 30 °C για 72 ώρες. Η δημιουργία διαφανούς άλω γύρω από το σημείο εμβολιασμού του βακτηρίου υποδήλωσε τη διαλυτοποίηση της κυτταρίνης στο μέσο. Για πιο ξεκάθαρο αποτέλεσμα, προστέθηκε διάλυμα χρωστικής Congo Red (1mg/ml) στο τρυβλίο και επώαστηκε για 15 λεπτά. Ακολούθως, η χρωστική απομακρύνεται και προστίθεται διάλυμα 1M NaCl για 15 λεπτά ώστε να αποχρωματιστεί το υπόλοιπο μέσο πέραν της άλω.

Πραγματοποιήθηκαν 3 τεχνικές επαναλήψεις, ενώ συνολικά το πείραμα πραγματοποιήθηκε ανεξάρτητα άλλες 2 φορές για επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων. Η ένταση διαλυτοποίησης της κυτταρίνης προσδιορίστηκε από τη διάμετρο της άλω μετά από 4 ημέρες επώασης χρησιμοποιώντας μια αυθαίρετη κλίμακα διαβάθμισης που συγκρίνει τα εξεταζόμενα στελέχη μεταξύ τους. Συγκεκριμένα, η παραγωγή ορίστηκε ως αρνητική (-, negative, neg) σε απουσία άλω, χαμηλή (+, low) σε παρουσία άλω διαμέτρου μικρότερη από 1.5 cm, μέτρια (++, moderate, mod) σε παρουσία άλω διαμέτρου 1.5-3 cm και υψηλή (+++, high) σε παρουσία άλω διαμέτρου μεγαλύτερη των 3 cm.

3.6.4 Παραγωγή πρωτεολυτικών ενζύμων

Η διερεύνηση της παραγωγής πρωτεολυτικών ενζύμων από τα βακτηριακά στελέχη πραγματοποιήθηκε σε μέσο εμπλουτισμένο με πηγή πρωτεϊνών, τροποποιώντας τη μέθοδο των Durham και συνεργατών (1987). Συγκεκριμένα, προστέθηκε 7% αποβουτυρωμένο γάλα σε σκόνη (Skim milk powder) σε θρεπτικό μέσο CYEA (0.5% casein, 0.25% yeast extract, 0.1% glucose, 1.8% agar) και ακολούθησε αποστείρωση στους 121 °C για 20'. Το θρεπτικό διαμοιράστηκε στα τρυβλία και μετά την πήξη του, σχηματίστηκε ένα πηγαδάκι διαμέτρου 2mm στο κέντρο του τρυβλίου με τη βοήθεια φελλοτρυπητήρα, όπου εμβολιάστηκε ποσότητα 10 μl από βακτηριακή προκαλλιέργεια. Τέλος, πραγματοποιήθηκε επώαση στους 30 °C για 48 ώρες. Η δημιουργία διαφανούς άλω γύρω από το σημείο εμβολιασμού του βακτηρίου υποδήλωσε τη διαλυτοποίηση της κυτταρίνης στο μέσο.

Πραγματοποιήθηκαν 3 τεχνικές επαναλήψεις, ενώ συνολικά το πείραμα πραγματοποιήθηκε ανεξάρτητα άλλες 2 φορές για επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων. Η ένταση διαλυτοποίησης των πρωτεϊνών προσδιορίστηκε από τη διάμετρο της διαφανούς άλω μετά από 2 ημέρες επώασης χρησιμοποιώντας μια αυθαίρετη κλίμακα διαβάθμισης που συγκρίνει τα εξεταζόμενα στελέχη μεταξύ τους. Συγκεκριμένα, η παραγωγή ορίστηκε ως αρνητική (-, negative, neg) σε απουσία διαφανούς άλω, χαμηλή (+, low) σε παρουσία άλω διαμέτρου μικρότερη από 1.5 cm, μέτρια (++, moderate, mod) σε παρουσία άλω διαμέτρου 1.5-3 cm και υψηλή (+++, high) σε παρουσία άλω διαμέτρου μεγαλύτερη των 3 cm.

3.6.5 Παραγωγή χιτινολυτικών ενζύμων

Η εξέταση παραγωγής χιτινολυτικών ενζύμων πραγματοποιήθηκε σε στερεό θρεπτικό μέσο που περιείχε πηγή χιτίνης με τροποποιήσεις της μεθόδου των Agrawal και Kotasthane (2012). Αρχικά, προετοιμάστηκαν τα κολλοειδή χιτίνης (colloidal chitin) από χιτίνη κέλυφους καβουριού (Crab-shell chitin, Sigma-Aldrich). Σε 5g χιτίνης προστέθηκαν 70 ml πυκνού HCl 37% με συνεχή ανάδευση και το μίγμα αφέθηκε υπό συνεχή ανάδευση για 24 ώρες στους 4°C ώστε να πραγματοποιηθεί η όξινη υδρόλυση της χιτίνης. Στη συνέχεια, στο κολλοειδές ίζημα που προκύπτει, προστέθηκε ποσότητα 250 ml παγωμένης αιθανόλης και ακολούθησε ξέπλυμα με 2.5-3 L απιονισμένο νερό. Τα κολλοειδή χιτίνης αποθηκεύτηκαν στους 4°C. Για την παρασκευή του στερεού θρεπτικού μέσου 1% κολλοειδή χιτίνης προστέθηκαν σε θρεπτικό μέσο NA και ακολούθησε αποστείρωση στους 121 °C για 20'. Το θρεπτικό διαμοιράστηκε στα τρυβλία και μετά την πήξη του, σχηματίστηκε ένα πηγαδάκι διαμέτρου 2 mm στο κέντρο του τρυβλίου με τη βοήθεια φελλοτρυπητήρα, όπου εμβολιάστηκε ποσότητα 10 μl από βακτηριακή προκαλλιέργεια. Τέλος, πραγματοποιήθηκε επώαση στους 30 °C για 5 ημέρες. Η δημιουργία διαφανής άλω γύρω από το σημείο εμβολιασμού του βακτηρίου υποδήλωσε τη διαλυτοποίηση της χιτίνης στο μέσο.

Πραγματοποιήθηκαν 3 τεχνικές επαναλήψεις, ενώ συνολικά το πείραμα πραγματοποιήθηκε ανεξάρτητα άλλες 2 φορές για επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων. Η ένταση διαλυτοποίησης της χιτίνης προσδιορίστηκε από τη διάμετρο της διαφανούς άλω μετά από 5 ημέρες επώασης χρησιμοποιώντας μια αυθαίρετη κλίμακα διαβάθμισης που συγκρίνει τα εξεταζόμενα στελέχη μεταξύ τους. Συγκεκριμένα, η παραγωγή ορίστηκε ως αρνητική (-, negative, neg) σε απουσία διαφανούς άλω, χαμηλή (+, low) σε παρουσία άλω διαμέτρου μικρότερη από 1.5 cm, μέτρια (++, moderate, mod) σε παρουσία άλω διαμέτρου 1.5-3 cm και υψηλή (+++, high) σε παρουσία άλω διαμέτρου μεγαλύτερη των 3 cm.

3.6.6 Παραγωγή ουρεασών

Η ικανότητα παραγωγής ουρεασών από τα βακτηριακά στελέχη ανιχνεύθηκε μετά την ανάπτυξή τους σε κατάλληλο στερεό θρεπτικό μέσο που περιείχε πηγή ουρίας, και συγκεκριμένα το θρεπτικό Urea Agar base (Christensen) (μάρκα) (Goswami et al., 2015b). Μετά την αποστείρωση, ακολούθησε καλή ανάδευση του θρεπτικού και διαμοίραση στα τρυβλία. Στη συνέχεια, σχηματίστηκε ένα πηγαδάκι διαμέτρου 2mm στο κέντρο του τρυβλίου με τη βοήθεια φελλοτρυπητήρα, όπου εμβολιάστηκε ποσότητα 10 μl από βακτηριακή προκαλλιέργεια. Τέλος, πραγματοποιήθηκε επώαση στους 30 °C για 72 ώρες. Η δημιουργία ροζ άλω γύρω από το σημείο εμβολιασμού του βακτηρίου υποδήλωσε τη διαλυτοποίηση της ουρίας στο μέσο. Πραγματοποιήθηκαν 3 τεχνικές επαναλήψεις, ενώ συνολικά το πείραμα πραγματοποιήθηκε ανεξάρτητα άλλες 2 φορές για επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων.

3.6.7 Παραγωγή σουλφατασών

Η ικανότητα παραγωγής σουλφατασών εξετάστηκε με την ανάπτυξη των βακτηριακών στελεχών σε ειδικό θρεπτικό μέσο που περιείχε το υπόστρωμα 5-bromo-4-chloro-3-indolyl sulfate (X-Sulf, Sigma) (Wyss et al., 1989). Το υπόστρωμα αυτό ενσωματώθηκε (100 mg/L) σε τροποποιημένο θρεπτικό μέσο M9, ως η μοναδική πηγή θείου. Το θρεπτικό μέσο M9 περιέχει 20% (v/v) M9 άλατα (64 g/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 15 g/L KH_2PO_4 , 2.5g/L NaCl , 5.0g/L NH_4Cl), 0.2% (v/v) 1M MgSO_4 , 2% (v/v) από 20% glucose, 0.01% (v/v) από 1M CaCl_2 , 1.5% agar. Στη συνέχεια, σχηματίστηκε ένα πηγαδάκι διαμέτρου 2 mm στο κέντρο του τρυβλίου με τη βοήθεια φελλοτρυπητήρα, όπου εμβολιάστηκε ποσότητα 10 μl από βακτηριακή προκαλλιέργεια. Τέλος, πραγματοποιήθηκε επώαση στους 30 °C για 72 ώρες. Η αλλαγή χρώματος του θρεπτικού μέσου σε μπλε υποδήλωσε την ικανότητα του στελέχους να παράγει αρυλ-σουλφατάσες που αποσυμπλοκοποίησαν το θείο από τη χρωστική του μορίου X-sulf. Πραγματοποιήθηκαν 3 τεχνικές επαναλήψεις, ενώ συνολικά το πείραμα πραγματοποιήθηκε ανεξάρτητα άλλες 2 φορές για επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων.

3.6.8 Παραγωγή ενώσεων που περιέχουν ινδόλιο (indole-related compounds)

Η ικανότητα των βακτηριακών στελεχών να εκκρίνουν ενώσεις που περιέχουν ινδόλιο διερευνήθηκε με τη χρήση της μεθόδου Salkowski τροποποιημένη από τους Baldan et al. (2015), ενώ την αρχική μέθοδο ανέπτυξαν οι Loper και Schroth (1986). Η κύρια ένωση ενδιαφέροντος που περιέχει ινδόλιο είναι η φυτική ορμόνη αυξίνη, και συγκεκριμένα το ινδολοξικό οξύ. Ωστόσο, μπορούν να ανιχνευθούν και άλλες ενώσεις με τη συγκεκριμένη μέθοδο.

Ποσότητα 10 μl εμβολιάστηκε από βακτηριακή προκαλλιέργεια σε υγρό θρεπτικό μέσο που περιείχε L-τρυπτοφάνη (1%) και ακολούθησε επώαση υπό ανάδευση (220-250 rpm) για 48 ώρες στους 30 °C. Μετά το πέρας της επώασης οι βακτηριακές καλλιέργειες φυγοκεντρήθηκαν στις 8000 στροφές για 10' και το υπερκείμενο αναμίχθηκε με το αντιδραστήριο Salkowski (2% 0.5 M FeCl_2 σε 35% HClO_4) σε αναλογία 1:2, ενώ προστέθηκαν και 2 σταγόνες ορθοφωσφορικού οξέος (H_3PO_4). Ακολούθως, το διάλυμα επώαστηκε σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι για 30 λεπτά. Αλλαγή του χρώματος του μέσου από διαφανές υποκίτρινο σε αποχρώσεις του ροζ ή του πορτοκαλί υποδήλωσε την ύπαρξη ουσιών που περιέχουν ινδόλιο. Πραγματοποιήθηκε μέτρηση της απορρόφησης στο μήκος κύματος 535 nm με τη χρήση φασματοφωτόμετρου για επιβεβαίωση της έντασης του χρώματος.

Πραγματοποιήθηκαν 3 τεχνικές επαναλήψεις, ενώ συνολικά το πείραμα πραγματοποιήθηκε ανεξάρτητα άλλες 2 φορές για επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων. Η ένταση παραγωγής ενώσεων που περιέχουν ινδόλιο προσδιορίστηκε από την ένταση του μεταχρωματισμού (βάθος χρώματος και φασματοφωτομετρικές τιμές) χρησιμοποιώντας μια αυθαίρετη κλίμακα διαβάθμισης που συγκρίνει τα εξεταζόμενα στελέχη μεταξύ τους. Συγκεκριμένα, η παραγωγή ορίστηκε ως αρνητική (-, negative, neg) σε απουσία μεταχρωματισμού, χαμηλή (+, low) σε παρουσία ελαφρού μεταχρωματισμού (ανοιχτό ροζ/πορτοκαλί), μέτρια (++, moderate, mod) σε παρουσία μέτριου μεταχρωματισμού

(ροζ/πορτοκαλί) και υψηλή (+++, high) σε παρουσία έντονου μεταχρωματισμού (σκούρο ροζ/πορτοκαλί).

3.6.9 Παραγωγή αμμωνίας

Η ικανότητα των βακτηριακών στελεχών να παράγουν αμμωνία διερευνήθηκε με τη μέθοδο των Carruccino και Sherman (1992). Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε εμβολιασμός ποσότητας από προκαλλιέργεια σε υδατικό θρεπτικό μέσο με 4 % πεπτόνη και επώαση υπό ανάδευση (220-250 rpm) για 72 ώρες στους 30 °C. Ακολούθως, το υπερκείμενο μετά τη φυγοκέντρηση της καλλιέργειας στις 8000 στροφές για 10' αναμίχθηκε με το αντιδραστήριο Nessler's σε αναλογία 20:1 και το διάλυμα επώαστηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 30' στο σκοτάδι. Για το κάθε στέλεχος υπήρχαν 3 βιολογικές και τεχνικές επαναλήψεις. Αλλαγή του χρώματος του μέσου σε αποχρώσεις του πορτοκαλί-καφέ υποδήλωσε την ύπαρξη αμμωνίας, ενώ αυτό επιβεβαιώθηκε και με φωτομέτρηση στα 450 nm (Borah et al., 2019).

Πραγματοποιήθηκαν 3 τεχνικές επαναλήψεις, ενώ συνολικά το πείραμα πραγματοποιήθηκε ανεξάρτητα άλλες 2 φορές για επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων. Η παραγωγή αμμωνίας ορίστηκε ως αρνητική (-, negative, neg) σε απουσία μεταχρωματισμού και θετική (+, positive, pos) σε παρουσία μεταχρωματισμού.

3.6.10 Παραγωγή ακετοΐνης

Η παραγωγή ακετοΐνης εξετάστηκε με τη δοκιμή Voges-Proskauer (VP-test) (McDevitt, 2009). Ποσότητα από προκαλλιέργεια εμβολιάστηκε σε υγρό θρεπτικό μέσο MR-VP (0.7% peptone, 0.5% K₂HPO₄, 0.5% glucose, pH 6.9) και ακολούθησε επώαση υπό ανάδευση (220-250 rpm) για 48 ώρες στους 30 °C. Μετά το πέρας της επώασης, η καλλιέργεια φυγοκεντρήθηκε στις 8000 στροφές για 10' και το υπερκείμενο αναμίχθηκε με το αντιδραστήριο Barritt's reagent A (5% a-naphthol σε αιθανόλη) το οποίο ήταν σε αναλογία 24% (v/v), καθώς και με το Barritt's reagent B (40% διάλυμα NaOH) το οποίο ήταν σε αναλογία 8% (v/v). Μετά από ήπια ανάδευση το διάλυμα επώαστηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 30' στο σκοτάδι. Σχηματισμός ροζ-κόκκινης λωρίδας στο μέσο σήμανε θετικό αποτέλεσμα στην ύπαρξη ακετοΐνης στο μέσο.

Πραγματοποιήθηκαν 3 τεχνικές επαναλήψεις, ενώ συνολικά το πείραμα πραγματοποιήθηκε ανεξάρτητα άλλες 2 φορές για επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων. Η ένταση παραγωγής ακετοΐνης προσδιορίστηκε ποιοτικά από το μέγεθος της μεταχρωματισμένης ζώνης χρησιμοποιώντας μια αυθαίρετη κλίμακα διαβάθμισης που συγκρίνει τα εξεταζόμενα στελέχη μεταξύ τους. Συγκεκριμένα, η παραγωγή ορίστηκε ως αρνητική (-, negative, neg) σε απουσία μεταχρωματισμένης ζώνης, χαμηλή (+, low) σε παρουσία λεπτής ζώνης, μέτρια (++, moderate, mod) σε παρουσία μέτριου πάχους ζώνης (ροζ, πορτοκαλί) και υψηλή (+++, high) σε παρουσία μεγάλου πάχους ζώνης.

3.6.11 Ταχεία ανίχνευση επιφανειοδραστικών ενώσεων με τη μέθοδο της κατάρρευσης της σταγόνας (Drop collapse assay)

Η ανίχνευση έκκρισης επιφανειοδραστικών ενώσεων στο μέσο καλλιέργειας πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια της μεθόδου κατάρρευσης της σταγόνας (Townsend et al., 2018). Προκαλλιέργειες 48 ωρών φυγοκεντρήθηκαν στις 10000 στροφές για 10 λεπτά και ποσότητα 25 μl από το υπερκείμενο αναμίχθηκε με 2 μl της χρωστικής Evans Blue και τοποθετήθηκε προσεκτικά σε λωρίδα parafilm. Ως μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν σταγόνες νερού (αρνητικός) και ορυκτέλαιου (θετικός). Η κατάρρευση της σταγόνας υποδήλωσε την ύπαρξη επιφανειοδραστικών ουσιών στο μέσο. Η παραγωγή επιφανειοδραστικών ενώσεων χαρακτηρίστηκε ως αρνητική (-, negative, neg) όταν η σταγόνα δεν κατέρρευσε καθόλου και ήταν όμοια με τον αρνητικό μάρτυρα, ως χαμηλή (+, low), ως μέτρια (++, moderate, mod) και ως υψηλή (+++, high) ανάλογα με το βαθμό κατάρρευσης της σταγόνας στο συγκεκριμένο χρονικό διάστημα, αλλά και τη διάμετρό της μετά από ξήρανση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

3.7 Δοκιμές περιβαλλοντικής προσαρμογής των βακτηριακών στελεχών

Ως χαρακτηριστικά περιβαλλοντικής προσαρμογής εξετάστηκαν η ανθεκτικότητα σε εύρος αντιβιοτικών ενώσεων και συγκεντρώσεων, καθώς και η ικανότητα ανάπτυξης σε ακραίες θερμοκρασίες, τιμές pH και συγκεντρώσεις αλατότητας. Είναι σημαντικά χαρακτηριστικά για την αξιολόγηση κάθε στελέχους ως προς την επικινδυνότητά του (ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά), όπως και την επιβίωσή του σε αντίξοες συνθήκες του περιβάλλοντος στον αγρό.

3.7.1 Ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά

Ποσότητα 2 ml από βακτηριακές καλλιέργειες μεγάλης κλίμακας (Κεφ.3.2.3), φυγοκεντρήθηκε στις 8000 στροφές για 10 λεπτά και το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε αποστειρωμένο διάλυμα MgCl₂ (10 mM). Στη συνέχεια, το βακτηριακό εναιώρημα αναμίχθηκε με ποσότητα 30 ml αποστειρωμένου θρεπτικού υλικού ΝΑ με 0.7% (w/v) άγαρ, το οποίο βρισκόταν ακόμα στην υγρή μορφή (top agar). Αυτό το μίγμα περιχύθηκε σε τετράγωνο τρυβλίο (12x12 cm) που περιείχε στρεοποιημένο θρεπτικό μέσο ΝΑ με 1.5% (w/v) άγαρ (bottom agar) και αφέθηκε να στρεοποιηθεί. Στη συνέχεια τοποθετήθηκαν στεγνά αποστειρωμένα χαρτιά Whatmann διαμέτρου 6 mm και πάχους 3 mm που είχαν εμποτιστεί με 20 μl διάφορων αντιβιοτικών ενώσεων και συγκεντρώσεων. Τα τρυβλία επωάστηκαν στους 30 °C για 20 ώρες και ακολούθως καταγράφηκε η ανθεκτικότητα (+) ή ευαισθησία (-) των στελεχών σε κάθε αντιβιοτικό και συγκέντρωση. Τα αντιβιοτικά που ελέγχθηκαν ήταν τα Τετρακυκλίνη (Tetracycline) σε συγκεντρώσεις 5, 10 και 20 μg/20 μl, Αμπικιλίνη (Ampicillin) σε συγκεντρώσεις 50, 100 και 200 μg/20 μl, Καναμυκίνη (Kanamycin) σε συγκεντρώσεις 25, 50 και 100 μg/20 μl, Στρεπτομυκίνη

(Streptomycin) σε συγκεντρώσεις 50, 100 και 200 $\mu\text{g}/20 \text{ ml}$, και Ριφαμπικίνη (Rifampicin) σε συγκεντρώσεις 25, 50 και 100 $\mu\text{g}/20 \text{ ml}$.

3.7.2 Ανάπτυξη σε εύρος συγκεντρώσεων αλατότητας

Για τη διερεύνηση της ανάπτυξης των στελεχών σε εύρος συγκεντρώσεων αλατότητας, βακτηριακές καλλιέργειες μεγάλης κλίμακας (Κεφ.3.2.3), μετά τη φυγοκέντρωση τους (8000 στροφές για 10') και επαναδιάλυση του ιζήματος σε αποστειρωμένο διάλυμα MgCl_2 (10 mM), υπέστησαν διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις έως τη 10^{-6} . Στη συνέχεια ποσότητα 10 μl από το πυκνό και την κάθε αραιώση εμβολιάστηκε υπό τη μορφή κηλίδας (spot) σε τετράγωνα τρυβλία (12x12 cm) NA που περιείχαν διαφορετικές συγκεντρώσεις NaCl (1.5 και 5%), αλλά και NA χωρίς τον παράγοντα αλατότητας που λειτούργησε ως μάρτυρας. Τα τρυβλία επώαστηκαν στους 28 °C για 20 ώρες και στη συνέχεια καταγράφηκε η μεγαλύτερη αραιώση όπου το βακτήριο αναπτύχθηκε, και συγκρίθηκε με το μάρτυρα. Πραγματοποιήθηκαν 2 τεχνικές επαναλήψεις σε κάθε τρυβλίο και το πείραμα πραγματοποιήθηκε ανεξάρτητα 2 φορές επιπλέον για επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων.

Η αντοχή στην καταπόνηση ορίστηκε ανάλογα με το μέγεθος της αραιώσης που αναπτύχθηκε το βακτήριο σε σύγκριση με το μάρτυρα, δηλαδή τον αριθμό των ανθεκτικών κυττάρων σε κάθε περίπτωση (CFU/ml). Έτσι, η αντοχή ορίστηκε ως απύσα (-) όταν το στέλεχος δεν αναπτύχθηκε σε καμία αραιώση, ως χαμηλή (+) όταν η μεταβολή ήταν 10^5 - 10^6 CFU/ml, ως μέτρια (++) όταν η μεταβολή ήταν 10^3 - 10^4 CFU/ml, ως υψηλή (+++) όταν η μεταβολή ήταν 10 - 10^2 CFU/ml και ως πλήρης (++++) όταν δεν παρατηρήθηκε καμία μεταβολή.

3.7.3 Ανάπτυξη σε ακραίες θερμοκρασίες

Για την εξέταση της ανάπτυξης των στελεχών σε εύρος θερμοκρασιών, βακτηριακές καλλιέργειες μεγάλης κλίμακας (Κεφ.3.2.3), μετά τη φυγοκέντρωση τους (8000 στροφές για 10') και επαναδιάλυση του ιζήματος σε αποστειρωμένο διάλυμα MgCl_2 (10 mM), υπέστησαν διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις έως τη 10^{-6} . Στη συνέχεια ποσότητα 10 μl από το πυκνό και την κάθε αραιώση εμβολιάστηκε υπό τη μορφή κηλίδας (spot) σε τετράγωνα τρυβλία (12x12 cm) NA, ένα τρυβλίο για κάθε θερμοκρασία που ελέγχθηκε. Συγκεκριμένα, ελέγχθηκαν οι θερμοκρασίες 5 °C, 28 °C και 45 °C, όπου οι 28 °C λειτούργησαν ως θερμοκρασία μάρτυρας. Τα τρυβλία επώαστηκαν στις εκάστοτε θερμοκρασίες για 20 ώρες και στη συνέχεια καταγράφηκε η μεγαλύτερη αραιώση όπου το βακτήριο αναπτύχθηκε, και συγκρίθηκε με το μάρτυρα. Πραγματοποιήθηκαν 2 τεχνικές επαναλήψεις σε κάθε τρυβλίο και το πείραμα πραγματοποιήθηκε ανεξάρτητα 2 φορές επιπλέον για επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων.

Η αντοχή στην καταπόνηση ορίστηκε ανάλογα με το μέγεθος της αραιώσης που αναπτύχθηκε το βακτήριο σε σύγκριση με το μάρτυρα, δηλαδή τον αριθμό των ανθεκτικών κυττάρων σε κάθε περίπτωση (CFU/ml). Έτσι, η αντοχή ορίστηκε ως απύσα (-) όταν το στέλεχος δεν αναπτύχθηκε σε καμία αραιώση, ως χαμηλή (+) όταν η μεταβολή ήταν 10^5 - 10^6 CFU/ml, ως μέτρια (++) όταν η

μεταβολή ήταν 10^3 - 10^4 CFU/ml, ως υψηλή (+++) όταν η μεταβολή ήταν 10 - 10^2 CFU/ml και ως πλήρης (++++) όταν δεν παρατηρήθηκε καμμία μεταβολή.

3.7.4 Ανάπτυξη σε εύρος τιμών pH

Για τη διερεύνηση της ικανότητας ανάπτυξης των στελεχών σε εύρος θερμοκρασιών, βακτηριακές καλλιέργειες μεγάλης κλίμακας (Κεφ.3.2.3), μετά τη φυγοκέντρωση τους (8000 στροφές για 10') και επαναδιάλυση του ιζήματος σε αποστειρωμένο διάλυμα $MgCl_2$ (10 mM), υπέστησαν διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις έως τη 10^{-6} . Στη συνέχεια ποσότητα 10 μl από το πυκνό και την κάθε αραιώση εμβολιάστηκε υπό τη μορφή κηλίδας (spot) σε τετράγωνα τρυβλία (12x12 cm) NA. Συγκεκριμένα, ελέγχθηκαν οι τιμές pH 5.5, 6.8 και 8.5, όπου η τιμή 6.8 λειτούργησε ως μάρτυρας, καθώς είναι το επιθυμητό pH του θρεπτικού μέσου NA. Το όξινο pH του θρεπτικού μέσου επιτεύχθηκε με την προσθήκη σταγόνων διαλύματος 3N HCl σε θρεπτικό μέσο NB, ενώ το βασικό pH επιτεύχθηκε με την προσθήκη σταγόνων 10N NaOH. Στη συνέχεια, προστέθηκε ο παράγοντας στερεοποίησης άγαρ σε συγκέντρωση 1.5% (w/v) και το θρεπτικό αποστειρώθηκε στους 121 °C για 20 λεπτά. Μετά την αποστείρωση, όταν το θρεπτικό είχε θερμοκρασία 55°C, προστέθηκαν οι χρωστικές που λειτουργούν ως πεχαμετρικοί δείκτες. Για το θρεπτικό με pH 5.5 χρησιμοποιήθηκε η χρωστική Bromocresol Purple (pH \geq 6.8=μωβ, pH \leq 5.2=κίτρινο), για το θρεπτικό με pH 8.5 χρησιμοποιήθηκε η χρωστική Neutral Red (pH \geq 8 =κίτρινο, pH \leq 6.8 κόκκινη κηλίδα), ενώ για το θρεπτικό με pH 6.8 παρασκευάστηκε ένα θρεπτικό υπόστρωμα για κάθε χρωστική, ώστε να ελεγχθεί η περίπτωση τοξικότητας της χρωστικής. Μετά τον εμβολιασμό, τα τρυβλία επωάστηκαν στους 28 °C για 20 ώρες και στη συνέχεια καταγράφηκε η μεγαλύτερη αραιώση όπου το βακτήριο αναπτύχθηκε, και συγκρίθηκε με το μάρτυρα. Πραγματοποιήθηκαν 2 τεχνικές επαναλήψεις σε κάθε τρυβλίο και το πείραμα πραγματοποιήθηκε ανεξάρτητα 2 φορές επιπλέον για επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων.

Η αντοχή στην καταπόνηση ορίστηκε ανάλογα με το μέγεθος της αραιώσης που αναπτύχθηκε το βακτήριο σε σύγκριση με το μάρτυρα, δηλαδή τον αριθμό των ανθεκτικών κυττάρων σε κάθε περίπτωση (CFU/ml). Έτσι, η αντοχή ορίστηκε ως απύσα (-) όταν το στέλεχος δεν αναπτύχθηκε σε καμμία αραιώση, ως χαμηλή (+) όταν η μεταβολή ήταν 10^5 - 10^6 CFU/ml, ως μέτρια (++) όταν η μεταβολή ήταν 10^3 - 10^4 CFU/ml, ως υψηλή (+++) όταν η μεταβολή ήταν 10 - 10^2 CFU/ml και ως πλήρης (++++) όταν δεν παρατηρήθηκε καμμία μεταβολή.

3.8 Διερεύνηση κίνησης των βακτηρίων

3.8.1 Ομαδική κίνηση σε επιφάνειες (Swarming motility)

Τα ενδοφυτικά βακτήρια ελέγχθηκαν για την ικανότητα ομαδικής κίνησης σε ημι-στερεό θρεπτικό μέσο NA που περιείχε συγκέντρωση άγαρ 0.5% (w/v). Ποσότητα 10 μl από βακτηριακή προκαλλιέργεια τοποθετήθηκε ασηπτικά στο κέντρο του τρυβλίου υπό τη μορφή κηλίδας (spot).

Ακολούθησε επώαση στους 30 °C για 3 ημέρες, με έλεγχο και φωτογράφιση της βακτηριακής κίνησης ανά μία ώρα. Για κάθε στέλεχος πραγματοποιήθηκαν 3 τεχνικές επαναλήψεις, ενώ το πείραμα επαναλήφθηκε ανεξάρτητα 3 φορές.

3.8.2 Κολυμβητική κίνηση (Swimming motility)

Η ικανότητα κολυμβητικής κίνησης ελέγχθηκε όπως περιγράφεται στο **Κεφάλαιο 3.8.1** με τη διαφορά ότι το θρεπτικό μέσο περιείχε 0.3% άγαρ.

3.8.3 Κίνητικότητα στο έδαφος

Για τη διερεύνηση της κίνησης στο έδαφος, η μισή ποσότητα στερεού θρεπτικού μέσου NA με περιεκτικότητα σε άγαρ 0.8% (w/v) από στρογγυλό τρυβλίο αφαιρείται με τη βοήθεια αποστειρωμένης σπάτουλας και αντικαθίσταται με αποστειρωμένο φυτόχωμα (100% υγρασία). Στη συνέχεια, ποσότητα 20 μl από βακτηριακή καλλιέργεια μικρής κλίμακας 3.2.3 τοποθετείται με τη μορφή κηλίδας (spot) στην περιοχή του εδάφους, 2 cm από την άκρη του τρυβλίου. Το τρυβλίο τοποθετείται σε θάλαμο ανάπτυξης στους 30°C σε κάθετη θέση ανάποδα από την κίνηση του βακτηρίου. Η επώαση πραγματοποιείται έως ότου το βακτήριο εμφανιστεί στην πλευρά του NA.

3.9 Σχηματισμός βιοϋμενίου (Biofilm formation)

Η ικανότητα των βακτηρίων να σχηματίζουν βιοϋμένιο εξετάστηκε σύμφωνα με τη μέθοδο O'Toole (2011). Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε 1:100 αραιώση προκαλλιιεργειών και μεταφέρθηκε ποσότητα 100 μl της αραιωμένης καλλιέργειας σε πηγαδάκι της πλάκας μικροτιτλοποίησης ή παιχνίδι 96 θέσεων από πολυστυρένιο (96 well plate). Στη συνέχεια, η πλάκα καλύφθηκε από ειδική αυτοκόλλητη ταινία και επώαστηκε ακίνητη στους 30°C για 24 ώρες. Ακολούθως, αφού επιβεβαιώθηκε η σωστή ανάπτυξη των βακτηρίων με τη δημιουργία ιζήματος, πραγματοποιήθηκε προσεκτική αφαίρεση του βακτηριακού εναιωρήματος με πιπέτα και ξέπλυμα της πλάκας με ήπια εμβάπτιση της σε νερό 3 φορές, ώστε να απομακρυνθούν τα μη ισχυρά προσκολλημένα βακτήρια. Η πλάκα αφέθηκε να στεγνώσει για 30 λεπτά στον αέρα. Προστέθηκε ποσότητα 200 μl χρωστικής crystal violet 0.1% (w/v) σε κάθε πηγαδάκι και η πλάκα επώαστηκε για 20 λεπτά. Ακολούθησε ξέπλυμα της πλάκας με ήπια εμβάπτιση της σε νερό 3 φορές και στέγνωμα στον αέρα για 30 λεπτά. Στη συνέχεια, προστέθηκε ποσότητα 200 μl διαλύματος ακετόνης (20% v/v) και αιθανόλης (80% v/v) και η πλάκα επώαστηκε για 20 λεπτά, ώστε να ξεβάψει η χρωστική που έχει προσκολληθεί στο βιοϋμένιο. Τέλος, η ποσοτικοποίηση της έντασης σχηματισμού βιοϋμενίου πραγματοποιήθηκε με προσθήκη των 200 μl σε 800 μl του διαλύματος ακετόνης-αιθανόλης σε κυβέτα και φωτομέτρηση στα 550 nm.

3.10 Παρεμπόδιση της ανάπτυξης φυτοπαθογόνων μυκήτων

3.10.1 Διπλή καλλιέργεια (Dual Culture) βακτηριακών κυττάρων και μύκητα

Η αλληλεπίδραση των απομονωμένων ενδοφυτικών βακτηρίων με τους φυτοπαθογόνους μύκητες πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της διπλής καλλιέργειας (dual culture). Σε αυτή τη μέθοδο το βακτήριο και ο μύκητας τοποθετούνται σε ορισμένη απόσταση μεταξύ τους σε ένα τρυβλίο Petri με στερεό θρεπτικό μέσο.

Στερεό εμβόλιο μύκητα (Κεφ. 3.3.2) τοποθετήθηκε 2.5 cm από την άκρη τρυβλίου Petri με στερεό θρεπτικό μέσο ΝΑ. Στη συνέχεια, ποσότητα 10 μl τοποθετήθηκε υπό μορφή κηλίδας (spot) σε απόσταση 3.5 cm από τον εκάστοτε μύκητα είτε ως μοναδική κηλίδα είτε ως γραμμή κηλίδων με συνολικά 5 κηλίδες. Υπήρχαν 3 μάρτυρες για κάθε φυτοπαθογόνο μύκητα, όπου τοποθετήθηκε μια κηλίδα με αποστειρωμένο απιονισμένο νερό (dH₂O). Τα τρυβλία επώαστηκαν στους 25 °C έως ότου ο μύκητας-μάρτυρας καλύψει όλο το τρυβλίο και κάποιες έξτρα ημέρες, συγκεκριμένα 15 ημέρες συνολικά. Ο μύκητας *C. acutatum* εμβολιάστηκε σε PDA, ενώ αφέθηκαν 3 μέρες να αναπτυχθούν πριν τον εμβολιασμό του βακτηρίου λόγω της αργής ανάπτυξής τους και επώαστηκαν για άλλες 15 ημέρες. Η πορεία της αλληλεπίδρασης ελεγχόταν καθημερινά και λαμβάνονταν φωτογραφίες ανά 3 ημέρες. Για την καταγραφή των αποτελεσμάτων μετρήθηκε το εμβαδόν ανάπτυξης του μύκητα (cm²) και συγκρίθηκε μεταξύ των μεταχειρίσεων.

Διπλή καλλιέργεια πραγματοποιήθηκε και με μίγματα βακτηριακών καλλιιεργειών εναντίον του φυτοπαθογόνου *B. cinerea* σε στερεό θρεπτικό μέσο PDA. Συγκεκριμένα, καλλιέργειες μεγάλης κλίμακας μεμονωμένων στελεχών αναμίχθηκαν σε αναλογία 1:1 και ποσότητα 10 μl από το μίγμα εμβολιάστηκε σε απόσταση 3 cm από το εμβόλιο του μύκητα. Για τα μεμονωμένα βακτήρια χρησιμοποιήθηκε εμβόλιο από μίξη της βακτηριακής καλλιέργειας με αποστειρωμένο υγρό θρεπτικό NB σε αναλογία 1:1, ώστε η αραίωση του εμβολίου της μεμονωμένης καλλιέργειας να είναι η ίδια με την περίπτωση του εμβολίου ως μίγμα.

3.10.2 Διπλή καλλιέργεια (Dual Culture) υπερκείμενου βακτηριακής καλλιέργειας και μύκητα

Στερεό εμβόλιο μύκητα (Κεφ. 3.3.2) τοποθετήθηκε 2 cm από την άκρη τρυβλίου Petri με στερεό θρεπτικό μέσο ΝΑ. Ποσότητα βακτηριακών καλλιιεργειών μικρής κλίμακας που επώαστηκαν για 48 ώρες φυγοκεντρήθηκε στις 10000 για 20 λεπτά, το υπερκείμενο συλλέχθηκε και αποστειρώθηκε με τη χρήση φίλτρου 0.22 μm. Στη συνέχεια, ποσότητα 50 μl τοποθετήθηκε υπό μορφή κηλίδας (spot) σε απόσταση 2.5 cm από τον εκάστοτε μύκητα μέσα σε πηγαδάκι διαμέτρου 2 mm που είχε σχηματιστεί με τη βοήθεια φελλοτρυπητήρα. Ταυτόχρονα, από την καλλιέργεια ποσότητα 50 μl τοποθετήθηκε υπό μορφή κηλίδας (spot) σε απόσταση 2.5 cm από τον εκάστοτε μύκητα σε διαφορετικό τρυβλίο μέσα σε πηγαδάκι διαμέτρου 2 mm που είχε σχηματιστεί με τη βοήθεια

φελλοτρυπητήρα. Υπήρχαν 3 μάρτυρες για κάθε φυτοπαθογόνο μύκητα, όπου τοποθετήθηκε μια κηλίδα με αποστειρωμένο απιονισμένο νερό (dH₂O). Η επώαση διήρκησε 8 ημέρες στους 25 °C.

3.10.3 Μικροσκοπική παρατήρηση του μυκηλίου

Η επίδραση της διπλής καλλιέργειας των επιλεγμένων βακτηριακών στελεχών με το φυτοπαθογόνο *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* στο μυκήλιο παρατηρήθηκε με τη χρήση μικροσκοπίου, με την αποκοπή τμήματος στερεού θρεπτικού και τοποθέτηση σε αντικειμενοφόρο πλάκα, ενώ πραγματοποιήθηκαν διπλές καλλιέργειες και απευθείας σε αντικειμενοφόρο πλάκα όπου είχε στερεοποιηθεί λεπτή στρώση θρεπτικού μέσου. Για το στέλεχος Tel34, όπου ερχόταν σε επαφή με τις υφές και δεν παρατηρήθηκε κάποια μορφολογική αλλοίωση των υφών, η διπλή καλλιέργεια πραγματοποιήθηκε σε αντικειμενοφόρο πλάκα όπου έγινε χρήση της χρωστικής ζωτικότητας Evans Blue (Sigma Aldrich), η οποία χρωματίζει μπλε τις νεκρές υφές (Semighini & Harris, 2010). Ποσότητα 100 μl από διάλυμα χρωστικής συγκέντρωσης 1% (w/v) τοποθετήθηκε πάνω στις υφές και μετά από επώαση 5 λεπτών, το δείγμα ξεπλύθηκε και παρατηρήθηκε σε μικροσκόπιο Olympus BX40 με ενσωματωμένη κάμερα Olympus DP71.

3.11 Επίδραση στο φυτό μοντέλο *Arabidopsis thaliana* Col-0 *in vitro*

Η επίδραση στο φυτό μοντέλο *A.thaliana* Col-0 εξετάστηκε υπό διαφορετικές *in vitro* συνθήκες και σε διάφορα στάδια για την επίτευξη πιο ολοκληρωμένης εικόνας.

3.11.1 Απολύμανση σπόρων και συγχρονισμός βλαστικότητας

Οι σπόροι *Arabidopsis thaliana* Col-0 χορηγήθηκαν από το Εργαστήριο Γεωργικής Γενετικής και Βιοτεχνολογίας, Τμήμα Γεωπονίας, Πανεπιστήμιο Πελοποννήσου.

Η επιφανειακή απολύμανση των σπόρων πραγματοποιήθηκε με εμβάπτιση των σπόρων σε πυκνό διάλυμα εμπορικής χλωρίνης (5% NaOCl) για 5 λεπτά και ξέπλυμα με αποστειρωμένο απιονισμένο νερό 5 φορές. Στη συνέχεια, οι σπόροι τοποθετήθηκαν σε τρυβλία διαμέτρου 9mm με στερεό θρεπτικό υλικό ½ Murashige and Skoog (με βιταμίνες) (Duchefa-Biochemie) που περιείχε 0.8% παράγοντα στερεοποίησης άγαρ and 0.5% σουκρόζη. Ακολούθως, τα τρυβλία επώαστηκαν ανάποδα στους 4°C για 24 ώρες για να επιτευχθεί σπάσιμο του λήθαργου και συγχρονισμός της βλαστικότητας. Επόμενο βήμα ήταν η τοποθέτηση των τρυβλίων σε γωνία 65° μέσα σε θάλαμο ανάπτυξης για 4 ή 6 ημέρες, ανάλογα με την πειραματική διαδικασία (16: 8 φωτοπερίοδος, 22±1 °C, 50-60% σχετική υγρασία).

3.11.2 Επιλογή αντιπροσωπευτικών βακτηριακών στελεχών

Στα προκαταρκτικά πειράματα συμπεριλήφθηκαν όλα τα στελέχη σε σχετικά ακραίες συνθήκες με σκοπό να εξεταστεί η επίδραση των βακτηρίων όταν αυτά εμβολιάζονται σε μεγάλη συγκέντρωση και έχουν γρήγορη ανάπτυξη σε θερμοκρασία περισσότερο ευνοϊκή. Ο σχεδιασμός των πειραμάτων συνοψίζεται και στον **Πίνακα 3.2**.

3.11.2.1 Εμβολιασμός σε απόσταση από το ακρορίζιο

Φυτάρια *A. thaliana* 4 ημερών προετοιμάστηκαν σύμφωνα με το Κεφ. 3.11.1 και μεταφυτεύτηκαν σε στερεό θρεπτικό μέσο ½ MS που περιείχε 0.5% (w/v) σουκρόζη και 0.8% (w/v) άγαρ, σε αποστειρωμένες συνθήκες μέσα σε θάλαμο νηματικής ροής. Τα φυτά τοποθετήθηκαν σε μια νοητή γραμμή απόστασης 4 cm από την άκρη του τρυβλίου. Η πυκνότητα μεταφύτευσης ήταν 10 φυτά/τρυβλίο. Στη συνέχεια, ποσότητα 10 µl από καλλιέργειες μικρής κλίμακας (10^9 - 10^{10} CFU/ml) εμβολιάστηκε με τη μορφή κηλίδας (spot) σε απόσταση 3 cm από κάθε ακρορίζιο. Μετά τον εμβολιασμό τα τρυβλία σφραγίστηκαν με parafilm και τοποθετήθηκαν υπό γωνία 65° μέσα σε θάλαμο ανάπτυξης (16: 8 φωτοπερίοδος, 25±1 °C, 50-60% σχετική υγρασία). Η επώαση με τα βακτήρια διήρκεσε 15 μέρες και στη συνέχεια τα τρυβλία φωτογραφήθηκαν με ψηφιακή κάμερα ώστε να αξιολογηθεί η επίδραση των βακτηρίων φαινοτυπικά. Σε κάθε μεταχείριση αντιστοιχούσαν 3 τρυβλία, ενώ το πείραμα επαναλήφθηκε άλλη μία φορά για επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων.

3.11.3 Επιλογή των καταλληλότερων βακτηριακών στελεχών

3.11.3.1 Εμβολιασμός σε απόσταση από το ακρορίζιο

Φυτάρια *A. thaliana* Col-0 4 ημερών προετοιμάστηκαν σύμφωνα με το Κεφ. 3.11.1 και μεταφυτεύτηκαν σε στερεό θρεπτικό μέσο ½ MS που περιείχε 0.5% (w/v) σουκρόζη και 0.8% (w/v) άγαρ, σε αποστειρωμένες συνθήκες μέσα σε θάλαμο νηματικής ροής. Τα φυτά τοποθετήθηκαν σε μια νοητή γραμμή απόστασης 3 cm από την άκρη του τρυβλίου. Η πυκνότητα μεταφύτευσης ήταν 6 φυτά/τρυβλίο τα οποία είχαν απόσταση 1 cm μεταξύ τους. Στη συνέχεια, ποσότητα 5 µl από καλλιέργειες μικρής κλίμακας (10^8 CFU/ml) εμβολιάστηκε με τη μορφή κηλίδας (spot) σε απόσταση 3.5 cm από κάθε ακρορίζιο. Μετά τον εμβολιασμό τα τρυβλία σφραγίστηκαν με parafilm και τοποθετήθηκαν υπό γωνία 65° μέσα σε θάλαμο ανάπτυξης (16: 8 φωτοπερίοδος, 22±1 °C, 50-60% σχετική υγρασία). Η επώαση με τα βακτήρια διήρκεσε 11 ημέρες. Για την αξιολόγηση της επίδρασης των βακτηρίων, τα φυτά ζυγίστηκαν και φωτογραφήθηκαν με ψηφιακή κάμερα ώστε να υπολογιστούν το μήκος ρίζας, αριθμός πλευρικών ριζών, εμβαδόν ριζικής επιφάνειας. Τέλος πραγματοποιήθηκε στερεοσκοπική παρατήρηση και φωτογράφιση των ριζικών τριχιδίων του ακροριζίου, και υπολογίστηκε ο αριθμός και το μήκος των τριχιδίων που βρίσκονταν σε απόσταση 50 mm από το ακρορίζιο. Για τη στατιστική ανάλυση του μήκους των ριζικών τριχιδίων συνδυάστηκαν οι τιμές των 20 μακρύτερων τριχιδίων 6 φυτών για κάθε μεταχείριση (n=120). Σε κάθε μεταχείριση

αντιστοιχούσαν 3 τρυβλία, ενώ το πείραμα επαναλήφθηκε άλλες δύο φορές για επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων. Ο σχεδιασμός των πειραμάτων συνοψίζεται και στον **Πίνακα 3.2**.

3.11.3.2 Εμβολιασμός στο ακρορρίζιο παρουσία σουκρόζης στο μέσο ανάπτυξης

Φυτάρια *A. thaliana* 6 ημερών προετοιμάστηκαν σύμφωνα με το Κεφ. 3.11.1 και μεταφυτεύτηκαν σε στερεό θρεπτικό μέσο ½ MS που περιείχε 0.5% (w/v) σουκρόζη και 0.8% (w/v) άγαρ, σε αποστειρωμένες συνθήκες μέσα σε θάλαμο νηματικής ροής. Τα φυτά τοποθετήθηκαν σε μια νοητή γραμμή απόστασης 3 cm από την άκρη του τρυβλίου. Η πυκνότητα μεταφύτευσης ήταν 6 φυτά/τρυβλίο τα οποία είχαν απόσταση 1 cm μεταξύ τους. Στη συνέχεια, ποσότητα 5 µl από καλλιέργειες μικρής κλίμακας (10^8 CFU/ml) εμβολιάστηκε με τη μορφή κηλίδας (spot) πάνω σε κάθε ακρορρίζιο. Μετά τον εμβολιασμό τα τρυβλία σφραγίστηκαν με parafilm και τοποθετήθηκαν υπό γωνία 65° μέσα σε θάλαμο ανάπτυξης (16:8 φωτοπερίοδος, 22±1 °C, 50-60% σχετική υγρασία). Η επώαση με τα βακτήρια διήρκεσε 10 ημέρες. Για την αξιολόγηση της επίδρασης των βακτηρίων, τα φυτά ζυγίστηκαν και φωτογραφήθηκαν με ψηφιακή κάμερα ώστε να υπολογιστεί το μήκος της κεντρικής ρίζας. Σε κάθε μεταχείριση αντιστοιχούσαν 3 τρυβλία, ενώ το πείραμα επαναλήφθηκε άλλες δύο φορές για επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων. Ο σχεδιασμός των πειραμάτων συνοψίζεται και στον **Πίνακα 3.2**.

3.11.3.3 Εμβολιασμός στο ακρορρίζιο απουσία σουκρόζης στο μέσο ανάπτυξης

Φυτάρια *A. thaliana* Col-0 4 ημερών προετοιμάστηκαν σύμφωνα με το Κεφ. 3.11.1 και μεταφυτεύτηκαν σε στερεό θρεπτικό μέσο ½ MS που περιείχε 0.8% (w/v) άγαρ, σε αποστειρωμένες συνθήκες μέσα σε θάλαμο νηματικής ροής. Τα φυτά τοποθετήθηκαν σε μια νοητή γραμμή απόστασης 3 cm από την άκρη του τρυβλίου. Η πυκνότητα μεταφύτευσης ήταν 6 φυτά/τρυβλίο τα οποία είχαν απόσταση 1 cm μεταξύ τους. Τα τρυβλία σφραγίστηκαν με parafilm και τοποθετήθηκαν υπό γωνία 65° μέσα σε θάλαμο ανάπτυξης (16:8 φωτοπερίοδος, 22±1 °C, 50-60% σχετική υγρασία) για διάστημα 2 ημερών, ώστε τα φυτά να ανακάμψουν από την καταπόνηση της απουσίας σουκρόζης. Στη συνέχεια, ποσότητα 5 µl από καλλιέργειες μικρής κλίμακας (10^8 CFU/ml) εμβολιάστηκε με τη μορφή κηλίδας (spot) πάνω σε κάθε ακρορρίζιο. Μετά τον εμβολιασμό τα τρυβλία σφραγίστηκαν με parafilm και τοποθετήθηκαν υπό γωνία 65° μέσα σε θάλαμο ανάπτυξης (16:8 φωτοπερίοδος, 22±1 °C, 50-60% σχετική υγρασία). Η επώαση με τα βακτήρια διήρκεσε 10 ημέρες. Για την αξιολόγηση της επίδρασης των βακτηρίων, τα φυτά ζυγίστηκαν και φωτογραφήθηκαν με ψηφιακή κάμερα ώστε να υπολογιστεί το μήκος της κεντρικής ρίζας. Σε κάθε μεταχείριση αντιστοιχούσαν 3 τρυβλία, ενώ το πείραμα επαναλήφθηκε άλλες δύο φορές για επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων. Ο σχεδιασμός των πειραμάτων συνοψίζεται και στον **Πίνακα 3.2**.

3.11.3.4 Εμβολιασμός σε τρυβλίο με κεντρικό διαχωριστικό (I plate)

Στην περίπτωση των πειραμάτων με τα I plates για τη διερεύνηση της επίδρασης των πτητικών ενώσεων οι σπόροι μετά την αποστείρωσή τους (Κεφ. 3.11.1) τοποθετήθηκαν απευθείας στα

συγκεκριμένα τρυβλία που περιείχαν στερεό θρεπτικό μέσο ½ MS με 0.5% (w/v) σουκρόζη και 0.8% (w/v) άγαρ. Τα φυτά τοποθετήθηκαν σε μια νοητή γραμμή στο κέντρο του ενός χωρίσματος του τρυβλίου. Η πυκνότητα μεταφύτευσης ήταν 4 φυτά/τρυβλίο. Τα τρυβλία σφραγίστηκαν με parafilm και επώαστηκαν ανάποδα στους 4°C για 24 ώρες για να επιτευχθεί σπάσιμο του λήθαργου και συγχρονισμός της βλαστικότητας. Στη συνέχεια, ποσότητα 20 μl από καλλιέργειες μικρής κλίμακας (10^8 CFU/ml) εμβολιάστηκε με τη μορφή κηλίδας (spot) αντιδιαμετρικά του κάθε σπόρου στο δεύτερο διαμέρισμα του τρυβλίου. Μετά τον εμβολιασμό τα τρυβλία σφραγίστηκαν με διπλό parafilm και τοποθετήθηκαν σε οριζόντια θέση μέσα σε θάλαμο ανάπτυξης (16: 8 φωτοπερίοδος, 22 ± 1 °C, 50-60% σχετική υγρασία). Η επώαση με τα βακτήρια διήρκεσε 25 ημέρες. Για την αξιολόγηση της επίδρασης των βακτηρίων, τα φυτά ζυγίστηκαν και φωτογραφήθηκαν με ψηφιακή κάμερα ώστε να υπολογιστεί το εμβαδόν φυλλικής επιφάνειας κάθε μεταχείρισης. Σε κάθε μεταχείριση αντιστοιχούσαν 3 τρυβλία, ενώ το πείραμα επαναλήφθηκε άλλες δύο φορές για επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων. Ο σχεδιασμός των πειραμάτων συνοψίζεται και στον **Πίνακα 3.2**.

3.11.4 Εμβολιασμός μιγμάτων βακτηριακών στελεχών σε απόσταση από το ακρορρίζιο

Οι βακτηριακές καλλιέργειες μεμονωμένων στελεχών αποκτήθηκαν με τον τρόπο που περιγράφεται στο κεφάλαιο 3.2.3. Στη συνέχεια, ποσότητα 2 ml από κάθε καλλιέργεια φυγοκεντρήθηκε και το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 2 ml διαλύματος $MgCl_2$ (10 mM). Τέλος, ποσότητες των βακτηριακών εναιωρημάτων μεταφέρθηκαν σε καινούργια erpendorf όπου για τη δημιουργία των εμβολίων μεμονωμένων στελεχών έγινε ανάμιξη με θρεπτικό μέσο NB σε αναλογία 1:1, ενώ για τα εμβόλια των μιγμάτων έγινε ανάμιξη των εκάστοτε εναιωρημάτων σε αναλογία 1:1.

Φυτάρια *A. thaliana* 4 ημερών προετοιμάστηκαν σύμφωνα με το Κεφ. 3.11.1 και μεταφυτεύτηκαν σε στερεό θρεπτικό μέσο ½ MS που περιείχε 0.5% (w/v) σουκρόζη και 0.8% (w/v) άγαρ, σε αποστειρωμένες συνθήκες μέσα σε θάλαμο νηματικής ροής. Τα φυτά τοποθετήθηκαν σε μια νοητή γραμμή απόστασης 3 cm από την άκρη του τρυβλίου. Η πυκνότητα μεταφύτευσης ήταν 6 φυτά/τρυβλίο τα οποία είχαν απόσταση 1 cm μεταξύ τους. Στη συνέχεια, ποσότητα 5 μl από τα εκάστοτε εμβόλια (βλ. προηγούμενη παράγραφο) εμβολιάστηκε με τη μορφή κηλίδας (spot) σε απόσταση 3.5 cm από το ακρορρίζιο. Μετά τον εμβολιασμό τα τρυβλία σφραγίστηκαν με parafilm και τοποθετήθηκαν υπό γωνία 65° μέσα σε θάλαμο ανάπτυξης (16:8 φωτοπερίοδος, 22 ± 1 °C, 50-60% σχετική υγρασία). Η επώαση με τα βακτήρια διήρκεσε 12 ημέρες. Για την αξιολόγηση της επίδρασης των βακτηρίων, τα φυτά φωτογραφήθηκαν μακροσκοπικά με ψηφιακή κάμερα ώστε να υπολογιστεί το μήκος της κεντρικής ρίζας και στερεοσκοπικά ώστε να μελετηθούν τα ριζικά τριχίδια, ενώ αποκόπηκαν στη βάση του λαιμού για να ζυγιστεί το υπέργειο και υπόγειο μέρος. Σε κάθε μεταχείριση αντιστοιχούσαν 4 τρυβλία, ενώ το πείραμα επαναλήφθηκε άλλες δύο φορές για επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων. Ο σχεδιασμός των πειραμάτων συνοψίζεται και στον **Πίνακα 3.2**.

Πίνακας 3.2 Συγκεντρωτικός πίνακας με όλες τις μεταχειρίσεις και τις πειραματικές συνθήκες που εξετάστηκαν *in vitro* στο φυτό *A.thaliana*.

	Φυτά/τρυβλίο	Ανάπτυξη πριν τη μεταφύτευση ^a (DAS ^b)	Μεταφύτευση	Ανάπτυξη πριν τον εμβολιασμό (DAS ^b)	Ποσότητα εμβολίου (μl/φυτό)	Συγκέντρωση κυττάρων (CFU/ml)	Αξιολόγηση φαινοτύπου (DAS ^b)	Θερμοκρασία (°C)
<u>Πρώτη φάση</u>								
Απόσταση	10	5	½ MS suc ⁺	5	10	10 ⁹ -10 ¹⁰	20	25 ±1
<u>Δεύτερη φάση</u>								
Απόσταση	6	5	½ MS suc ⁺	5	5	10 ⁸	16	22±1
Επαφή	6	7	½ MS suc ⁺	7	5	10 ⁸	17	22±1
Επαφή	6	5	½ MS	7	5	10 ⁸	17	22±1
Πτητικά	4	5	-	1	20	10 ⁸	26	22±1
<u>Εμβολιασμός μυγμάτων</u>								
Απόσταση	6	5	½ MS suc ⁺	5	5	10 ⁸	17	22±1

^aΗ ανάπτυξη έγινε σε θρεπτικό μέσο ½ Murashige and Skoog (με βιταμίνες) με 0.8% άγαρ και 0.5% σουκρόζη.

^bΟ όρος DAS (days after sowing) αναφέρεται στις ημέρες που ακολούθησαν την τοποθέτηση των σπόρων στα τρυβλία και περιλαμβάνει τις 24 ώρες στους 4 °C (διαστρωμάτωση).

3.12 Δημιουργία βακτηριακών μεταλλαγμάτων με ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά

Για να απομονωθούν αποικίες ανθεκτικές στο αντιβιοτικό ριφαμπικίνη, βακτηριακές καλλιέργειες μικρής κλίμακας υπέστησαν γραμμωτή ανακαλλιέργεια (streaking) σε στερεό θρεπτικό μέσο NA και τα τρυβλία επώαστηκαν στους 30 °C για 20 ώρες. Στη συνέχεια, από το τρυβλίο απομονώθηκε μικρή ποσότητα βακτηριακών κυττάρων με τη βοήθεια αποστειρωμένης οδοντογλυφίδας και τοποθετήθηκε με τη μορφή streaking σε μια μικρή περιοχή στο στερεό θρεπτικό μέσο που περιείχε ριφαμπικίνη σε συγκέντρωση υποδιπλάσια εκείνης που χρησιμοποιείται σε κανονικές συνθήκες (25 µg/ml). Αυτό το βήμα επαναλήφθηκε μέχρι να καλυφθεί το τρυβλίο και ακολούθησε επώασή του στους 30 °C μέχρι να εμφανιστούν περιοχές όπου το βακτήριο έχει αναπτυχθεί. Στη συνέχεια, μεταφέρθηκαν βακτηριακά κύτταρα από το τρυβλίο των 25 µg/ml σε τρυβλίο με 50 µg/ml ριφαμπικίνης με τον ίδιο τρόπο που περιγράφηκε προηγουμένως. Αυτό συνεχίστηκε έως ότου απομονωθούν βακτηριακά κύτταρα με ανθεκτικότητα σε συγκέντρωση 200 µg/ml. Από εκεί λήφθηκαν βακτηριακά κύτταρα με αποστειρωμένη οδοντογλυφίδα και εμβολιάστηκαν σε αποστειρωμένο υγρό θρεπτικό μέσο που περιείχε 200 µg/ml ριφαμπικίνη, ενώ ακολούθησε επώαση υπό συνεχή ανάδευση (220-250 rpm) στους 30 °C για 24 ώρες. Στη συνέχεια, ποσότητα της βακτηριακής καλλιέργειας υπέστη διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις και επιστρώθηκε σε στερεό θρεπτικό μέσο NA που περιείχε 50 µg/ml ριφαμπικίνη. Μετά την επώαση του στους 30 °C για 20 ώρες, επιλέχθηκε μοναδιαία αποικία, καλλιεργήθηκε σε υγρό θρεπτικό μέσο NB με 50 µg/ml ριφαμπικίνη και τέλος ποσότητα της καλλιέργειας αναμίχθηκε με γλυκερόλη (20% v/v) και αποθηκεύτηκε στους -80 °C. Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε και για τα αντιβιοτικά στρεπτομυκίνη, αμπικιλίνη και τετρακυκλίνη. Ανθεκτικές απομονώσεις στο αντιβιοτικό ριφαμπικίνη κατασκευάστηκαν για όλα τα στελέχη, στο αντιβιοτικό τετρακυκλίνη για τα στελέχη Tel52 και Hir139, στο αντιβιοτικό στρεπτομυκίνη για το στέλεχος Hil4, ενώ στο αντιβιοτικό αμπικιλίνη για το στέλεχος Ter90.

3.13 Διερεύνηση συμβατότητας μιγμάτων βακτηριακών στελεχών στις ρίζες φυτών *Arabidopsis thaliana* Col-0 *in vitro*

Η διερεύνηση ικανότητας αποικισμού των μιγμάτων σε ρίζες *A. thaliana* πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το τροποποιημένο πρωτόκολλο των Beauregard et al. (2013). Φυτάρια *A.thaliana* προετοιμάστηκαν όπως στο Κεφ. 3.11.1 και αναπτύχθηκαν για 7 ημέρες συνολικά στο θάλαμο ανάπτυξης φυτών. Βακτηριακές καλλιέργειες μεγάλης κλίμακας προετοιμάστηκαν όπως στο Κεφ. 3.2.3 και στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκαν στις 7000 στροφές για 10' και πραγματοποιήθηκε επαναδιάλυση του ιζήματος σε αποστειρωμένο υγρό θρεπτικό MS. Σε κάθε μίγμα χρησιμοποιήθηκε είτε ένα στέλεχος ανθεκτικό στο αντιβιοτικό ριφαμπικίνη και το άλλο στέλεχος μη ανθεκτικό, είτε ένα στέλεχος ανθεκτικό στο αντιβιοτικό ριφαμπικίνη και το άλλο στέλεχος ανθεκτικό σε άλλο

αντιβιοτικό. Η οπτική πυκνότητα (OD_{600}) του εναιωρήματος προσαρμόστηκε στην τιμή 0.2 και στη συνέχεια, προετοιμάστηκαν τα εμβόλια μεμονωμένων και μιγμάτων βακτηρίων. Για την παρασκευή των βακτηριακών μιγμάτων αναμίχθηκαν ποσότητες από τα εναιωρήματα 2 στελεχών σε αναλογία 1:1 σε καινούργιο δοχείο erpendorf. Για την παρασκευή των μεμονωμένων βακτηριακών εμβολίων αναμίχθηκαν ποσότητες από το εναιώρημα κάθε στελέχους με αποστειρωμένο υγρό θρεπτικό MS σε αναλογία 1:1 σε καινούργιο δοχείο erpendorf. Σε δοχεία erpendorf προστέθηκαν 270 μ l αποστειρωμένου υγρού θρεπτικού MS και 30 μ l από τα βακτηριακά εμβόλια. Μετά από ανάδευση, φυτάρια *A. thaliana* Col-0 τοποθετήθηκε μέσα στο υγρό και τα δοχεία erpendorf επώστηκαν υπό συνεχή ανάδευση (90 rpm) στους 28 °C για 18 ώρες. Το θρεπτικό μέσο MS δεν περιείχε σουκρόζη, ώστε οι μόνες πηγές άνθρακα να προέρχονται από τις ριζικές εκκρίσεις και να διευκολυνθεί η αναγνώριση και η προσέγγιση του ακρορρίζιου του φυτού από τα βακτήρια.

Μετά από 18 ώρες επώσης, αφαιρέθηκε το υγρό θρεπτικό μέσο, προστέθηκε 1 ml διαλύματος MS, πραγματοποιήθηκε καλή ανάδευση για ξέπλυμα της ρίζας από χαλαρά προσδεδεμένα βακτήρια και του δοχείου erpendorf και το θρεπτικό αφαιρέθηκε. Αυτή η διαδικασία ξεπλύματος επαναλήφθηκε 1 φορά. Ακολούθως, 1 ml υγρού θρεπτικού μέσου MS προστέθηκε στο δοχείο και ακολούθησε καλή ανακίνηση με τη χρήση vortex (35 Hz) για 1 λεπτό ώστε να αποκολληθούν τα βακτήρια που είναι ισχυρά προσκολλημένα στη ρίζα. Τέλος, για τον προσδιορισμό των ζωντανών κυττάρων (CFU/ml) ακολουθήθηκε η διαδικασία του Κεφ. 3.2.4. Στην περίπτωση των μιγμάτων η κάθε αραιώση επιστρώθηκε σε 2 διαφορετικά θρεπτικά NA, όπου το ένα περιέχει ριφαμπικίνη (50 μ g/ml) και το άλλο κανένα αντιβιοτικό ή όπου το ένα περιέχει ριφαμπικίνη (50 μ g/ml) και το άλλο στρεπτομυκίνη (50 μ g/ml), ανάλογα με το μίγμα υπό εξέταση. Έτσι συγκρίνοντας τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των αποικιών, αλλά και τη διαφορά αριθμού αποικιών ανάμεσα στα τρυβλία που περιέχουν αντιβιοτικό και σε αυτά που δεν περιέχουν, μπορεί να προσδιοριστεί ο αριθμός κυττάρων που ήταν προσκολλημένα στη ρίζα για το κάθε βακτήριο.

Στο πείραμα υπήρχαν συνολικά 2 διαφορετικές καλλιέργειες (βιολογικές επαναλήψεις) για κάθε βακτήριο, 3 επαναλήψεις φυτών για κάθε μεταχείριση, και οι επιστρώσεις των αραιώσεων πραγματοποιήθηκαν σε 3 τεχνικές επαναλήψεις. Όλο το πείραμα επαναλήφθηκε ανεξάρτητα 2 φορές για την επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων.

3.14 Μικροσκοπική παρατήρηση αποικισμού βακτηρίων σε ρίζα *A.thaliana* Col-0

Για τη μικροσκοπική παρατήρηση και επιβεβαίωση του αποικισμού των βακτηρίων σε ρίζα *A.thaliana* χρησιμοποιήθηκαν επιπλέον φυτά που συμπεριλήφθηκαν στο πείραμα του Κεφ. **Σφάλμα! ο αρχείο προέλευσης της αναφοράς δεν βρέθηκε.**, κατά τον εμβολιασμό με μεμονωμένα βακτηριακά στελέχη. Φυτά που ξεπλύθηκαν 2 φορές, τοποθετήθηκαν σε αντικειμενοφόρο πλάκα με στερεοποιημένο μέσο αγαρόζης 1% (w/v) και παρατηρήθηκαν σε μικροσκόπιο Olympus BX40 με ενσωματωμένη κάμερα Olympus DP71.

3.15 Απομόνωση και ανάλυση μεταβολιτών των βακτηρίων από στερεό θρεπτικό μέσο εναντίον του *B. cinerea*

3.15.1 Απομόνωση ακατέργαστου εκχυλίσματος από το μέτωπο αλληλεπίδρασης βακτηρίων και *B. cinerea* σε διπλή καλλιέργεια

Η απομόνωση του ακατέργαστου εκχυλίσματος από το μέτωπο αλληλεπίδρασης βακτηρίων και *B. cinerea* πραγματοποιήθηκε μετά από διπλή καλλιέργεια (dual culture) σε θρεπτικό μέσο ΝΑ. Υπήρχαν συνολικά 2 μεταχειρίσεις, μία με βακτήριο και μύκητα στο τρυβλίο και μία μόνο με το βακτήριο. Συγκεκριμένα, πηγαδάκι (60x5 mm) σχηματίστηκε με τη βοήθεια αποστειρωμένου νυστεριού σε απόσταση 2 cm από την άκρη του τρυβλίου όπου εμβολιάστηκε ποσότητα 200 μl από βακτηριακή καλλιέργεια μικρής κλίμακας (Κεφ. 3.2.3). Για τη μεταχείριση με το μύκητα, 2 κομμάτια στερεού εμβολίου μύκητα *B. cinerea* (Κεφ. 3.3.2) τοποθετήθηκαν σε απόσταση 3.5 cm από το πηγαδάκι με απόσταση 4 cm μεταξύ τους. Στη συνέχεια, τα τρυβλία επώαστηκαν στους 25 °C για 6 μέρες. Μετά το πέρας της επώασης, πραγματοποιήθηκε κοπή της ζώνης παρεμπόδισης από κάθε τρυβλίο με τη βοήθεια αποστειρωμένου νυστεριού και ακολούθως τεμαχισμός του συνόλου των ζωνών σε πολύ μικρά κομμάτια.

Η εκχύλιση των μεταβολιτών πραγματοποιήθηκε με παραλλαγή της μεθόδου των (Costa et al., 2019; Bertrand et al., 2013). Το τεμαχισμένο θρεπτικό κάθε μεταχείρισης ζυγίστηκε και μεταφέρθηκε σε φιάλη universal. Προστέθηκαν 2 ml απιονισμένου νερού και ακολούθησε καλή ανακίνηση με τη βοήθεια vortex. Στη συνέχεια, προστέθηκαν τα αντιδραστήρια ethyl acetate σε συγκέντρωση 3,2 ml/g και formic acid 0.1% (v/v) και ακολούθησε καλή ανακίνηση με τη βοήθεια vortex για 1 λεπτό. Η φιάλη τοποθετήθηκε σε υδατικό λουτρό υπερήχων (Elmasonic S30H, Elma Schmidbauer GmbH, Germany) για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε η μεταφορά του υγρού διαλύματος της φιάλης σε διαχωριστική χοάνη και προστέθηκαν 2 ml απιονισμένου νερού για να βοηθήσουν στο διαχωρισμό της υδατικής και οργανικής φάσης. Μετά την απομάκρυνση της υδατικής φάσης, η οργανική φάση συλλέχθηκε, καθαρίστηκε με φίλτρο Whatman, τοποθετήθηκε σε σφαιρική φιάλη και στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε η εξάτμιση του διαλύτη σε Περιτροφικό Εξατμιστή (Rotary Evaporator) (Genevac HT-4, SP scientific, Ipswich, Suffolk, UK). Η επαναδιάλυση της στερεής φάσης της φιάλης πραγματοποιήθηκε με 500 μl HPLC grade methanol (Merck), ενώ το διάλυμα φιλτραρίστηκε με Whatman® Uniflo® (Sigma-Aldrich) και αποθηκεύτηκε σε δοχείο eppendorf στους -80 °C.

3.15.2 Διερεύνηση της βιοδραστικότητας του απομονωμένου ακατέργαστου εκχυλίσματος

Η διερεύνηση της βιοδραστικότητας του εκχυλίσματος πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της διπλής καλλιέργειας σε τρυβλίο με θρεπτικό μέσο PDA. Υγρό εμβόλιο μύκητα (Κεφ. 3.3.2) τοποθετήθηκε με τη μορφή κηλίδας (spot) 2.5 cm από την άκρη του τρυβλίου. Ακολούθησε τοποθέτηση χαρτιού

Whatmann διαμέτρου 6 mm και πάχους 3 mm εμποτισμένου με 20 μl του εκχυλίσματος σε απόσταση 2 cm από το εμβόλιου του μύκητα. Τα τρυβλία επώστηκαν στους 25 °C για 9 ημέρες. Ως μάρτυρας λειτούργησε Whatmann εμποτισμένο με methanol.

3.15.3 Ανάλυση ακατέργαστου εκχυλίσματος με Χρωματογραφία Λεπτής Στιβάδας (Thin Layer Chromatography, TLC) και βιοαυτογραφία με έγχυση άγαρ (agar overlay bioautography)

Πραγματοποιήθηκε η ανάλυση του απομονωμένου ακατέργαστου εκχυλίσματος με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC), ενώ ακολούθησε και βιοαυτογραφία για τον εντοπισμό των βιοδραστικών ενώσεων (Calvo et al., 2019). Η ανάλυση TLC πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας πλάκα καλυμμένη με το προσροφητικό υλικό πήγμα οξειδίου του πυριτίου ως στερεή φάση (silica gel 60 F254 plates, 20 × 20 cm, πάχους 0.20 mm; Merck) και διάλυμα χλωροφόρμιο-μεθανόλη-νερό (65:25:4, v/v/v) ως κινητή φάση. Στην πλάκα είχε σημειωθεί με μολύβι η γραμμή εκκίνησης και τερματισμού (1.5 cm από τα άκρα της πλάκας), καθώς και οι αποστάσεις μεταξύ των κηλίδων στη γραμμή εκκίνησης (2 cm). Τα δείγματα που αναλύθηκαν ήταν ακατέργαστα εκχυλίσματα από τις μεταχειρίσεις βακτηρίου και βακτηρίου-μύκητα. Ακολούθησε ενστάλαξη των δειγμάτων σε δόσεις 2 μl. Για την κάθε μεταχείριση χρησιμοποιήθηκε διαφορετικός συνολικός όγκος, μετά από δοκιμές, ανάλογα με τον ποιοτικό προσδιορισμό συγκέντρωσης των ουσιών στο διάλυμα. Ακολούθως, η πλάκα τοποθετήθηκε σε γυάλινη συσκευή ανάπτυξης χρωματογραφήματος, η οποία περιείχε 120 ml διαλύτη κινητής φάσης χλωροφόρμιο: μεθανόλη: νερό (65: 25: 4), διηθητικό χαρτί στη μία πλευρά της που είχε διαβραχεί από τη διαλύτη και ήταν κορεσμένη με υδρατμούς. Η άνοδος του διαλύτη κινητής φάσης στο σημείο τερματισμού σήμανε τη λήξη της χρωματογραφίας, η πλάκα απομακρύνθηκε από τη συσκευή και αφέθηκε να στεγνώσει. Προκειμένου να εντοπιστούν οι βιοδραστικές ενώσεις του χρωματογραφήματος, ακολουθήθηκε η μέθοδος της βιο-αυτογραφίας (bio-autography). Η πλάκα TLC τοποθετήθηκε σε φελιζόλ πάνω από στρώσεις διαβρεγμένου διηθητικού χαρτιού (για διατήρηση υγρασίας) και αλουμινόχαρτου. Υγρό εμβόλιο μύκητα (Κεφ. 3.3.2) ποσότητας 10 ml αναμίχθηκε με θρεπτικό PDA με περιεκτικότητα 0.8% (w/v) σε άγαρ, όταν ακόμα βρισκόταν σε υγρή μορφή μετά την αποστείρωσή του (121 °C για 20 λεπτά). Το μίγμα αυτό περιχύθηκε ομοιόμορφα πάνω σε ολόκληρη την πλάκα και αφέθηκε να πήξει. Στη συνέχεια, η πλάκα επώστηκε 25 °C για 24 ώρες. Μετά το πέρας της επώσης, εφαρμόστηκε διάλυμα χρωστικής ζωτικής ζωτικότητας βρωμιούχο άλας του τετραζόλιου (MTT, 2.5 mg/ml) (Levitz & Diamond, 1985) πάνω στην πλάκα και ακολούθησε επώση στους 25 °C για 18 ώρες, μέχρι τον πλήρη χρωματισμό των ζωντανών σπορίων και την εμφάνιση άχρωμων ζωνών που υποδηλώνουν περιοχή αντιμυκητιακής δραστηριότητας.

Για την κατά προσέγγιση ταυτοποίηση των βιοδραστικών ενώσεων υπολογίζεται ο συντελεστής επιβράδυνσης (Retention factor, R_f) από τον ακόλουθο τύπο, και η τιμή του συγκρίνεται με την υπάρχουσα βιβλιογραφία, με πειράματα που έχουν χρησιμοποιήσει την ίδια στερεή και κινητή φάση.

$$R_f = \frac{\text{Απόσταση του κέντρου της διαφανούς ζώνης}}{\text{Απόσταση του μετώπου της κινητής φάσης}}$$

3.15.4 Ταυτοποίηση εκκρινόμενων διαχεόμενων ενώσεων στα ακατέργαστα εκχύλισματα με χημική ανάλυση UHPLC-HRMS (Ultra-high performance liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry)

Η ανάλυση μεταβολιτών που βρίσκονται στο απομονωμένο ακατέργαστο εκχύλισμα πραγματοποιήθηκε στο Μπενάκειο Φυτοπαθολογικό Ινστιτούτο. Η χημική ανάλυση περιλάμβανε το συνδυασμό φασματομετρίας μάζας υψηλής ανάλυσης (High-Resolution Mass Spectrometry, HRMS) σε πλατφόρμα Q-Exactive Orbitrap (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA) και υγρής χρωματογραφίας εξαιρετικά υψηλής απόδοσης (Ultra-High-Performance Liquid Chromatography, UHPLC) με το σύστημα Dionex Ultimate 3000 UHPLC (Thermo Scientific™Dionex™, Sunnyvale, CA, USA). Ο διαχωρισμός πραγματοποιήθηκε σε στήλη αντίστροφης φάσης Hypersil Gold UPLC C18 (2.1×150 mm, 1.9μm) (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA). Η ανάλυση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε ταυτόχρονα σε θετικό (ESI+) και αρνητικό ιονισμό (ESI). Η κινητή φάση περιείχε τα διαλύματα, A (υπερκάθαρο νερό με την προσθήκη 0,1 % Formic acid) και B (acetonitrile) και η ανάλυση έγινε υπό βαθμωτή έκλυση ανά 30 min. Για διάστημα έκλυσης 0-21 λεπτά το διάλυμα κινητής φάσης περιείχε 95% A και 5% B, για διάστημα έκλυσης 21-24 λεπτά το διάλυμα κινητής φάσης περιείχε 5% A και 95% B, ενώ για διάστημα έκλυσης 24-30 λεπτά το διάλυμα κινητής φάσης περιείχε 95% A και 5% B. Η ροή έκλυσης ήταν 0,22 ml/ min, ενώ η σάρωση των δεδομένων πραγματοποιήθηκε σε εύρος μάζας 115- 1500 Da σε λειτουργία ταυτοποίησης (profile mode). Οι συνθήκες πραγματοποίησης HRMS ανάλυσης τόσο για το θετικό όσο και αρνητικό ιονισμό ήταν: θερμοκρασία τριχοειδούς σωλήνα (capillary temperature): 350 °C, τιμή του εφαρμοζόμενου δυναμικού (ηλεκτροψεκασμός) (spray voltage): 2,7 kV, Υψίσυχη τάση ραδιοσυχνότητας (Rf) του S-lense (S-lense Rf level): 50 V, ροή αερίου εκνέφωσης (sheath gas flow): 40 arb. units, ροή αερίου ξήρανσης (auxiliary gas flow): 5 arb. units, θερμοκρασία θερμαντήρα αερίου ξήρανσης (auxiliary gas heater temperature): 50 °C. Η διακριτική ικανότητα (resolution) της πλήρους σάρωσης ορίστηκε στα 70,000, ενώ για την εξαρτώμενη λειτουργία απόκτησης δεδομένων η διακριτική ικανότητα ορίστηκε στα 35,000, επιτρέποντας τον MS/MS κατακερματισμό των τριών πιο ισχυρών ιόντων. Η βαθμιαία κανονικοποιημένη ενέργεια θραυσματοποίησης ορίστηκε στα 35, 60 και 100. Τέλος, η θερμοκρασία της στήλης διατηρήθηκε στους 40 °C, ενώ η θερμοκρασία του δίσκου του δείγματος ορίστηκε στους 4 °C.

Η ταυτοποίηση των μεταβολιτών πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια της βιβλιοθήκης mzcloud (Advanced Mass Spectral Database) ή αναζητώντας στα δείγματα ήδη γνωστούς χημικούς τύπους και

μοριακές μάζες ενώσεων ενδιαφέροντος δημοσιευμένων στη βάση δεδομένων NORINE και την ανοιχτή βάση δεδομένων PubChem του NCBI. Η αναζήτηση των δευτερογενών μεταβολιτών πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του προγράμματος Compound Discoverer Software (version 2.1).

3.16 Βιολογική αντιμετώπιση έναντι φυτοπαθογόνων σε αποκομμένους καρπούς

Επιλεγμένα βακτηριακά στελέχη ή μεμονωμένα βακτηριακά στελέχη και μίγματά τους αξιολογήθηκαν για την ικανότητά τους να παρεμποδίζουν ασθένειες σε καρπούς με την προληπτική εφαρμογή τους.

3.16.1 Επιλογή και απολύμανση καρπών

Οι συλλεγμένοι καρποί με τους ποδίσκους φυλάχθηκαν στο ψυγείο (4°C) έως και 24 ώρες πριν τις μεταχειρίσεις. Η επιλογή των καρπών έγινε με βάση την ομοιογένειά τους σε μέγεθος, ωρίμανση και χρώμα, όπως και την απουσία ορατών τραυματισμών και μολύνσεων. Μετά την αφαίρεση των ποδίσκων, οι καρποί ξεπλύθηκαν επιμελώς με νερό βρύσης 3 φορές, αποστειρώθηκαν με εμβάπτιση σε 3% διάλυμα εμπορικής χλωρίνης για 20', ξεπλύθηκαν 5 φορές με αποστειρωμένο απιονισμένο νερό και αφέθηκαν να στεγνώσουν σε αποστειρωμένο θάλαμο νηματικής ροής. Οι καρποί ταξινομήθηκαν τυχαία στις διαφορετικές μεταχειρίσεις, τοποθετήθηκαν σε τρυβλία Petri και προκλήθηκε τεχνητή πληγή σε κάθε καρπό όπου αποτελεί το σημείο εμβολιασμού του βακτηρίου και του μύκητα.

3.16.2 Ανθράκνωση καρπών ελιάς (ποικιλία Κορωνέικη)

Αρχικά, επιλέχθηκαν καρποί ελιάς στο στάδιο ωρίμανσης 1 (κιτρινοπράσινο χρώμα) από δέντρα ελιάς ποικιλίας Κορωνέικη στην περιοχή της Καλαμάτας. Μετά την απολύμανση των καρπών όπως περιγράφεται παραπάνω, πραγματοποιήθηκε ομοιόμορφη πληγή με τη χρήση φελλοτρυπητήρα (cork borer) (3mm x 3mm). Στη συνέχεια, τοποθετήθηκε στην πληγή ποσότητα 5 μL εμβολίου από βακτηριακή καλλιέργεια μικρής κλίμακας. Εμβολιασμένοι και μη καρποί μεταφέρθηκαν σε πλαστικά κουτιά που είχαν προηγουμένως αποστειρωθεί με διάλυμα αιθανόλης και με ακτινοβολία UV-C για 30 λεπτά. Υγρό αποστειρωμένο διηθητικό χαρτί και δοχείο με νερό τοποθετήθηκαν στα πλαστικά δοχεία για διατήρηση υψηλού επιπέδου υγρασίας (RH>95%). Ακολούθησε επώαση στους 25 °C για 36 ώρες στο σκοτάδι ώστε να εδραιωθεί το βακτήριο. Στη συνέχεια, ποσότητα 5 μl διαλύματος κονιδίων του παθογόνου *Botrytis cinerea* (10⁵ σπόρια/ml) εμβολιάστηκε στην ίδια πληγή και οι καρποί επώαστηκαν στις προαναφερθείσες συνθήκες για 5 ημέρες. Στο πείραμα συμπεριλήφθηκαν καρποί - μάρτυρες για την πληγή, χωρίς προσθήκη οποιουδήποτε εμβολίου, για το θρεπτικό μέσο NB με προσθήκη διαλύματος και στα δύο στάδια εμβολιασμού, για το βακτήριο με προσθήκη NB στο δεύτερο στάδιο και για το μύκητα με προσθήκη NB στο πρώτο στάδιο. Στο τέλος του πειράματος

πραγματοποιήθηκε εγκάρσια τομή σε τυχαίο δείγμα καρπών και αποτυπώθηκε σε θρεπτικό μέσο ΝΑ για την επιβεβαίωση της ανάπτυξης των βακτηρίων.

Το πείραμα πραγματοποιήθηκε με 10 καρπούς ανά μεταχείριση, ενώ πραγματοποιήθηκε ανεξάρτητα 3 φορές συνολικά. Οι δείκτες «Συχνότητα εμφάνισης της ασθένειας (%)» και «Σοβαρότητα της ασθένειας (%)» υπολογίστηκαν με βάση το μέσο όρο κάθε ανεξάρτητου πειράματος (n=3). Η σοβαρότητα της ασθένειας υπολογίστηκε με βάση την κλίμακα διαβάθμισης του ποσοστού κάλυψης του καρπού από το παθογόνο που περιέχει 5 κλάσεις, όπου 0 = 0% , 1= 0⁺-25%, 2= 25⁺-50%, 3= 50⁺-75%, 4= 75⁺-100%, 5= καρπός που φέρει έντονη σποριογένεση του παθογόνου ή καρπός που έχει υποστεί μούμιοποίηση και φέρει λευκά-γκρι μυκήλια (Moral et al., 2008).

3.16.3 Τεφρά σήψη σε μικρόκαρπες τομάτες (βελανίδι) (ποικιλία Lobello)

Οι μικρόκαρπες τομάτες ποικιλίας Lobello αγοράστηκαν από κατάστημα με βιολογικά προϊόντα. Μετά την επιλογή και την απολύμανση των καρπών (Κεφ.3.16.1), προκλήθηκε ομοιόμορφη πληγή (3mm x 3mm) με τη χρήση αποστειρωμένου νυστεριού. Στη συνέχεια, τοποθετήθηκε στην πληγή ποσότητα 10 μL εμβολίου από βακτηριακή καλλιέργεια ενός στελέχους ή από μίξη βακτηριακών καλλιιεργειών δύο στελεχών (1:1) που περιείχε 10⁸ CFU/ml ή 10⁶ CFU/ml από κάθε στέλεχος (Κεφ.3.2.3).

Εμβολιασμένοι και μη καρποί μεταφέρθηκαν σε πλαστικά κουτιά που είχαν προηγουμένως αποστειρωθεί με διάλυμα αιθανόλης και με ακτινοβολία UV-C για 30 λεπτά. Υγρό αποστειρωμένο διηθητικό χαρτί και δοχείο με νερό τοποθετήθηκαν στα πλαστικά δοχεία για διατήρηση υψηλού επιπέδου υγρασίας (RH>95%). Ακολούθησε επώαση στους 25 °C για 1.5 ώρα στο σκοτάδι ώστε να εδραιωθεί το βακτήριο. Στη συνέχεια, ποσότητα 10 μl διαλύματος κονιδίων του παθογόνου *Botrytis cinerea* (10⁵ σπόρια/ml) (Κεφ. 3.3.2) εμβολιάστηκε στην ίδια πληγή και οι καρποί επωάστηκαν στις προαναφερθείσες συνθήκες για 3 ημέρες. Στο πείραμα συμπεριλήφθηκαν καρποί- μάρτυρες για την πληγή, χωρίς προσθήκη οποιουδήποτε εμβολίου, για το θρεπτικό μέσο NB με προσθήκη διαλύματος και στα δύο στάδια εμβολιασμού, για το βακτήριο με προσθήκη NB στο δεύτερο στάδιο και για το μύκητα με προσθήκη NB στο πρώτο στάδιο. Στο τέλος του πειράματος πραγματοποιήθηκε εγκάρσια τομή σε τυχαίο δείγμα καρπών και αποτυπώθηκε σε θρεπτικό μέσο ΝΑ για την επιβεβαίωση της ανάπτυξης των βακτηρίων.

Κάθε μεταχείριση αποτελούταν από 12 καρπούς, ενώ πραγματοποιήθηκε ανεξάρτητα 3 φορές συνολικά. Οι δείκτες «Συχνότητα εμφάνισης της ασθένειας (%)» και «Σοβαρότητα της ασθένειας (%)» υπολογίστηκαν με βάση το μέσο όρο κάθε ανεξάρτητου πειράματος (n=3), ενώ το εμβαδόν ασθένειας υπολογίστηκε από τις τιμές του συνόλου των καρπών (n=36), αφού αυτές δεν είχαν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των 3 πειραματικών επαναλήψεων. Η σοβαρότητα της ασθένειας υπολογίστηκε με βάση την κλίμακα διαβάθμισης του ποσοστού κάλυψης του καρπού από το παθογόνο που περιέχει 5 κλάσεις, όπου 0 =0% , 1= 0⁺-10%, 2= 10⁺-25%, 3= 25⁺-50%, 4= 50⁺-75%, 5= 75⁺-100% (Vieira et al., 2010).

3.16.4 Τεφρά σήψη σε επιτραπέζια σταφύλια

Μετά την επιλογή και την απολύμανση των καρπών (Κεφ.3.16.1), προκλήθηκε ομοιόμορφη πληγή (2mm x 2mm) με τη χρήση αποστειρωμένου ρύγχους πιπέτας. Στη συνέχεια, τοποθετήθηκε στην πληγή ποσότητα 5 μL εμβολίου από βακτηριακή καλλιέργεια ενός στελέχους ή από μίξη βακτηριακών καλλιεργειών δύο στελεχών (1:1) που περιέχει 10^8 CFU/ml από κάθε στέλεχος (Κεφ. 3.2.3). Εμβολιασμένοι και μη καρποί μεταφέρθηκαν σε πλαστικά κουτιά που είχαν προηγουμένως αποστειρωθεί με διάλυμα αιθανόλης και με ακτινοβολία UV-C για 30 λεπτά. Υγρό αποστειρωμένο διηθητικό χαρτί και δοχείο με νερό τοποθετήθηκαν στα πλαστικά δοχεία για διατήρηση υψηλού επιπέδου υγρασίας (RH>95%). Ακολούθησε επώαση στους 25 °C για 36 ώρες στο σκοτάδι ώστε να εδραιωθεί το βακτήριο. Στη συνέχεια, ποσότητα 5 μl διαλύματος κονιδίων του παθογόνου *Botrytis cinerea* (10^5 σπόρια/ml) (Κεφ. 3.3.2) εμβολιάστηκε στην ίδια πληγή και οι καρποί επώαστηκαν στις προαναφερθείσες συνθήκες για 3 ημέρες. Στο πείραμα συμπεριλήφθηκαν καρποί- μάρτυρες για την πληγή, χωρίς προσθήκη οποιουδήποτε εμβολίου, για το θρεπτικό μέσο NB, με προσθήκη διαλύματος και στα δύο στάδια εμβολιασμού, για το βακτήριο, με προσθήκη NB στο δεύτερο στάδιο και για το μύκητα, με προσθήκη NB στο πρώτο στάδιο. Στο τέλος του πειράματος πραγματοποιήθηκε εγκάρσια τομή σε τυχαίο δείγμα καρπών και αποτυπώθηκε σε θρεπτικό μέσο NA για την επιβεβαίωση της ανάπτυξης των βακτηρίων.

Το πείραμα πραγματοποιήθηκε έχοντας 10 καρπούς ανά μεταχείριση, ενώ πραγματοποιήθηκε ανεξάρτητα 3 φορές συνολικά. Οι δείκτες «Συχνότητα εμφάνισης της ασθένειας (%)» και «Σοβαρότητα της ασθένειας (%)» υπολογίστηκαν με βάση το μέσο όρο κάθε ανεξάρτητου πειράματος (n=3), ενώ το εμβαδόν ασθένειας υπολογίστηκε από τις τιμές του συνόλου των καρπών (n=30), αφού αυτές δεν είχαν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των 3 πειραματικών επαναλήψεων. Η σοβαρότητα της ασθένειας υπολογίστηκε με βάση την κλίμακα διαβάθμισης του ποσοστού κάλυψης του καρπού από το παθογόνο και τη σήψη, η οποία περιέχει 4 κλάσεις (Calvo et al., 2020), όπου 0 =0% , 1= 0⁺-25%, 2= 25⁺-50%, 3= 50⁺-75%, 4= 75⁺-100%.

3.16.5 Υπολογισμός δεικτών ασθένειας

Η Ένταση της ασθένειας (**Disease Incidence, DI**) υπολογίστηκε ως το ποσοστό των μολυσμένων καρπών με τον παρακάτω τύπο:

$$DI (\%) = \frac{n}{N} \times 100,$$

όπου n ο αριθμός των μολυσμένων καρπών και N ο αριθμός του συνόλου των καρπών.

Ο Δείκτης Σοβαρότητας της ασθένειας (**Disease Severity Index, DSI**) προσδιορίστηκε μετά από μέτρηση του ποσοστού εξάπλωσης της σήψης ή/και των υφών του μύκητα (σε σχέση με τη συνολική επιφάνεια του κάθε καρπού) και την υιοθέτηση της κατάλληλης κλίμακας διαβάθμισης της ασθένειας (rating scale) με βάση τη βιβλιογραφία που αποτυπώνει καλύτερα τα αποτελέσματα. Για τον

υπολογισμό του δείκτη σε μορφή ποσοστού χρησιμοποιήθηκε ο ακόλουθος τύπος (McKinney, 1923; Chaube & Singh, 1991), που εκφράζει το σταθμισμένο μέσο όρο της ασθένειας ως ποσοστό του υψηλότερου δυνατού επιπέδου.

$$DSI (\%) = \frac{\sum(di)}{DN} \times 100$$

όπου d είναι ο αριθμός των καρπών σε κάθε κλάση, i (0-5) είναι ο αριθμός της αντίστοιχης κλάσης, N ο συνολικός αριθμός καρπών και D ο αριθμός που αντιστοιχεί στη μεγαλύτερη κλάση.

Το **Εμβαδόν ασθένειας** υπολογίστηκε ως η περιοχή που καλύπτεται από σήψη ή/και υφές του παθογόνου μύκητα (mm²).

3.16.6 Μελέτες αποικισμού στις πληγές των καρπών

Για την εξέταση του βαθμού αποικισμού στις πληγές των καρπών, πραγματοποιήθηκε ο ίδιος πειραματικός σχεδιασμός με τη μελέτη της καταπολέμησης της ασθένειας, με τη διαφορά ότι χρησιμοποιήθηκαν τα τεχνητά ανθεκτικά σε αντιβιοτικά στελέχη. Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε είναι βασισμένο στη μελέτη των Parafati και συνεργατών (2015). Μετά το τέλος της επώασης, ιστός που περιείχε την πληγή (περίπου 1 gr) αφαιρέθηκε με τη βοήθεια αποστειρωμένου νυστεριού, ζυγίστηκε και ομογενοποιήθηκε σε αποστειρωμένο υγρό θρεπτικό NB χρησιμοποιώντας γουδί. Η πάστα υπέστη αραιώσεις, οι οποίες επιστρώθηκαν σε στερεό θρεπτικό μέσο NA που περιείχε το κατάλληλο αντιβιοτικό ανάλογα με το εκάστοτε στέλεχος, καθώς και 50 μg/ml chloramphenicol για την αποφυγή ανάπτυξης μυκήτων. Στην περίπτωση των μιγμάτων βακτηριακών στελεχών, η κάθε αραιώση επιστρώθηκε σε δύο τρυβλία με διαφορετικά αντιβιοτικά, ανάλογα με το εκάστοτε ζεύγος. Τα τρυβλία επώαστηκαν για 24 ώρες στους 30 °C και προσδιορίστηκαν τα CFU ανά πληγή του καρπού.

3.17 Επίδραση στην ανάπτυξη του φυτού *Solanum lycopersicum* var. *chondrokatsari* με τη μέθοδο βιοδιέγερσης σπόρου

3.17.1 Βιοδιέγερση σπόρου με χρήση παράγοντα προσκόλλησης

Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε για τη βιοδιέγερση των σπόρων με χρήση παράγοντα προσκόλλησης είναι παραλλαγμένη εκδοχή των El-Mougy et al. (2008) και Babu et al. (2015).

Αρχικά, οι σπόροι τομάτας υπέστησαν επιφανειακή απολύμανση με εμβάπτισή τους σε 3% διάλυμα πυκνής χλωρίνης για 6 λεπτά. Ακολούθησε απομάκρυνση του διαλύματος χλωρίνης και ξέπλυμα των σπόρων με αποστειρωμένο απιονισμένο νερό για 1 λεπτό, 6 φορές συνολικά. Τέλος, οι σπόροι απλώθηκαν σε αποστειρωμένα τρυβλία για να στεγνώσουν σε αποστειρωμένο θάλαμο νηματικής ροής.

Ποσότητα 10 ml από κάθε βακτηριακή καλλιέργεια μεγάλης κλίμακας (**Κεφ. 3.2.3**) φυγοκεντρήθηκε στις 7000 στροφές για 15 λεπτά και το ίζημα βακτηριακών κυττάρων επαναδιαλύθηκε με 2 ml αποστειρωμένο απιονισμένο νερό. Το εναιώρημα αυτό προστέθηκε σε αποστειρωμένο δοχείο falcon που περιείχε 8 ml διαλύματος CMC συγκέντρωσης 1.25%, ώστε η τελική συγκέντρωση CMC να είναι 1%. Ως αρνητικός μάρτυρας, ποσότητα 2 ml αποστειρωμένου απιονισμένου νερού προστέθηκε στο CMC. Για να επιβεβαιωθεί η καθαρότητα και η συγκέντρωση της καλλιέργειας, ποσότητα της καλλιέργειας χρησιμοποιήθηκε για διαδοχικές αραιώσεις.

Στη συνέχεια, επιφανειακά αποστειρωμένοι σπόροι τομάτας τοποθετήθηκαν στα δοχεία falcon και επώστηκαν για 1.5 ώρα στους 25 °C υπό ανάδευση. Μετά το πέρας της επώασης, το περιεχόμενο του δοχείου αδειάστηκε και οι σπόροι αφέθηκαν να στεγνώσουν απλωμένοι σε τρυβλία στο θάλαμο νηματικής ροής για περίπου 30 λεπτά. Μετά το στέγνωμα, λήφθηκε δείγμα σπόρων από κάθε μεταχείριση και τοποθετούνται σε τρυβλίο με θρεπτικό μέσο NA όπου επωάζονται 20 ώρες στους 30 °C, για να επιβεβαιωθεί η επιτυχής προσκόλληση των βακτηριακών κυττάρων στο σπόρο.

3.17.2 Επίδραση στη βλαστικότητα σε *in vitro* συνθήκες

Σπόροι μετά τη βιοδιέγερση (**Κεφ. 3.17.1**) τοποθετήθηκαν σε τετράγωνα τρυβλία Petri (12x12 cm) που περιείχαν στερεό θρεπτικό υπόστρωμα ½ MS. Στη συνέχεια, τα τρυβλία καλύφθηκαν με αλουμινοχαρτο και τοποθετήθηκαν στους 25 °C για 3 ημέρες ώστε να βλαστήσουν. Χρησιμοποιήθηκαν 4 τρυβλία με 16 σπόρους/τρυβλίο για κάθε μεταχείριση. Κάθε επανάληψη προερχόταν από διαφορετική καλλιέργεια του ίδιου στελέχους. Η βλαστικότητα καταγράφηκε στις 3 και τις 8 ημέρες μετά τη βιοδιέγερση του σπόρου. Το πείραμα πραγματοποιήθηκε 2 φορές συνολικά.

3.17.3 Επίδραση στην ανάπτυξη σε *in vitro* συνθήκες

Σπόροι μετά τη βιοδιέγερση (**Κεφ. 3.17.1**) τοποθετήθηκαν σε τετράγωνα τρυβλία Petri (12x12 cm) που περιείχαν στερεό θρεπτικό υπόστρωμα ½ MS. Χρησιμοποιήθηκαν 4 τρυβλία με 16 σπόρους/τρυβλίο για κάθε μεταχείριση. Στη συνέχεια, τα τρυβλία καλύφθηκαν με αλουμινοχαρτο και τοποθετήθηκαν στους 25 °C για 3 ημέρες ώστε να βλαστήσουν. Στη συνέχεια, διαφανή πλαστικά δοχεία αποστειρώθηκαν με διάλυμα αιθανόλης 70% και με ακτινοβολία UV για 25 λεπτά. Τα τρυβλία μεταφέρθηκαν υπό ασηπτικές συνθήκες στα αποστειρωμένα πλαστικά δοχεία χωρίς τα καπάκια τους, τα δοχεία σφραγίστηκαν και επώστηκαν σε θάλαμο ανάπτυξης φυτών με 16/8 φωτοπερίοδο και 25 °C για άλλες 5 ημέρες. Στις 8 ημέρες μετά τη βιοδιέγερση, τα φυτάρια τομάτας, απομακρύνθηκαν από το άγαρ και καθαρίστηκαν ελαφρώς με αποστειρωμένο διηθητικό χαρτί. Στη συνέχεια, μετρήθηκε το ολικό νωπό βάρος και φωτογραφίστηκαν με ψηφιακή κάμερα ώστε να μετρηθούν χαρακτηριστικά, όπως το μήκος ρίζας, μήκος βλαστού και εμβαδόν ρίζας. Επίσης, δείγματα φυτών από κάθε μεταχείριση τοποθετήθηκαν σε θρεπτικό μέσο NA για να επιβεβαιωθεί η αποίκιση των βακτηρίων στη ρίζα. Λόγω των δειγμάτων που απομακρύνθηκαν για επιβεβαίωση του αποικισμού και του γεγονότος ότι δε βλάστησε το σύνολο των σπόρων σε όλες τις μεταχειρίσεις, χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 45

φυτά από κάθε μεταχείριση για τη στατιστική ανάλυση. Το πείραμα πραγματοποιήθηκε άλλη μία φορά για επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων ή έγινε διπλή επανάληψη την ίδια ημέρα με 2 διαφορετικές καλλιέργειες. Λόγω του μεγάλου αριθμού μεταχειρίσεων, αυτές ολοκληρώθηκαν σε διαφορετικές ημέρες και στο τέλος συγκρίθηκαν οι μάρτυρες κάθε ημέρας με στατιστική ανάλυση για να διασφαλιστεί ότι δεν υπήρχαν διαφοροποιήσεις. Στο τέλος, ένας αντιπροσωπευτικός μάρτυρας μίας ημέρας επιλέχθηκε για τη σύγκριση.

3.17.4 Επίδραση στην ανάπτυξη σε συνθήκες θερμοκηπίου

Οι βακτηριακές καλλιέργειες μεμονωμένων στελεχών αποκτήθηκαν με τον τρόπο που περιγράφεται στο κεφάλαιο 3.2.3. Για τις μονές μεταχειρίσεις, 10 ml καλλιέργειας φυγοκεντρήθηκαν και το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 2 ml νερό (αποστειρωμένο και διπλά απιονισμένο). Για τις μεταχειρίσεις με μίγματα, 10 ml καλλιέργειας από κάθε βακτήριο φυγοκεντρήθηκαν και το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 1 ml νερό (αποστειρωμένο και διπλά απιονισμένο), ενώ στη συνέχεια τα δύο διαλύματα ενώθηκαν. Ακολούθησε η διαδικασία της βιοδιέγερσης σπόρου, όπως αναγράφεται στο κεφάλαιο 3.17.1.

Το υπόστρωμα που χρησιμοποιήθηκε στις γλάστες (7x7 cm) ήταν μη αποστειρωμένο μίγμα μη εμπλουτισμένης τύρφης Klasmann (70%) και περλίτη (30%). Τοποθετήθηκαν 5 σποράκια σε κάθε γλάστρα (στις γωνίες και τη μέση) σε βάθος περίπου 1 cm με τη χρήση λαβίδας.

Τα εμβόλια δημιουργήθηκαν από 3 διαφορετικές καλλιέργειες κάθε φορά, ώστε να υπάρχουν 3 διαφορετικές επαναλήψεις του πειράματος ταυτόχρονα. Οι γλάστρες κάθε επανάληψης τοποθετήθηκαν σε ξεχωριστά σιδερένια σκαφάκια καλυμμένα με μαύρη πλαστική σακούλα για την αποφυγή απορροών και πραγματοποιούταν εναλλαγή της θέσης τους εντός του θερμοκηπίου κάθε 2 ημέρες. Οι γλάστρες ποτίστηκαν με νερό βρύσης πριν την τοποθέτηση των σπόρων και ελέγχονταν κάθε 2 ημέρες για ανάγκη ποτίσματος. Στις 5 μέρες μετά τη φύτευση των σπόρων, το φυτό αναδύθηκε από το χώμα. Στις 15 ημέρες μετά τη φύτευση των σπόρων, στο στάδιο των 2 πραγματικών φύλλων πραγματοποιήθηκε ριζοπότισμα με τις βακτηριακές καλλιέργειες. Παράχθηκαν εμβόλια μεμονωμένων καλλιεργειών και μιγμάτων καλλιεργειών (1:1), τα οποία εμβολιάστηκαν στις γλάστρες (10 ml/γλάστρα). Στις 18 ημέρες μετά τη φύτευση πραγματοποιήθηκε προσθήκη υγρού βασικού λιπάσματος με αγωγιμότητα 2.3 μS και pH 6.4 (20 ml/γλάστρα). Στις 30 ημέρες επαναλήφθηκε το ριζοπότισμα με τα βακτηριακά στελέχη με τον ίδιο τρόπο όπως προηγουμένως. Στις 35 ημέρες πραγματοποιήθηκε επανάληψη της λίπανσης σε ίδια αναλογία με αγωγιμότητα 2.45 μS και pH 6.37. Στις 44 ημέρες μετά τη φύτευση έληξε το πείραμα. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε 45 γλάστρες συνολικά για κάθε μεταχείριση, 15 γλάστρες από την κάθε ανεξάρτητη επανάληψη που προερχόταν από διαφορετική καλλιέργεια.

Τα φυτά, αφού απομακρύνθηκαν από τις γλάστρες, πλύθηκαν πολύ διεξοδικά με τρεχούμενο νερό και στέγνωσαν. Στη συνέχεια, φωτογραφήθηκαν με ψηφιακή κάμερα για να πραγματοποιηθούν μετρήσεις του μήκους του βλαστού, χωρίστηκαν με νυστέρι σε δύο μέρη (υπέργειο και υπόγειο) και

ζυγίστηκαν ξεχωριστά. Τέλος, κάθε μέρος τοποθετήθηκε σε χάρτινη σακούλα και πραγματοποιήθηκε ξήρανση τους στους 70 °C για 72 ώρες με σκοπό τον υπολογισμό του ξηρού βάρους.

3.17.5 Αποικισμός των βακτηριακών στελεχών στη ριζόσφαιρα σε συνθήκες θερμοκηπίου

Παράλληλα με το πείραμα που αφορούσε την επίδραση στα χαρακτηριστικά ανάπτυξης του φυτού, πραγματοποιήθηκε ο προσδιορισμός αποικισμού των βακτηριακών στελεχών στα μεμονωμένα εμβόλια, αλλά και στα μίγματα. Ο πειραματικός σχεδιασμός ήταν ίδιος, με τη διαφορά ότι χρησιμοποιήθηκαν τα στελέχη που είναι τεχνητώς ανθεκτικά σε αντιβιοτικά. Στις 44 ημέρες, λήφθηκε δείγμα εδάφους (1 gr) από τη ριζόσφαιρα, δηλαδή έδαφος που ήταν προσκολλημένο στις ρίζες του φυτού, και τοποθετήθηκε σε δοχείο falcon με αποστειρωμένο απιονισμένο νερό. Πραγματοποιήθηκαν 3 ανεξάρτητες επαναλήψεις, από διαφορετικές αρχικές βακτηριακές καλλιέργειες, και συνολικά λήφθηκε δείγμα από 15 γλάστρες, 5 γλάστρες από κάθε μεταχείριση. Ακολούθησε καλή ανάδευση του εναιωρήματος και πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις, ποσότητα των οποίων επιστρώθηκε σε στερεό θρεπτικό μέσο NA που περιείχε το κατάλληλο αντιβιοτικό. Μετά από επώαση 24 ωρών στους 30 °C, μετρήθηκαν οι αποικίες και υπολογίστηκε ο αριθμός CFU/ml.

3.18 Διερεύνηση επαγωγής διασυστηματικής αντοχής στο φυτό *Solanum lycopersicum* var. *Chondrokatsari* εναντίον του *B. cinerea* σε συνθήκες θερμοκηπίου

Για τη διερεύνηση επαγωγής διασυστηματικής αντοχής ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο του κεφαλαίου 3.17.4 με τη διαφορά ότι στις 36 ημέρες πραγματοποιήθηκε τρίτο ριζοπότισμα των βακτηρίων. Την επόμενη μέρα 10 ml υγρού εμβολίου μύκητα *B. cinerea* (Κεφ. 3.3.2) τοποθετήθηκε με τη μορφή κηλίδας (spot) σε μικρή επιφάνεια του δεύτερου πραγματικού φύλλου. Οι γλάστρες καλύφθηκαν με διαφανή μεμβράνη για τη διατήρηση της υγρασίας και επώαστηκαν για 5 ημέρες. Μετά το πέρας της επώασης, τα δεύτερα πραγματικά φύλλα αποκόπηκαν και φωτογραφήθηκαν με ψηφιακή κάμερα για τον υπολογισμό της έκτασης της νεκρωτικής κηλίδας σε κάθε μεταχείριση σε σύγκριση με τη μεταχείριση του μάρτυρα. Συνολικά, μετρήθηκαν φύλλα από 12 γλάστρες, 4 γλάστρες για κάθε ανεξάρτητη επανάληψη.

3.19 Ανάλυση επαγωγής έκφρασης γονιδίων άμυνας του φυτού *Solanum lycopersicum* var. *Chondrokatsari* σε συνθήκες θερμοκηπίου

3.19.1 Δειγματοληψία φύλλων

Οι βακτηριακές καλλιέργειες μεμονωμένων στελεχών αποκτήθηκαν με τον τρόπο που περιγράφεται στο κεφάλαιο 3.2.3, ενώ η βιοδιέγερση σπόρου με μεμονωμένα βακτήρια και μίγματα βακτηρίων πραγματοποιήθηκε όπως στο Κεφάλαιο 3.17.4. Το υπόστρωμα και η διαδικασία σποράς ήταν όμοια

με το Κεφάλαιο 3.17.4. Στις 15 ημέρες μετά τη φύτευση των σπόρων, στο στάδιο των 2 πραγματικών φύλλων, πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία των πρώτων πραγματικών φύλλων από 8 φυτά συνολικά με αποκοπή των φύλλων, τοποθέτηση σε δοχείο erpendorf και άμεση εμβάπτιση σε δοχείο με υγρό άζωτο. Η δειγματοληψία αυτή αφορούσε τη μεταχείριση της βιοδιέγερσης του σπόρου. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε ριζοπότισμα με τις βακτηριακές καλλιέργειες ή στην περίπτωση του μάρτυρα με νερό όπως αναφέρεται στο Κεφάλαιο 3.17.4. Σε χρονικό διάστημα 20 ωρών μετά τον εμβολιασμό με βακτήρια, πραγματοποιήθηκε η δεύτερη δειγματοληψία πρώτων πραγματικών φύλλων, με τον τρόπο που αναφέρεται παραπάνω. Τα δοχεία erpendorf με το φυτικό ιστό, μετά την εμβάπτιση σε υγρό άζωτο, αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία -80 °C.

3.19.2 Απομόνωση φυτικού RNA

Για την απομόνωση του φυτικού RNA ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο όπως ορίζεται από την εταιρεία Macherey-Nagel (NucleoSpin® RNA Plus). Αρχικά, ποσότητα 100 µg φυτικού ιστού ομογενοποιήθηκε με μηχανική κονιορτοποίηση. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 350 µl διαλύματος λύσης (Lysis Buffer, LBP) των φυτικών κυττάρων και πραγματοποιήθηκε ανάδευση στο vortex για 15 δευτερόλεπτα. Ακολούθως, το διάλυμα μεταφέρθηκε στην κολώνα NucleoSpin® gDNA Removal Column, φυγοκεντρήθηκε στις 11000 στροφές για 30 δευτερόλεπτα και η κολώνα απορρίφθηκε. Έγινε προσθήκη 100 µl διαλύματος πρόσδεσης (Binding Solution, BS), καλή ανάδευση, μεταφορά στην κολώνα NucleoSpin® RNA Plus Column και φυγοκέντρωση στις 11000 στροφές για 15 δευτερόλεπτα. Στη συνέχεια, προστέθηκε ποσότητα 200 µl διαλύματος ξεπλύματος No1 (Wash Buffer, WB1) στην κολώνα και έγινε φυγοκέντρωση στις 11000 στροφές για 15 δευτερόλεπτα. Προστέθηκε ποσότητα 600 µl διαλύματος ξεπλύματος No2 (Wash Buffer, WB2) στην κολώνα και έγινε φυγοκέντρωση στις 11000 στροφές για 15 δευτερόλεπτα. Ακολούθως, προστέθηκε ποσότητα 250 µl διαλύματος ξεπλύματος No2 (Wash Buffer, WB2) στην κολώνα και έγινε φυγοκέντρωση στις 11000 στροφές για 2 λεπτά. Τέλος, για την έκλυση του RNA η κολώνα μεταφέρθηκε σε δοχείο erpendorf, προστέθηκε ποσότητα 30 µl νερού απαλλαγμένου από RNAses (RNase-free water) και πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρωση στις 11000 στροφές για 1 λεπτό. Τέλος, το τελευταίο βήμα επαναλήφθηκε και το δοχείο erpendorf με το RNA αποθηκεύτηκε στους -80 °C. Για την επιβεβαίωση της απομόνωσης RNA, ποσότητα 2 µl αναμίχθηκε με 4 µl loading buffer και ηλεκτροφορήθηκε σε αποστειρωμένη πηκτή αγαρόζης 1.5% (w/v) που περιείχε φθορίζουσα χρωστική Misor Green (6 µl/100 ml).

3.19.3 Καθαρισμός του RNA

3.19.3.1 Απομάκρυνση του DNA με τη χρήση δεοξυριβονουκλεασής (DNase)

Κάθε αντίδραση περιείχε 4 µl RNA, 3 µl DNase buffer (10X), 1 µl DNase, 0.5 µl RNase inhibitor και 21.5 υπερκάθαρο νερό και ακολούθησε επώαση για 1 ώρα στους 37 °C.

3.19.3.2 Απομάκρυνση της δεοξυριβονουκλεάσης

Στην αντίδραση του Κεφαλαίου 3.19.3.1 προστέθηκαν 170 μl υπερκάθαρου νερού και 200 μl παγωμένης φαινόλης. Μετά από καλή ανακίνηση, έγινε φυγοκέντρηση στις 13000 στροφές για 5 λεπτά και η ανώτερη φάση μεταφέρθηκε σε νέο δοχείο erpendorf που περιείχε 100 μl παγωμένη φαινόλη και 100 μl χλωροφόρμιο. Μετά από καλή ανακίνηση, έγινε φυγοκέντρηση στις 15000 στροφές για 5 λεπτά και η ανώτερη φάση μεταφέρθηκε σε νέο δοχείο erpendorf που περιείχε 200 μl χλωροφόρμιο. Μετά από καλή ανακίνηση, έγινε φυγοκέντρηση στις 15000 στροφές για 5 λεπτά και η ανώτερη φάση μεταφέρθηκε σε νέο δοχείο erpendorf. Στη συνέχεια, προστέθηκε ποσότητα 2.5 φορές του όγκου αιθανόλη και 1/10 φορές του όγκου 3M οξικού νατρίου ($C_2H_3NaO_2$), έγινε καλή ανακίνηση και επώαση στους $-80\text{ }^{\circ}C$ για 1 ώρα. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 15000 στροφές για 20 λεπτά στους $4\text{ }^{\circ}C$, απομάκρυνση του υπερκείμενου και προσθήκη 200 μl διαλύματος 70% αιθανόλης. Το διάλυμα φυγοκεντρήθηκε στις 15000 στροφές για 20 λεπτά στους $4\text{ }^{\circ}C$, το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και επαναλήφθηκε φυγοκέντρηση για πλήρη απομάκρυνση της αιθανόλης. Τέλος, προστέθηκε ποσότητα 11 μl υπερκάθαρο νερό για επαναδιάλυση του ιζήματος και αποθήκευση στους $-80\text{ }^{\circ}C$.

Για τη διερεύνηση ύπαρξης υπολειμμάτων DNA μετά τη μεταχείριση με δεοξυριβονουκλεάση, πραγματοποιήθηκε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) χρησιμοποιώντας τους εκκινητές του γονιδίου ουμπικουιτίνης και θετικό μάρτυρα απομονωμένο φυτικό DNA τομάτας.

3.19.4 Αντίστροφη μεταγραφή και σύνθεση του συμπληρωματικού DNA (cDNA)

Η αντίστροφη μεταγραφή (Reverse Transcription, RT) είναι η διαδικασία σύνθεσης μιας συμπληρωματικής αλυσίδας DNA (cDNA) έχοντας ως εκμαγείο ένα μόριο RNA και πραγματοποιείται με το ένζυμο αντίστροφη μεταγραφάση (ή αντίστροφη τρανσκριπτάση), το οποίο στη φύση βρίσκεται σε RNA-ιούς (ρετροϊούς). Με αυτόν τον τρόπο, τα ευαίσθητα μόρια RNA μετατρέπονται σε σταθερά μόρια DNA, τα οποία διευκολύνουν τη μελέτη τους.

Για τη μετατροπή των μορίων RNA σε cDNA χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο της εταιρείας Takara Bio (Primescript 1st Strand cDNA Synthesis Kit). Σύμφωνα με το πρωτόκολλο προετοιμάστηκαν 2 διαλύματα. Το διάλυμα A περιείχε 1 μl μίγμα εκκινητών θυμίνης (Oligo dT Primer, 50 μM), 1 μl μίγματος τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs), 4,5 μl διαλύματος RNA, 3,5 μl υπερκάθαρο dH₂O (χωρίς RNase). Το διάλυμα B περιείχε 4 μl ρυθμιστικό διάλυμα (5x Prime Script Buffer), 0,5 μl αναστολέα της ριβονουκλεάσης (RNase Inhibitor), 1 μl αντίστροφη μεταγραφάση (Prime Script RTase), 4,5 μl υπερκάθαρο dH₂O (χωρίς RNase). Αρχικά, το διάλυμα A επώαστηκε στους $65\text{ }^{\circ}C$ για 5 λεπτά και μεταφέρεται απευθείας στον πάγο. Στη συνέχεια, το διάλυμα B προστέθηκε στο διάλυμα A και έγινε καλή ανάμιξη. Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε επώαση στους $42\text{ }^{\circ}C$ για 60 λεπτά και επώαση στους $95\text{ }^{\circ}C$ για 5 min, για την απενεργοποίηση του ενζύμου. Τέλος, το δοχείο erpendorf αποθηκεύτηκε στους $-20\text{ }^{\circ}C$.

3.19.5 Ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real-Time quantitative PCR, RT- qPCR)

Η ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου είναι μία γρήγορη και αξιόπιστη μέθοδος για την ποσοτικοποίηση συγκεκριμένων αλληλουχιών-στόχων σε πραγματικό χρόνο μέσω της χρήσης φθορίζουσων χρωστικών που προσδένονται στο DNA. Η αντίδραση πραγματοποιείται σε ειδικά μηχανήματα, τους θερμικούς κυκλοποιητές πραγματικού χρόνου. Τα δεδομένα συλλέγονται στην εκθετική φάση της αντίδρασης και για την ποσοτικοποίηση χρησιμοποιείται η τιμή Ct (threshold cycle), που αντιστοιχεί στον κύκλο κατά τον οποίο η ένταση του φθορισμού των προϊόντων ξεπερνά το κατώφλι του βασικού επιπέδου (baseline), τιμή που υπολογίζεται αυτόματα από το θερμικό κυκλοποιητή. Προκύπτει πως όσο μεγαλύτερος είναι ο αριθμός των mRNA στόχων στο δείγμα, τόσο μεγαλύτερος θα είναι και ο αριθμός των μορίων cDNA μετά την αντίστροφη μεταγραφή και τόσο μικρότερος ο αριθμός των κύκλων πολλαπλασιασμού που χρειάζονται για να παραχθεί ο απαιτούμενος αριθμός προϊόντων ώστε ο φθορισμός να ξεπεράσει το κατώφλι του βασικού επιπέδου. Πέραν των γονιδίων στόχων, των οποίων η μεταγραφή ίσως επηρεάζεται από τις συνθήκες και μεταχειρίσεις του πειράματος, ποσοτικοποιείται και ένα γονίδιο με σταθερά επίπεδα έκφρασης, το οποίο ονομάζεται γονίδιο αναφοράς (reference gene). Η ένταση έκφρασης αυτού του γονιδίου βοηθά στην εξομάλυνση των διαφορών που υπάρχουν ανάμεσα στα δείγματα λόγω αποκλίσεων της συγκέντρωσης του cDNA, ώστε να γίνει κανονικοποίηση των δειγμάτων (normalization) και να μπορούν να συγκριθούν μεταξύ τους.

Ως μήτρα της RT-qPCR χρησιμοποιήθηκε το cDNA που αποκτήθηκε στο προηγούμενο βήμα, το οποίο αποτελεί το αρχικό διάλυμα. Μετά την εξασφάλιση όμοιας συγκέντρωσης cDNA στα δείγματα, ποσότητα αραιώθηκε με αποστειρωμένο υπερκάθαρο νερό σε αναλογία 1:50 ώστε να χρησιμοποιηθεί στην αντίδραση σε αναλογία 1:10. Στο σύνολο των αντιδράσεων προστίθενται και αντιδράσεις αρνητικών controls χωρίς προσθήκη cDNA (Non-Template Control, NTC) για να ελεγχθεί η ύπαρξη επιμόλυνσης. Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν με βάση το πρωτόκολλο της εταιρείας Applied Biosystems (Power Up SYBR Green Master Mix). Κάθε αντίδραση περιείχε 1 μl εκκινητή forward (10 μM), 1 μl εκκινητή reverse (10 μM), 10 μl SYBR GREEN PowerUp, 5 μl cDNA (1:50) και 3 μl αποστειρωμένο υπερκάθαρο νερό.

Το πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν το ακόλουθο:

Ενεργοποίηση του UDG ενζύμου (Uracil-DNA Glycosylase)	50°C για 2'	} 40 κύκλοι
Ενεργοποίηση του ενζύμου πολυμεράσης	95 °C για 2'	
Αποδιάταξη της μήτρας cDNA	95 °C για 15''	
Υβριδισμός των εκκινητών	60 °C για 15''	
Επιμήκυνση	72°C για 1'	

Ως γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο της ουμπικουιτίνης (ubi3). Ως γονίδια στόχοι εξετάστηκαν γονίδια που μελετώνται συχνότερα στη βιβλιογραφία και εμπλέκονται στη Επαγόμενη

Διασυστηματική Αντοχή (Induced Systemic Resistance, ISR) και στην Επίκτητη Διασυστηματική Αντοχή (Systemic Acquired Resistance, SAR). Έτσι, εξετάστηκαν γονίδια που εμπλέκονται στο μονοπάτι του ιασμονικού οξέος-αιθυλενίου (jasmonic acid-ethylene, JA-ET) και συγκεκριμένα τα PI-I (Proteinase inhibitor-I), PI-II (Proteinase inhibitor-II), TomloxA (Lipoxygenase A), TomloxC (Lipoxygenase C), ERF1 (Ethylene response factor) και ACO1 (1-Aminocyclopropane-1-Carboxylic Acid Oxidase). Ακόμη, εξετάστηκαν γονίδια που εμπλέκονται στο μονοπάτι του σαλικυλικού οξέος (Salicylic Acid-SA) και συγκεκριμένα οι πρωτεΐνες που σχετίζονται με την παθογένεση (pathogenesis related proteins, PRs), PR1, PR2 (β -1,3-glucanase), PR3 (chitinase), PR4 (chitinase), PR5 (thaumatin-like protein). Τα ζεύγη εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν παραθέτονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 3.3) μαζί με τις αναφορές της αλληλουχίας από τη βιβλιογραφία. Σε όσα δεν αναφέρεται πηγή σχεδιάστηκαν με το λογισμικό Beacon Designer 7.

Πίνακας 3.3 Αλληλουχίες εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στις αντιδράσεις ποσοτικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (RT-qPCR).

Γονίδια	Εκκινητής forward (F) (5'→3')	Εκκινητής reverse (R) (5'→3')	Πηγή
Γονίδιο αναφοράς			
<i>UBI3</i>	GCCGACTACAACATCCAGAAGG	TGCAACACAGCGAGCTTAACC	Rotenberg et al., 2006
Γονίδια στόχοι			
<i>PR2</i>	TCCAGGTAGAGACAGTGGTAAA	CCTAAATATGTGCGGTTGAGA	Li et al., 2019
<i>PI-II</i>	GAAAATCGTTAATTTATCCCAC	ACATACAAACTTTCATCTTTA	Martinez-Medina et al., 2013
<i>TomloxA</i>	TGAACCATGGTGGGCTGAAA	CTGCCCGAAATTGACTGCTG	Tucci et al., 2011
<i>ERF1</i>	ATTGGAGTTAGAAAGAGGCCAT	CTCATTGATAATGCGGCTTG	Jia et al., 2013
<i>PR3</i>	AATTGTCAGAGCCAGTGTC	TCCAAAAGACCTCTGATTGC	-
<i>PR1</i>	GTGTCCGAGAGGCCAGACTA	ATTGTTGCAACGAGCCCGA	Li et al., 2019
<i>PR5</i>	CCTTGCCTTTGTGACTTAC	GAGAGGTCAGAGTTGGTG	-
<i>TomloxC</i>	GTGTATGTACCAAGAGATGAAG	GCATTGGAATCAGTCGTATC	-
<i>Prosystemin</i>	AAGGTTGAGTATGAGGAGGAAG	CTTCCTCCTCATACTCAACCTT	-
<i>ACO1</i>	TTCCAGCACCAGAGTTGATTG	ACAGTAGTCTCCACAGCCTTC	-

Η απόδοση της αντίδρασης (Efficiency, E) για κάθε γονίδιο-στόχο υπολογίστηκε από το λογισμικό LinReg (Ramakers et al., 2003), μέσω ανάλυσης γραμμικής παλινδρόμησης στο λογάριθμο των τιμών της έντασης φθορισμού σε κάθε κύκλο της αντίδρασης. Τα σχετικά επίπεδα των μεταγραφημάτων των γονιδίων στόχων για κάθε δείγμα υπολογίζονται με βάση τον τύπο: $(1+E)^{\Delta C_t}$, όπου E η αποδοτικότητα της αντίδρασης (efficiency) και $\Delta C_t = C_{t_{ref}} - C_{t_{target}}$, με $C_{t_{ref}}$ να αντιπροσωπεύει τον αριθμό κύκλων του γονιδίου αναφοράς και $C_{t_{target}}$ να αντιπροσωπεύει τον αριθμό κύκλων του γονιδίου στόχου. Στην περίπτωση όπου η αποδοτικότητα E του γονιδίου στόχου και του γονιδίου αναφοράς είχαν τιμές πάνω από 1.85 και λιγότερο από 5% διαφορά μεταξύ τους, η τιμή E ορίστηκε ως 1 (Livak & Schmittgen, 2001).

Στην περίπτωση όπου δεν ικανοποιούνταν αυτές οι συνθήκες χρησιμοποιήθηκε ο τύπος που προκύπτει από την εξίσωση Pfaffl (Pfaffl, 2001):

$$\frac{E_{ref}^{C_{t_{ref}}}}{E_{target}^{C_{t_{target}}}}$$

όπου E_{target} η αποδοτικότητα της αντίδρασης για το γονίδιο στόχο, C_{target} ο αριθμός κύκλων του γονιδίου στόχου, E_{ref} αποδοτικότητα της αντίδρασης για το γονίδιο αναφοράς και C_{ref} ο αριθμός κύκλων του γονιδίου αναφοράς.

Η απουσία τυχαίων μη ειδικών προϊόντων και διμερών των εκκινητών επιβεβαιώθηκε με την ανάλυση των καμπυλών αποδιάταξης (melt curve analysis).

Οι στατιστικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν στις λογαριθμικές τιμές της σχετικής έκφρασης, δηλαδή στα ΔC_t , για να εξασφαλιστούν οι παραδοχές της παραμετρικής στατιστικής ανάλυσης όπου τα δεδομένα θεωρείται ότι ακολουθούν κανονική κατανομή και εμφανίζουν ομοιογένεια των διακυμάνσεων. Στα διαγράμματα εμφανίζεται ο μέσος όρος σχετικής έκφρασης για κάθε μεταχείριση και το τυπικό σφάλμα (Mean \pm SEM).

3.20 Απομόνωση βακτηριακού γενωμικού DNA

Για την απομόνωση χρησιμοποιήθηκε το PureLink® Genomic DNA Mini Kit (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA).

3.21 Προσδιορισμός συγκέντρωσης και καθαρότητας νουκλεϊνικών οξέων (DNA)

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης και καθαρότητας σε διάλυμα πραγματοποιήθηκε φωτομετρικά με τη χρήση UV φασματοφωτόμετρου nanodrop (Nano Drop® ND-1000 Spectrophotometer). Τα νουκλεϊκά οξέα απορροφούν υπεριώδες φως λόγω των ετεροκυκλικών δακτυλίων των νουκλεοτιδίων σε μήκος κύματος 260 nm. Η καθαρότητα του διαλύματος DNA βασίζεται στους λόγους OD_{260}/OD_{280} (απορρόφηση DNA/ απορρόφηση πρωτεϊνών) και OD_{260}/OD_{230} . Ένα δείγμα DNA θεωρείται ικανοποιητικά καθαρό όταν ο λόγος OD_{260}/OD_{280} είναι περίπου 1.8. Μικρότερες τιμές αποτελούν ένδειξη προσμείξεων από την παρουσία πρωτεϊνών, φαινόλης, RNA ή άλλων ουσιών που απορροφούν στα 280 nm. Ο λόγος OD_{260}/OD_{230} ενός δείγματος υψηλής καθαρότητας κυμαίνεται μεταξύ των τιμών 1.8 και 2.2. Μικρότερες τιμές αποτελούν ένδειξη προσμείξεων από οργανικούς διαλύτες, όπως η ουρία και το EDTA και χαοτροπικά άλατα, όπως το GuHCl , ή άλλων ουσιών που απορροφούν στο μήκος κύματος 230 nm.

3.22 Αλληλούχιση γονιδιωμάτων

Πραγματοποιήθηκε αλληλούχιση του ολικού γονιδιώματος (Whole Genome Sequencing, WGS) επιλεγμένων βακτηριακών στελεχών, καθώς και η *in silico* πρόβλεψη γονιδίων ή επι-σημείωση (Annotation). Δείγματα DNA εστάλησαν στην εταιρεία SNPsaurus (Eugene, OR, USA) όπου αλληλουχίστηκαν με τη χρήση της τεχνολογίας Illumina HiSeq 2000 ακολουθώντας την προκαθορισμένη ροή εργασίας για την προετοιμασία βιβλιοθηκών, το καθάρισμα των αλληλουχιών-

διαβασμάτων (read trimming) και την ανασύσταση (assembly) των καθαρισμένων επικαλυπτόμενων αλληλουχιών σε συνεχή κομμάτια γονιδιώματος ή συναρμολογήματα (contigs), τα οποία ενώνονται για να σχηματίσουν μεγαλύτερα κομμάτια γονιδιώματος, τα ικριώματα (scaffolds). Η δημιουργία των βιβλιοθηκών πραγματοποιήθηκε με το Nextera tagmentation kit, ακολουθούμενη από αλληλούχιση που παρήγαγε 2x150 bp διαβάσματα διπλής κατεύθυνσης (paired-end reads). Οι αλληλουχίες των ειδικών προσαρμογέων (adaptors), εκκινητών κτλ αποκόπηκαν (trimming) από τα διαβάσματα με το εργαλείο BBDuk. Τέλος, η ανασύσταση (assembly) του γονιδιώματος πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα SPAdes 3.12.0 χρησιμοποιώντας τις προκαθορισμένες παραμέτρους (Bankevich et al. 2012). Η ποσότητα των καθαρισμένων αλληλουχιών-διαβασμάτων (trimmed paired reads), το ποσοστό κάλυψης του γονιδιώματος, ο αριθμός των ικριωμάτων (scaffolds) που προήλθαν από την ένωση των συναρμολογημάτων (contigs), καθώς και το μέγεθος του γονιδιώματος για κάθε στέλεχος παρουσιάζονται στον **Πίνακα 3.4**.

Πίνακας 3.4 Πληροφορίες από τη διαδικασία της αλληλούχισης για κάθε στέλεχος, το τελικό μέγεθος του γονιδιώματος και ο αριθμός πρόσβασης της κατατεθειμένης αλληλουχίας στη βάση δεδομένων NCBI.

Στέλεχος	Κάλυψη	Scaffolds	Μέγεθος Γονιδιώματος	Πλασμίδια	Accession Number
Hil4	60x	3	4,141,192 bp	-	JAHHQB000000000
Hir139	60x	3	3,910,173 bp	-	JAHHQC000000000
Tel34	60x	8	3,634,331 bp	-	JAEACH000000000
Tel52	60x	8	3,995,305 bp	-	Κατατέθηκε
Ter90	60x	3	4,031,190 bp	-	Κατατέθηκε

3.23 *In silico* ανάλυση των αλληλουχιών

3.23.1 Φυλογενετική ταξινόμηση με βάση το 16S rRNA γονίδιο

Οι αλληλουχίες των ενδοφυτικών μικροοργανισμών υποβλήθηκαν στο πρόγραμμα BLAST του NCBI (US National Center for Biotechnological Information) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Οι αλληλουχίες υποβλήθηκαν ως ερώτημα στο BLASTn και συγκεκριμένα στη βάση δεδομένων όλων των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών (nr/nt-nucleotide collection) χωρίς αλλαγή των προκαθορισμένων ρυθμίσεων του προγράμματος.

3.23.2 Ανάλυση του ολικού γονιδιώματος

Η φυλογενετική ταξινόμηση του στελέχους πραγματοποιήθηκε με την εφαρμογή του ψηφιακού DNA-DNA υβριδισμού (digital DNA-DNA hybridization, dDDH) χρησιμοποιώντας την πλατφόρμα υπολογισμού της απόστασης των γονιδιωμάτων (genome to genome distance calculator, GGDC) GGDC 2.1 (<http://ggdc.dsmz.de/ggdc.php>) με τις προκαθορισμένες ρυθμίσεις (Meier-Kolthof et al. 2013, 2022), καθώς και την πλατφόρμα υπολογισμού των τιμών ANI (<https://www.ezbiocloud.net/tools/ani>) που χρησιμοποιεί τον αλγόριθμο της ορθόλογης μέσης νουκλεοτιδικής ταυτότητας (orthologous average nucleotide identity, orthoANI) (Yoon et al., 2017).

Για την ανάλυση ANI και dDDH, οι τιμές κατωφλιού για το διαχωρισμό των ειδών ήταν αυτές που ορίζονται από τη βιβλιογραφία, δηλαδή 95-96% και 70%, αντίστοιχα. Ακόμη, πραγματοποιήθηκε φυλογενωμική ανάλυση, όπου κατασκευάστηκε δέντρο βασισμένο στη νουκλεοτιδική αλληλουχία ολόκληρων των γονιδιωμάτων και περιείχε στελέχη από διάφορα είδη. Η ανάλυση αυτή πραγματοποιήθηκε στο διακομιστή των πρότυπων ειδών Type (strain) Genome Server (TYGS) (<https://tygs.dsmz.de>). Το δέντρο δημιουργήθηκε με το πρόγραμμα FastME (Lefort et al., 2015) από τις τιμές των αποστάσεων της ανάλυσης Genome BLAST Distance Phylogeny (GBDP).

Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε λειτουργική ανάλυση του γονιδιώματος ή αλλιώς εξόρυξη του γονιδιώματος (genome mining) για εύρεση γονιδίων που σχετίζονται με την προώθηση της ανάπτυξης των φυτών και την αντιμετώπιση φυτοπαθογόνων μικροοργανισμών. Αρχικά, πραγματοποιήθηκε εύρεση συστάδων βιοσυνθετικών γονιδίων δευτερογενών μεταβολιτών με τη βοήθεια του προγράμματος antiSMASH 6.0 (antibiotics and Secondary Metabolites Analysis Shell) (Blin et al., 2019) (<https://antismash.secondarymetabolites.org>). Κάνοντας χρήση της δυνατότητας KnownClusteBLAST, το πρόγραμμα συγκρίνει την εντοπισμένη συστάδα με τις συστάδες που είναι καταχωρημένες στη βάση δεδομένων MIBiG (Minimum Information about a Biosynthetic gene cluster) (Medema et al., 2015) (<https://mibig.secondarymetabolites.org/query>), ενώ με τη δυνατότητα ClusterBLAST παρουσιάζει τα στελέχη με παρόμοια οργάνωση γονιδίων, όπως και το ποσοστό ομοιότητας. Η ύπαρξη γονιδίων που κωδικοποιούν για ένζυμα τα οποία συνθέτουν ή καταβολίζουν υδατάνθρακες εξετάστηκε με την ανάλυση του γονιδιώματος στο διακομιστή dbCAN2 (Zhang et al., 2018), ο οποίος κάνει χρήση της βάσης δεδομένων των ενζύμων με υπόστρωμα υδατάνθρακες (Carbohydrate-active enzymes, CAZy) (Lombard et al., 2014). Τέλος, αναζητήθηκαν γονίδια που είναι γνωστά βιβλιογραφικά για την εμπλοκή τους στην προώθηση της ανάπτυξης των φυτών και την αντιμετώπιση φυτοπαθογόνων μικροοργανισμών στο αρχείο επι-σημείωσης του γονιδιώματος. Ακόμη, έγινε η χρήση των εργαλείων βιοπληροφορικής BLASTn και BLASTp του διακομιστή BLAST που κάνει χρήση της βάσης δεδομένων NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) για την αναζήτηση ομολογίας νουκλεοτιδικών ή αμινοξικών περιοχών του στελέχους της διατριβής σε άλλα στελέχη, καθώς και τη στοίχιση περιοχών μεταξύ διαφορετικών στελεχών.

3.24 Μετρήσεις και στατιστική ανάλυση

Το πρόγραμμα Fiji (<https://imagej.net/Fiji>) χρησιμοποιήθηκε για όλες τις μετρήσεις. Οι στατιστικές αναλύσεις και τα διαγράμματα πραγματοποιήθηκαν με τα προγράμματα GraphPad Prism version 9.0.0 for Windows (GraphPad Software, San Diego, California USA) and IBM SPSS Statistics for Windows, version 25 (IBM Corp., Armonk, N.Y., USA). Η επιλογή των στατιστικών αναλύσεων βασίστηκε στην εκπλήρωση των παραδοχών τους από τα δεδομένα.

Η κανονική κατανομή ελέγχθηκε με τις αναλύσεις Kolmogorov-Smirnov ($n > 30$) ή Shapiro-Wilk ($n \leq 30$), ενώ η ομοιογένεια της διακύμανσης ελέγχθηκε με Levene's test. Εφόσον τα ανεξάρτητα

δεδομένα ακολουθούσαν κανονική κατανομή και είχαν ομοσκεδαστικότητα, πραγματοποιήθηκε παραμετρική ανάλυση διακύμανσης κατά έναν παράγοντα (one-way ANOVA) και αν υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά, ακολουθούσε Tukey's HSD post hoc test. Σε περίπτωση ετεροσκεδαστικότητας, χρησιμοποιήθηκε η ανάλυση Welch ANOVA και Brown-Forsythe ANOVA και η ανάλυση post hoc Games-Howell ώστε να βρεθούν οι διαφορές μεταξύ των μεταχειρίσεων. Δεδομένα που δεν πληρούσαν τις προϋποθέσεις μετασχηματίστηκαν αριθμητικά για τη βελτίωση της ομοιογένειας διακύμανσης και της κανονικότητας. Για παράδειγμα, δεδομένα ποσοστών ασθένειας και βλαστικότητας, μετασχηματίστηκαν σε arcsine ή logit τιμές (Chiang et al., 2017), ενώ παρουσιάζονται ως δεδομένα ποσοστών στα διαγράμματα. Επίσης, δεδομένα βακτηριακών πληθυσμών μετασχηματίστηκαν σε λογαριθμικές τιμές πριν την ανάλυση. Τα διαγράμματα απεικονίζουν μπάρες μέσω όρων και οι γραμμές σφάλματος την τυπική απόκλιση.

Αν δεν εκπληρώνταν η κανονική κατανομή, τα δεδομένα αναλύθηκαν με τη μη παραμετρική ανάλυση Kruskal Wallis H test, ενώ πραγματοποιήθηκαν πολλαπλές συγκρίσεις κατά ζεύγη Mann-Whitney με διόρθωση Bonferroni ώστε να εντοπιστούν οι διαφορές μεταξύ των διάμεσων των μεταχειρίσεων. Τα box-whiskers διαγράμματα απεικονίζουν το ελάχιστο, το πρώτο τεταρτημόριο, το διάμεσο, το τρίτο τεταρτημόριο και το μέγιστο του συνόλου δεδομένων.

Σε όλες τις περιπτώσεις, οι διαφορές θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές σε επίπεδο σημαντικότητας $\alpha=0.05$ ($p\text{-value}<0.05$) και η στατιστική ομαδοποίηση των μεταχειρίσεων υποδεικνύεται με γράμματα. Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν ανεξάρτητα 3 φορές. Εξάριση αποτελούν τα πειράματα θερμοκηπίου που πραγματοποιήθηκαν σε μία χρονική στιγμή, αλλά με 3 ανεξάρτητες επαναλήψεις από διαφορετικές αρχικές καλλιέργειες. Τα δεδομένα αναλύθηκαν είτε ως μέτρα θέσης των 3 ανεξάρτητων πειραμάτων ($n=3$), όπως τα πειράματα των αποκομμένων καρπών, είτε ως μέτρα θέσης των τιμών όλων των μεταχειρίσεων από 1 πείραμα που αντιπροσώπευε και τα υπόλοιπα λόγω παρόμοιων τιμών, όπως τα πειράματα με τα φυτά *A. thaliana*, είτε αναλύονταν το σύνολο των μετρήσεων από όλες τις ανεξάρτητες επαναλήψεις, όπως στο πείραμα του θερμοκηπίου.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 Επιλογή αντιπροσωπευτικών ενδοφυτικών βακτηριακών στελεχών

Η πρώτη επιλογή βακτηριακών στελεχών αφορά τη γρήγορη προκαταρκτική *in vitro* διερεύνηση υποσχόμενων ενδοφυτικών βακτηριακών απομονώσεων από τη συλλογή του εργαστηρίου Γενικής και Γεωργικής Μικροβιολογίας ως προς επιθυμητά χαρακτηριστικά για ένα επιτυχημένο βακτηριακό εμβόλιο, αλλά και την κατηγοριοποίηση και διαφοροποίησή τους ώστε να επιλεγούν ικανά αντιπροσωπευτικά στελέχη για το επόμενο στάδιο αναλύσεων.

4.1.1 Επιλογή ενδοφυτικών βακτηριακών στελεχών από τη συλλογή του εργαστηρίου

Τα βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν στη συγκεκριμένη μελέτη απομονώθηκαν από το εσωτερικό (ενδόσφαιρα) επιφανειακά αποστειρωμένων φύλλων και ριζικού συστήματος των αρωματικών φυτών *Teucrium polium* και *Hypericum hircinum*, τα οποία βρίσκονταν σε κοντινή απόσταση στο έδαφος, σε προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου (Θωμλούδη, 2018; Δάβαρη, 2019). Οι απομονώσεις αυτές ορίζονται ως «καλλιεργήσιμα ενδόφυτα» (culturable endophytes) και «προαιρετικά ή ευκαιρικά ενδόφυτα» (non-obligate or opportunistic endophytes), καθώς μπορούν να απομονωθούν και να καλλιεργηθούν σε θρεπτικό μέσο στο εργαστήριο (Hardoim et al., 2015). Επίσης, ορίζονται ως «θεωρούμενα ή εν δυνάμει ενδόφυτα» (putative endophytes), καθώς δεν πραγματοποιήθηκαν μελέτες επανεισαγωγής των στελεχών στο φυτό ξενιστή, ενώ η ευρέως χρησιμοποιούμενη επιφανειακή απολύμανση των ιστών που πραγματοποιήθηκε, αν και επιτυχής, δεν αποκλείει να έχουν επιζήσει βακτήρια που υπήρχαν σε σχισμές των ιστών ή είχαν σχηματίσει ισχυρό βιοϋμένιο. Ωστόσο, τέτοιου τύπου απομονώσεις έχουν και πάλι ιδιαίτερα στενή σχέση με το φυτό και δεν υπερέχουν αριθμητικά των πραγματικών ενδόφυτων, οπότε δεν επηρεάζουν τα αποτελέσματα (Costa et al., 2014). Έτσι, τα απομονωμένα στελέχη αναφέρονται ως ενδόφυτα σε όλη τη διατριβή.

Ο αρχικός αριθμός των βακτηρίων που είχαν απομονωθεί από κάθε ιστό του κάθε φυτού ήταν περίπου 50 και στη συνέχεια είχαν κατηγοριοποιηθεί σε ομάδες με βάση τη μορφολογία της αποικίας τους. Ακολούθησε διερεύνηση ως προς τη δράση τους έναντι του μύκητα *Rhizoctonia solani in vitro* και τα πιο αποτελεσματικά στελέχη από την κάθε ομάδα, ή τυχαία στελέχη αν αυτή η ομάδα δεν έδειξε αντιμυκητιακές ικανότητες, επιλέχθηκαν ως αντιπροσωπευτικά. Σε αυτά τα αντιπροσωπευτικά στελέχη ακολούθησε αλληλούχιση του γονιδίου 16S rRNA για γρήγορη φυλογενετική ταξινόμηση αυτών.

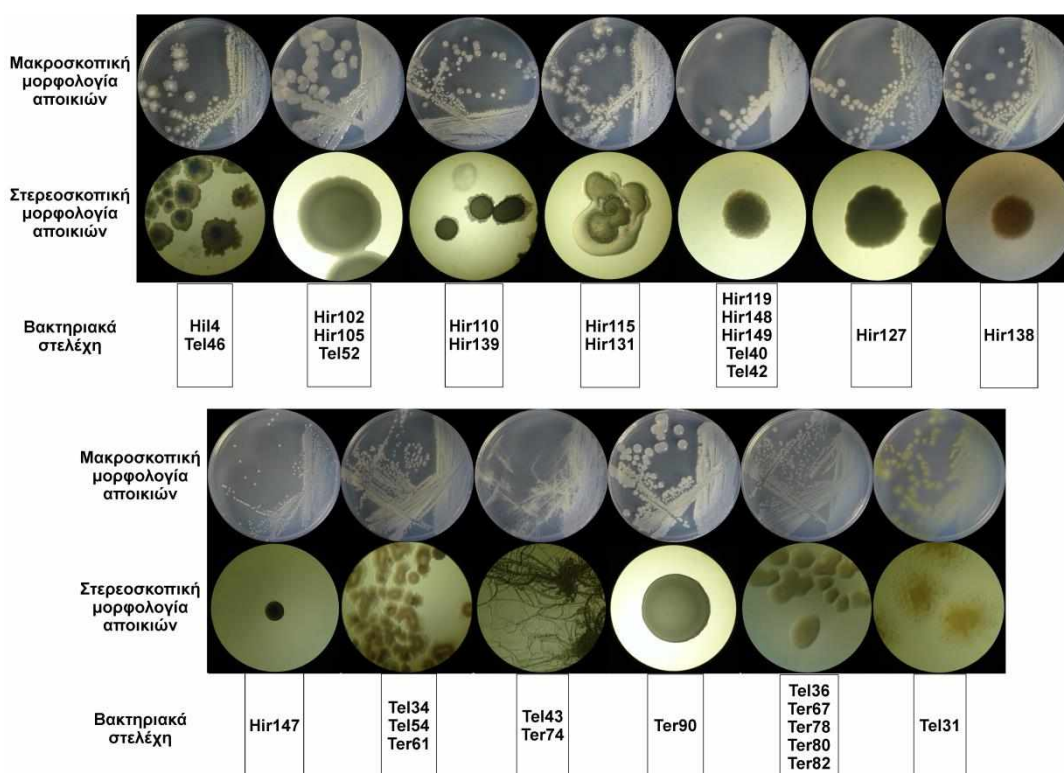
Τα κριτήρια επιλογής των στελεχών από την προηγούμενη συλλογή γι' αυτή τη διατριβή βασίστηκαν στην ομαδοποίηση των στελεχών με βάση μορφολογικά χαρακτηριστικά των αποικιών καθώς και την φυλογενετική ταξινόμηση μετά την αλληλούχιση του 16S γονιδίου και παρουσιάζονται παρακάτω:

- Επιλέχθηκαν απομονώσεις που ανήκουν στα γένη *Bacillus* ή *Pseudomonas*, καθώς αυτά φαίνεται να συγκεντρώνουν στελέχη με πολλαπλά χαρακτηριστικά προώθησης της ανάπτυξης των φυτών σύμφωνα με τη βιβλιογραφία.
- Δεύτερον, επιλέχθηκαν όλα τα διαφορετικά είδη όπως αυτά φάνηκαν, ενδεικτικά, από τη φυλογενετική ανάλυση του 16S rRNA γονιδίου.
- Τρίτον, επιλέχθηκαν δύο με τρία στελέχη από κάθε ομάδα, με προτίμηση αυτά να ανήκουν σε διαφορετικό φυτό ή διαφορετικό ιστό του ίδιου φυτού, όπου αυτό ήταν δυνατόν.

Τα επιλεγμένα βακτήρια αναλύονται παρακάτω ως προς τη μορφολογία της μοναδιαίας αποικίας (Κεφ. 4.1.1.1) και τη φυλογενετική τους ταξινόμηση (Κεφ. 4.1.1.2). Καθώς ο σκοπός της μελέτης είναι η ανάδειξη αποτελεσματικών στελεχών, τα επιλεγμένα ενδοφυτικά βακτήρια από τα δύο φυτά συγκρίνονται και αναλύονται ως ένα σύνολο βακτηριακών στελεχών.

4.1.1.1 Μελέτη της μορφολογίας των μοναδιαίων αποικιών

Εξετάστηκε η μορφολογία των μοναδιαίων αποικιών των ενδοφυτικών βακτηριακών απομονώσεων σε στερεό θρεπτικό μέσο NA με σκοπό τη διαφοροποίηση και ομαδοποίησή τους. Όπως φαίνεται και στην **Εικόνα 4.1** υπάρχει πληθώρα διαφορετικών ειδών αποικιών.



Εικόνα 4.1 Οι διαφορετικοί μορφότυποι των γενών *Bacillus* και *Pseudomonas* που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή τη μελέτη και τα στελέχη που ανήκουν στην κάθε κατηγορία. Στην εικόνα απεικονίζονται η μακροσκοπική φωτογραφία γραμμωτής ανακαλλιέργειας (πάνω) και η στερεοσκοπική φωτογραφία μοναδιαίας αποικίας (κάτω) για κάθε ομάδα.

Επίσης, παρατηρείται πως στην ίδια ομάδα μπορεί να έχουν ταξινομηθεί είτε βακτηριακές απομονώσεις και από τα δύο φυτά, είτε απομονώσεις μόνο από το ένα φυτό αλλά και από τους 2

ιστούς του, ενώ σε άλλες ομάδες αντιπροσωπεύεται ένας ιστός του ίδιου ή διαφορετικού φυτού. Ακόμη, αξιοσημείωτο είναι το γεγονός πως από τα φύλλα του φυτού *H. hircinum* απομονώθηκε μόνο ένα είδος μορφοτύπου αποικίας, που εκπροσωπείται από το στέλεχος Hi14.

4.1.1.2 Φυλογενετική ταξινόμηση με βάση το 16S rRNA γονίδιο

Η αλληλουχία 16S rDNA αποτελεί την πιο αποδεκτή και ευρέως χρησιμοποιούμενη αλληλουχία για την ταξινόμηση βακτηρίων καθώς περιέχει περιοχές συντηρημένες αλλά και περιοχές διαφοροποιημένες εξελικτικά. Επίσης, λόγω της ευρείας χρήσης της ως φυλογενετικό δείκτη, υπάρχει πληθώρα διαθέσιμων αλληλουχιών στις βάσεις δεδομένων. Παρ'ότι η ταξινόμηση σε επίπεδο είδους δεν είναι εφικτή με μόνο μία αλληλουχία-δείκτη, το 16S rRNA γονίδιο είναι ιδανικό για μία προκαταρκτική διαφοροποίηση και ταξινόμηση των βακτηρίων σε επίπεδο γένους και βακτηριακών φυλογενετικών ομάδων (groups). Συνδυασμένο μάλιστα με τη μορφολογία των αποικιών και διάφορων βιοχημικών χαρακτηριστικών, είναι εφικτός ο προκαταρκτικός διαχωρισμός των βακτηρίων.

Η φυλογενετική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του προγράμματος BLASTn θέτοντας ως υπερώτηση (query) την εξεταζόμενη αλληλουχία 16S rDNA στη βάση δεδομένων που περιέχει τις αλληλουχίες 16S rDNA πρότυπων βακτηριακών στελεχών (16S Ribosomal RNA Sequences of type strains). Η συγκεκριμένη βάση δεδομένων χρησιμοποιήθηκε καθώς περιέχει τις αλληλουχίες των πρότυπων στελεχών του κάθε είδους και θεωρείται πιο αξιόπιστη σε σχέση με τη βάση δεδομένων nr/nt. Οι παρακάτω πίνακες αφορούν τα αποτελέσματα της ανάλυσης που πραγματοποιήθηκε στις επιλεγμένες ενδοφυτικές βακτηριακές απομονώσεις των φυτών *H. hircinum* (**Πίνακας 4.1**) και *T. polium* (**Πίνακας 4.2**), όπου αναφέρονται ο κωδικός καταχώρισης (accession number) των εξεταζόμενων βακτηρίων στη βάση δεδομένων του NCBI, καθώς και τα κοντινότερα συγγενικά είδη που βρέθηκαν στη βάση GenBank.

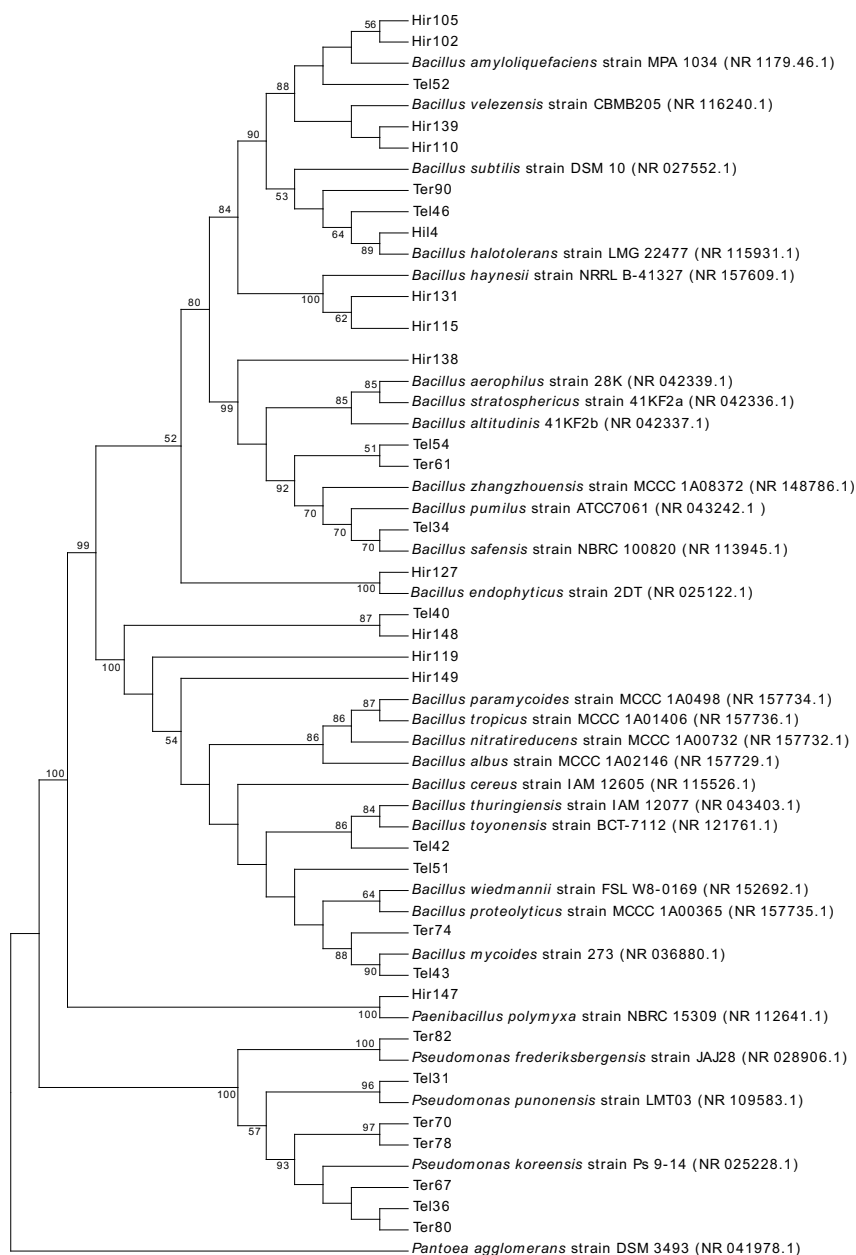
Πίνακας 4.1 Φυλογενετική ταξινόμηση των επιλεγμένων βακτηριακών απομονώσεων από τα φύλλα και το ριζικό σύστημα του φαρμακευτικού φυτού *Hypericum hircinum* με βάση την υποβολή της 16s rDNA αλληλουχία τους σε αντιπαραβολή με την 16S Ribosomal RNA Sequences βάση δεδομένων με τη βοήθεια του προγράμματος BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Προέλευση	Στέλεχος	Συγγενικό είδος στη βάση GenBank (αριθμός πρόσβασης)	Παραπομπές	Κάλυψη (%)	Ομοιότητα (%)	GenBank (αριθμός πρόσβασης)
Φύλλα	Hil4	<i>Bacillus halotolerans</i> LMG 22477 (NR_115931.1)	Wang et al., 2007	100	98.29	MW672513
		<i>Bacillus velezensis</i> CBMB205 (NR_116240.1)				
Ριζικό σύστημα	Hir102	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> MPA 1034 (NR_117946.1)	unpublished	99	98.80	MW673769
		<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> NBRC 15535 (NR_041455.1)				
	Hir105	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> NBRC 15535 (NR_041455.1)	Direct submission	98	98.98	MW673768
	Hir110	<i>Bacillus velezensis</i> CBMB205 (NR_116240.1)	unpublished	98	98.98	MW673780
	Hir115	<i>Bacillus haynesii</i> NRRL B-41327 (NR_157609.1)	Dunlap et al., 2017	99	97.95	MW672122
	Hir119	<i>Bacillus cereus</i> IAM 12605 (NR_115526.1)	Suzuki and Yamasato, 1994	100	97.78	MW672517
	Hir127	<i>Bacillus endophyticus</i> 2DT (NR_025122.1)	Reva et al., 2002	99	97.98	MW672595
	Hir131	<i>Bacillus haynesii</i> NRRL B-41327 (NR_157609.1)	Dunlap et al., 2017	99	97.70	MW672398
		<i>Bacillus altitudinis</i> 41KF2b (NR_042337.1)	Shivaji et al., 2006	100	97.75	
	Hir 138	<i>Bacillus aerophilus</i> 28K (NR_042339.1)	Shivaji et al., 2006	100	97.75	MW673767
		<i>Bacillus stratosphericus</i> 41KF2a (NR_042336.1)	Shivaji et al., 2006	100	97.75	
	Hir139	<i>Bacillus velezensis</i> CBMB205 (NR_116240.1)	unpublished	99	99.08	MW673772
	Hir147	<i>Paenibacillus polymyxa</i> NBRC 15309 (NR_112641.1)	unpublished	100	97.69	MW672515
	Hir148	<i>Bacillus cereus</i> IAM 12605 (NR_115526.1)	Suzuki and Yamasato, 1994	100	97.70	MW672518
		<i>Bacillus tropicus</i> MCCC 1A01406 (NR_157736.1)	Liu et al., 2007	100	97.43	
		<i>Bacillus proteolyticus</i> MCCC 1A00365 (NR_157735.1)	Liu et al., 2007	100	97.43	
		<i>Bacillus paramycooides</i> MCCC 1A04098 (NR_157734.1)	Liu et al., 2007	100	97.43	
	Hir149	<i>Bacillus nitratireducens</i> MCCC 1A00732 (NR_157732.1)	Liu et al., 2007	100	97.43	MW672520
		<i>Bacillus luti</i> MCCC 1A00359 (NR_157730.1)	Liu et al., 2007	100	97.43	
		<i>Bacillus albus</i> MCCC 1A02146 (NR_157729.1)	Liu et al., 2007	100	97.43	
	<i>Bacillus wiedmannii</i> FSL W8-0169 (NR_152692.1)	Miller et al., 2016	100	97.43		

Πίνακας 4.2 Φυλογενετική ταξινόμηση των επιλεγμένων βακτηριακών απομονώσεων από τα φύλλα και το ριζικό σύστημα του φαρμακευτικού φυτού *Teucrium polium* με βάση την υποβολή της 16S rDNA αλληλουχία τους σε αντιπαραβολή με την 16S Ribosomal RNA Sequences βάση δεδομένων με τη βοήθεια του προγράμματος BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Προέλευση	Στέλεχος	Συγγενικό είδος στη βάση GenBank (αριθμός πρόσβασης)	Παραπομπές	Κάλυψη (%)	Ομοιότητα (%)	GenkBank (αριθμός πρόσβασης)
Φύλλα	Tel31	<i>Pseudomonas punonensis</i> LMT03 (NR_109583.1)	Ramos et al., 2013	100	99.22	MW669573
	Tel34	<i>Bacillus safensis</i> NBRC 100820 (NR_113945.1)	unpublished	99	98.02	MW672501
	Tel36	<i>Pseudomonas koreensis</i> Ps 9-14 (NR_025228.1)	Kwon et al., 2003	99	98.17	MW698959
	Tel40	<i>Bacillus cereus</i> IAM 12605 (NR_115526.1)	Suzuki and Yamasato, 1994	99	97.58	MW672516
	Tel42	<i>Bacillus thuringiensis</i> IAM 12077 (NR_043403.1)	Suzuki and Yamasato, 1994	99	98.66	MW669574
		<i>Bacillus toyonensis</i> BCT-7112 (NR_121761.1)	Jimenez et al., 2013	99	98.66	
	Tel43	<i>Bacillus mycoides</i> 273 (NR_036880.1)	Goto et al., 2000	100	98.57	MW672583
	Tel46	<i>Bacillus halotolerans</i> LMG 22477 (NR_115931.1)	Wang et al., 2007	100	98.21	MW672514
	Tel51	<i>Bacillus proteolyticus</i> MCCC 1A00365 (NR_157735.1)	Liu et al., 2007	100	97.16	MW672519
		<i>Bacillus wiedmannii</i> FSL W8-0169 (NR_152692.1)	Miller et al., 2016	100	97.16	
	Tel 52	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> NBRC 15535 (NR_041455.1)	Direct submission	100	98.69	MW673771
	Tel54	<i>Bacillus pumilus</i> ATCC 7061 (NR_043242.1)	Satomi et al., 2006	100	99.1	MW672114
		<i>Bacillus zhangzhouensis</i> MCCC 1A08372 (NR_148786.1)	Lai et al., 2014	100	99.1	
	Ριζικό σύστημα	Ter61	<i>Bacillus safensis</i> NBRC 100820 (NR_113945.1)	unpublished	100	97.69
Ter67		<i>Pseudomonas koreensis</i> Ps 9-14 (NR_025228.1)	Kwon et al., 2003	100	99.36	MW698957
Ter70		<i>Pseudomonas koreensis</i> Ps 9-14 (NR_025228.1)	Kwon et al., 2003	100	99.07	MW698955
Ter74		<i>Bacillus mycoides</i> 273 (NR_036880.1)	Goto et al., 2000	100	99.10	MW672581
Ter78		<i>Pseudomonas koreensis</i> Ps 9-14 (NR_025228.1)	Kwon et al., 2003	100	98.32	MW698956
Ter80		<i>Pseudomonas koreensis</i> Ps 9-14 (NR_025228.1)	Kwon et al., 2003	100	99.08	MW698960
Ter82		<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i> JAJ28 (NR_028906.1)	Andersen et al., 2000	100	98.80	MW673781
Ter90		<i>Bacillus subtilis</i> DSM 10 (NR_027552.1)	unpublished	99	97.24	MW672116

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε η κατασκευή φυλογενετικού δέντρου με βάση τις αλληλουχίες 16S rDNA των βακτηριακών απομονώσεων και των κοντινότερων συγγενικών ειδών στη βάση δεδομένων GenBank (Εικόνα 4.2).



Εικόνα 4.2 Φυλογενετικό δέντρο με βάση το γονίδιο 16S rRNA των επιλεγμένων ενδοφυτικών βακτηρίων και γνωστών ειδών από τη βάση δεδομένων GenBank. Πριν την κατασκευή του δέντρου όλες οι αλληλουχίες υποβλήθηκαν σε πολλαπλή στοίχιση και περικοπήθηκαν με τον αλγόριθμο MUSCLE στο λογισμικό MEGA X (Kumar et al., 2018). Η φυλογενετική ανάλυση πραγματοποιήθηκε στο πρόγραμμα MEGA X χρησιμοποιώντας τον αλγόριθμο Neighbour-Joining (NJ) (Saitou & Nei, 1987) και το μοντέλο Kimura 2-parameter με ενεργοποιημένη την επιλογή της μερικής διαγραφής (partial deletion) και τις 1000 επαναλήψεις (bootstraps). Το ποσοστό των δέντρων στα οποία τα συγκεκριμένα στελέχη ομαδοποιήθηκαν με αυτόν τον τρόπο φαίνεται δίπλα στα κλαδιά (τιμές <50% δεν παρουσιάζονται).

Σύμφωνα με την πρόσφατη βιβλιογραφία, τα είδη και οι ομάδες του γένους *Bacillus* βρίσκονται σε διαδικασία επαναταξινόμησης υπό το πρίσμα της αλληλούχισης ολόκληρου γονιδιώματος (whole genome sequencing). Τα είδη του γένους *Bacillus* είναι ταξινομημένα σε δύο ομάδες (groups) και η

καθεμία είναι χωρισμένη σε κλάδους: την ομάδα *Bacillus cereus* και την ομάδα *Bacillus subtilis*. Η ομάδα του είδους *B. cereus* περιέχει τα στελέχη *Bacillus antracis*, *B. cereus*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus weidmannii* και άλλα. Η ομάδα του *Bacillus subtilis* είναι χωρισμένη σε 4 κλάδους (Fan et al., 2017). Ο κλάδος *B. subtilis* (Clade I) περιέχει είδη όπως *B. subtilis*, *Bacillus valismortis*, *Bacillus tequilensis*, *Bacillus halotolerans*, *Bacillus mojavenensis* και *Bacillus atrophaeus*. Ο κλάδος *Bacillus amyloliquefaciens* περιέχει τα είδη *Bacillus velezensis* (συγγώνευση των ειδών *B. velezensis*, *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum*, *Bacillus oryzicola*, *Bacillus methylophilus*) και *Bacillus siamensis*, τα οποία θεωρούνται σχετιζόμενα με φυτά, καθώς και το είδος *B. amyloliquefaciens*, που φαίνεται να προέρχεται από άλλες πηγές, όπως το έδαφος. Ο κλάδος *Bacillus licheniformis* (Clade III) περιέχει είδη όπως τα *B. licheniformis*, *Bacillus sonorensis* και *Bacillus haynesii*. Ο κλάδος *Bacillus pumilus* (Clade IV) περιέχει στελέχη όπως τα *Bacillus altitudinis*, *Bacillus aerophilus*, *Bacillus stratosphericus*, *Bacillus safensis*, *B. pumilus*.

Συνδυάζοντας τα αποτελέσματα από τους παραπάνω πίνακες (Πίνακας 4.1, Πίνακας 4.2) με το φυλογενετικό δέντρο (Εικόνα 4.2) αλλά και την κατηγοριοποίηση των αποικιών (Εικόνα 4.1), παρατηρείται πως η ομαδοποίηση των αποικιών από αντιπροσωπευτικά στελέχη συνάδει με την ομαδοποίηση των στελεχών με βάση τη 16S rDNA αλληλουχία όσον αφορά το είδος, τη φυλογενετική ομάδα (group) του γένους ή τον κλάδο. Φυσικά, πρέπει να σημειωθεί πως το 16S δεν είναι επαρκής δείκτης για την κατάταξη των βακτηρίων σε επίπεδο είδους, καθώς η διαφοροποίηση μεταξύ πολύ συγγενικών ειδών δεν είναι εφικτή. Ωστόσο, η ταξινόμηση σε συγκεκριμένη ομάδα (group) ενός γένους και τον κλάδο εντός της ομάδας φαίνεται να έχει περισσότερες πιθανότητες να είναι επιτυχημένη, ειδικά όταν γίνεται χρήση της βάσης δεδομένων των πρότυπων στελεχών.

Φαίνεται πως υπάρχουν αρκετά διαφορετικά είδη του γένους *Bacillus* στο ριζικό σύστημα του φυτού *H. hircinum* και στα φύλλα υπάρχει μόνο ένα, ενώ δεν απομονώθηκαν βακτήρια του γένους *Pseudomonas*. Το φυτό *T. polium* έχει πιο πλούσια μικροβιακή κοινότητα στα φύλλα, ενώ και στους δύο ιστούς έχει αρκετούς αντιπροσώπους του γένους *Bacillus*, αλλά και είδη του γένους *Pseudomonas*. Βρίσκονται κοινά είδη μεταξύ των δύο φυτών, αλλά υπάρχουν και είδη που βρέθηκαν μόνο σε ένα από τα δύο φυτά.

Τα στελέχη Tel52, Hir102, Hir105 ομαδοποιούνται και στη μορφολογία αποικίας και στη 16S φυλογενετική ανάλυση και φαίνεται να ανήκουν στον κλάδο *B. amyloliquefaciens*. Άλλη μια ομάδα που πιθανώς ανήκει στον ίδιο κλάδο αλλά είναι διαφορετική από την προηγούμενη είναι τα στελέχη Hir139 και Hir110. Το στέλεχος Ter90 ανήκει στον κλάδο *B. subtilis* και πιθανώς στο είδος *B. subtilis*. Φαίνεται να είναι πολύ κοντά φυλογενετικά με την ομάδα που αποτελείται από τα στελέχη Hir14 και Tel46, τα οποία επίσης ταξινομούνται στον κλάδο *B. subtilis*, αλλά είναι κοντινότερα στην ομάδα του είδους *B. halotolerans* και έχουν διαφορετικές αποικίες. Επόμενη ομάδα είναι τα στελέχη Hir115 και Hir131, των οποίων κοντινότερα είδη φαίνεται να είναι τα *B. haynesii* και *B. licheniformis*. Το στέλεχος Hir138, με πιθανό κοντινό είδος το *B. stratosphericus* είναι κοντά φυλογενετικά με την ομάδα Tel34, Tel54, Ter61 και πιθανώς ανήκουν στον κλάδο *B. pumilus*. Η ομάδα των στελεχών

Tel43, Ter74 πιθανώς ανήκει στο *B. cereus* group με μεγαλύτερη πιθανότητα να ανήκει στο είδος *B. mycooides* λόγω της ιδιαίτερης μορφολογίας της αποικίας. Τα στελέχη Hir119, Hir148, Hir149, Tel40, Tel42, Tel51 ομαδοποιούνται στη μορφολογία της αποικίας τους και πιθανώς ανήκουν στο *B. cereus* group. Στη φυλογενετική ανάλυση εμφανίζουν κάποιες διαφοροποιήσεις, ωστόσο δεν μπορεί να ειπωθεί με ακρίβεια εάν ανήκουν σε διαφορετικά είδη με την ανάλυση μόνο της 16S rDNA αλληλουχίας. Το στέλεχος Hir147 ανήκει στο γένος *Paenibacillus*. Όσον αφορά τα στελέχη που ανήκουν στο γένος *Pseudomonas* ίδια αποικία και ίδια φυλογενετική ταξινόμηση έχουν τα στελέχη Ter70, Ter78, Ter67, Tel36, Ter80 τα οποία ξεχωρίζουν από το στέλεχος Tel31 καθώς και το Ter82.

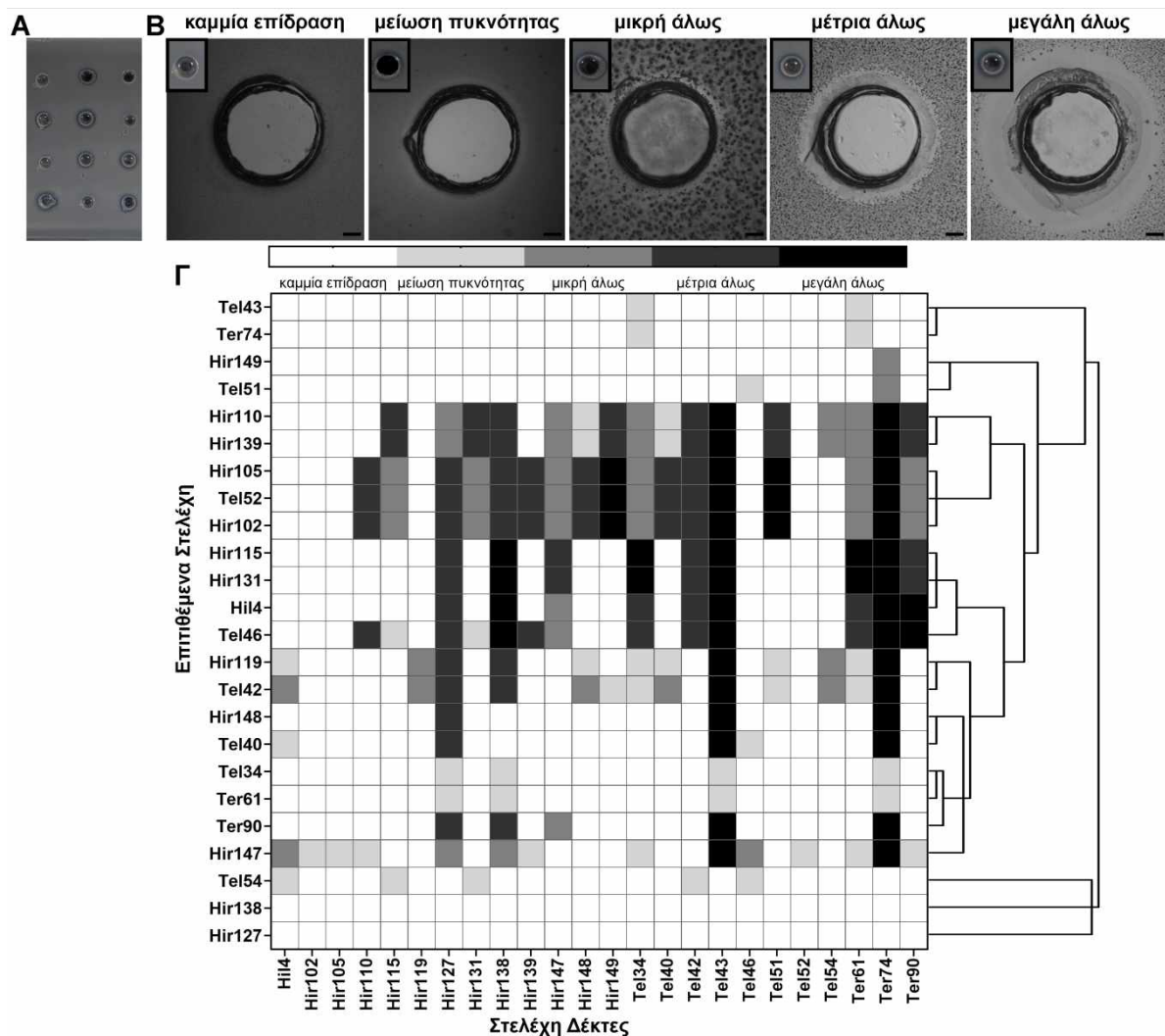
4.1.2 Κατηγοριοποίηση των βακτηρίων με βάση τις αλληλεπιδράσεις τους

Ένας τρόπος να διαφοροποιηθούν τα βακτηριακά στελέχη και να μελετηθούν οι αλληλεπιδράσεις τους είναι οι τεχνικές αλληλεπίδρασης τους *in vitro* σε στερεό θρεπτικό μέσο με τη μέθοδο υπερκείμενης έγχυσης άγαρ (soft agar overlay assay) (Κεφ. 4.1.2.1) ή σε κατάσταση swarming (swarm boundary assay) (Κεφ. 4.1.2.2).

4.1.2.1 Αλληλεπίδραση βακτηρίων με τη μέθοδο υπερκείμενης έγχυσης (soft agar overlay assay)

Η μέθοδος υπερκείμενης έγχυσης άγαρ χρησιμοποιήθηκε για την εξέταση της αλληλεπίδρασης των βακτηριακών στελεχών και συγκεκριμένα για την εξέταση της επίδρασης στη βιωσιμότητα. Εναιώρημα καλλιέργειας από το στέλεχος του οποίου η βιωσιμότητα δοκιμάζεται (στέλεχος-δέκτης) ενσωματώθηκε στην άνω στρώση (top agar) στερεού θρεπτικού υλικού NA. Στο ίδιο θρεπτικό μέσο σχηματίστηκαν πηγαδάκια όπου εμβολιάστηκαν εναιωρήματα καλλιέργειας από τα υπόλοιπα στελέχη (επιτιθέμενα στελέχη) με σκοπό να εξεταστεί η ικανότητά τους να παρεμποδίζουν την ανάπτυξη του ενσωματωμένου στο θρεπτικό μέσο στελέχους (στέλεχος-δέκτης) μετά από επώαση (Εικόνα 4.3A).

Τα αποτελέσματα της δοκιμής αυτής συνοψίζονται στην Εικόνα 4.3 και τον Πίνακα 4.3 για τις βακτηριακές απομονώσεις των γενών *Bacillus* και *Paenibacillus* και στον Πίνακα 4.5 για τις βακτηριακές απομονώσεις του γένους *Pseudomonas*.



Εικόνα 4.3 Αποτελέσματα των βακτηριακών αλληλεπιδράσεων των στελεχών των γενών *Bacillus* και *Paenibacillus* με τη μέθοδο υπερκείμενης έγχυσης άγαρ (soft agar overlay method). Ποσότητα 50 μl εναιωρήματος κυττάρων του κάθε στελέχους εμβολιάστηκε σε πηγαδάκια που σχηματίστηκαν σε στερεό θρεπτικό μέσο ΝΑ δύο στρώσεων, όπου η πάνω στρώση (top agar) περιείχε ομοιόμορφο εμβόλιο του υπό εξέταση στελέχους. Το τρυβλίο επώασθη στους 30 °C για 20 ώρες και στη συνέχεια παρατηρήθηκε η ύπαρξη διαφανούς ζώνης παρεμπόδισης γύρω από το πηγαδάκι μακροσκοπικά και στερεοσκοπικά. (Α) Ενδεικτική φωτογραφία τρυβλίου της μεθόδου μετά την επώαση. (Β) Αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες στερεοσκοπίου και οι αντιστοιχες μακροσκοπικές φωτογραφίες (σε μαύρο πλαίσιο) για κάθε κατηγορία βακτηριακών αλληλεπιδράσεων που παρατηρήθηκε (κλίμακα 500 nm). (Γ) Διάγραμμα heatmap με δένδρογραμμα μετά από ιεραρχική ομαδοποίηση (hierarchical clustering) από τα αποτελέσματα της δοκιμής, όπου ο σχηματισμός μεγάλης ζώνης συμβολίζεται με μαύρο χρώμα, ο σχηματισμός μέτριας ζώνης συμβολίζεται με σκούρο γκρι χρώμα, ο σχηματισμός μικρής ζώνης συμβολίζεται με γκρι χρώμα, η μείωση πυκνότητας συμβολίζεται με ανοιχτό γκρι χρώμα και η έλλειψη επίδρασης συμβολίζεται με λευκό χρώμα. Πραγματοποιήθηκαν 3 τεχνικές επαναλήψεις για κάθε στέλεχος, ενώ το πείραμα πραγματοποιήθηκε ανεξάρτητα 3 φορές συνολικά.

Οι φαινότυποι των αλληλεπιδράσεων που καταγράφηκαν κατηγοριοποιήθηκαν σε πέντε ομάδες (Εικόνα 4.3B). Συγκεκριμένα, καταγράφηκαν οι ομάδες «καμμία επίδραση», όπου δεν παρατηρήθηκε σχηματισμός διαφανούς άλω γύρω από το πηγαδάκι, «μείωση κυτταρικής πυκνότητας» όπου δεν παρατηρήθηκε σχηματισμός ξεκάθαρης διαφανούς άλω αλλά διαφάνηκε η μειωμένη ανάπτυξη του βακτηρίου, καθώς και οι ομάδες «μικρή άλως», «μέτρια άλως» και «μεγάλη άλως», οι οποίες αναφέρονται στο μέγεθος της διαφανούς άλω που σχηματίστηκε.

Το διάγραμμα heatmap (Εικόνα 4.3Γ) αναφέρεται σχηματικά στα αποτελέσματα της κάθε αλληλεπίδρασης (Πίνακας 4.3) και το δένδρογραμμα αφορά την ομαδοποίηση των στελεχών ανάλογα

με τη συμπεριφορά τους. Έτσι δύναται να μελετηθούν οι αλληλεπιδράσεις των στελεχών και να φανεί ποιο στέλεχος είναι ανταγωνιστικό προς κάποιο άλλο ή ποια στελέχη είναι αμοιβαίως αποκλειόμενα, όπως και να ομαδοποιηθούν τα στελέχη που είναι κοντινά λειτουργικά. Τα εξεταζόμενα στελέχη ομαδοποιήθηκαν με βάση το φαινότυπο που επέδειξαν ως επιτιθέμενα στελέχη. Γενικά, παρατηρήθηκε πως τα στελέχη που είχαν ομαδοποιηθεί με βάση τη μορφολογία των αποικιών και στη φυλογενετική ανάλυση του 16S rRNA γονιδίου εμφάνισαν ίδιες ή σχεδόν ίδιες συμπεριφορές, ενώ στελέχη που θεωρούνταν διαφορετικά αλλά είναι πολύ κοντά φυλογενετικά κατά κύριο λόγο τοποθετήθηκαν σε κοντινές περιοχές. Εξαιρέση αποτέλεσαν τα στελέχη του *B. cereus* group με την ίδια αποικία τα οποία χωρίζονται σε υποομάδες σύμφωνα με τη συμπεριφορά των στελεχών, και συγκεκριμένα στις ομάδες Hir149-Tel51, Hir119-Tel42 και Hir148-Tel40, ενώ αυτές είναι διάσπαρτες στο δενδρόγραμμα. Ακόμη μία εξαιρέση είναι το στέλεχος Tel54 σε σχέση με τα Tel34 και Ter61, αλλά και το Ter90 που ομαδοποιήθηκε κοντά στα Tel34, Ter61.

Τα πιο επιθετικά στελέχη, όσον αφορά τον αριθμό των στελεχών που ανταγωνίζονται αλλά και το μέγεθος της ζώνης που προκαλούν, ήταν τα Hir102, Hir110, Hir139, Hir105 και Tel52 που πιθανώς ανήκουν στον κλάδο *B. amyloliquefaciens*. Επιθετικά στελέχη ήταν επίσης και τα Hir115, Hir131, Hil4, Tel46. Τα λιγότερο ή καθόλου επιθετικά στελέχη ήταν τα Tel54, Hir138, Hir127, Tel43, Ter74, Hir149, Tel51. Άλλη μια παρατήρηση είναι πως οι 2 ομάδες στελεχών που πιθανώς ανήκουν στο *B. amyloliquefaciens* group ήταν ανταγωνιστικές μεταξύ τους και συγκεκριμένα η ομάδα Hir102-Hir105-Tel52 προς την Hir110-Hir139. Τα στελέχη Hil4 και Tel46 κατηγοριοποιήθηκαν στην ίδια ομάδα, ωστόσο έχουν κάποιες διαφοροποιήσεις στη συμπεριφορά. Για παράδειγμα, το Tel46 φαίνεται να παρεμπόδιζε τα στελέχη Hir110 και Hir139 ενώ το Hil4 όχι.





Κάποιες αλληλεπιδράσεις δεν έδειξαν τον ίδιο φαινότυπο και στις 3 ανεξάρτητες επαναλήψεις του πειράματος (σημειωμένες με αστερίσκο), ενώ έδειξαν την ίδια συμπεριφορά στις τεχνικές επαναλήψεις της κάθε ανεξάρτητης επανάληψης (**Πίνακας 4.3**). Ωστόσο, αξίζει να τονιστεί το γεγονός ότι σε κάθε ανεξάρτητη επανάληψη τα βακτήρια που ομαδοποιούνται είχαν την ίδια συμπεριφορά απέναντι στο ίδιο στέλεχος-δέκτη, ακόμα και αν αυτή αλλάζει από τη μία ανεξάρτητη επανάληψη στην άλλη. Δηλαδή, μια ομάδα στελεχών μπορεί στη μία ανεξάρτητη επανάληψη να παρεμπόδιζε το στέλεχος-δέκτη και στην άλλη όχι, με τις τεχνικές επαναλήψεις να είναι όμοιες. Έτσι, αυτό το φαινόμενο φαίνεται να οφείλεται σε διαφορές συγκέντρωσης του στελεχούς-δέκτη και η ομαδοποίηση των στελεχών δε μεταβάλλεται.

Ακόμη, αξίζει να αναφερθεί πως σε κάποιες περιπτώσεις αλληλεπιδράσεων παρατηρήθηκε πως ο φαινότυπος μεταβλήθηκε με το πέρασμα των ημερών επώασης (**Πίνακας 4.4**), αλλά όχι τόσο ώστε να επηρεάζει σημαντικά τα αποτελέσματα καθώς μεταβάλλεται μόνο κατά μία κατηγορία. Συγκεκριμένα, η ζώνη μειώνεται σε μέγεθος, καθώς φαίνεται πως το βακτήριο δέκτης αρχίζει να αναπτύσσεται και να καλύπτει τη διαφανή περιοχή, όπου είχε παρεμποδιστεί η ανάπτυξη του προηγούμενου.

Πίνακας 4.3 Αποτελέσματα της αλληλεπίδρασης βακτηριακών στελεχών των γενών *Bacillus* και *Paenibacillus* με τη μέθοδο υπερκείμενης έγχυσης άγαρ (soft agar overlay method) μετά από κατηγοριοποίηση των φαινοτύπων που παρατηρήθηκαν στο στερεοσκόπιο. Η κατηγοριοποίηση πραγματοποιήθηκε με βάση την ύπαρξη ζώνης παρεμπόδισης γύρω από το πηγαδάκι ως καμία επίδραση (-), μείωση κυτταρικής πυκνότητας (+), εμφάνιση μικρής ζώνης (++), εμφάνιση μέτριας ζώνης (+++), Εμφάνιση μεγάλης ζώνης (+++). Ως Επιτιθέμενα Στελέχη ορίζονται τα στελέχη που εμβολιάστηκαν στα πηγαδάκια (wells), ενώ ως Στελέχη-Δέκτες ορίζονται τα στελέχη που περιείχονταν ομοιόμορφα στην πάνω στρώση του στερεού θρεπτικού μέσου (top agar). Με αστερίσκο (*) συμβολίζεται ο φαινότυπος που παρατηρήθηκε στις 2 από τις 3 ανεξάρτητες επαναλήψεις του πειράματος.

		Στελέχη-Δέκτες (top agar)																							
		Hil4	Hir102	Hir105	Hir110	Hir115	Hir119	Hir127	Hir131	Hir138	Hir139	Hir147	Hir148	Hir149	Tel34	Tel40	Tel42	Tel43	Tel46	Tel51	Tel52	Tel54	Ter61	Ter74	Ter90
Επιτιθέμενα Στελέχη (wells)	Hil4	-	-	-	.*	-	-	+++	-	++++	.*	++	-	-	+++	-	+++	++++	.*	-	-	-	+++	++++	++++
	Hir102	.*	-	-	+++	++	-	+++	++	+++	+++	++	+++	++++	++*	+++	+++	++++	.*	++++	-	-	++*	++++	++*
	Hir105	.*	-	-	+++	++	-	+++	++	+++	+++	++	+++	++++	++*	+++	+++	++++	.*	++++	-	-	++*	++++	++*
	Hir110	.*	.*	.*	-	+++	-	++	+++	+++	-	++	+	+++	++*	+	+++	++++	.*	+++	.*	++	++*	++++	+++
	Hir115	-	-	-	-	-	-	+++	-	++++	-	+++	-	-	++++	-	+++	++++	-	-	-	-	++++	++++	+++
	Hir119	+	-	-	-	-	++	+++	-	+++	-	-	+	-	+	+	-	++++	-	+	-	++	+	++++	-
	Hir127	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Hir131	-	-	-	-	-	-	+++	-	++++	-	+++	-	-	++++	-	+++	++++	-	-	-	-	++++	++++	+++
	Hir138	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Hir139	.*	.*	.*	-	+++	-	++	+++	+++	-	++	+	+++	++*	+	+++	++++	.*	+++	.*	++	++*	++++	+++
	Hir147	++	+	+	+	-	-	++	-	++	+	-	-	-	+	-	-	++++	++	-	+	-	+	++++	+
	Hir148	-	-	-	-	-	-	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++++	-	-	-	-	-	++++	-
	Hir149	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-
	Tel34	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-
	Tel40	+	-	-	-	-	-	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++++	+	-	-	-	-	++++	-
	Tel42	++	-	-	-	-	++	+++	-	+++	-	-	++	+	+	++	-	++++	-	+	-	++	+	++++	-
	Tel43	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
	Tel46	.*	.*	.*	+++	+	-	+++	+	++++	+++	++	-	-	+++	-	+++	++++	-	-	.*	.*	+++	++++	++++
	Tel51	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	++	-
	Tel52	.*	-	-	+++	++	-	+++	++	+++	+++	++	+++	++++	++*	+++	+++	++++	.*	++++	-	-	++*	++++	++*
Tel54	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	
Ter61	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	
Ter74	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	
Ter90	-	-	-	-	-	-	+++	-	+++	-	++	-	-	-	-	-	++++	-	-	-	-	-	++++	-	

Πίνακας 4.4 Παραδείγματα βακτηριακών αλληλεπιδράσεων όπου ο φαινότυπος μεταβάλλεται στη διάρκεια 7 ημερών με τη μέθοδο soft agar overlay assay. Το «↓» υποδεικνύει μείωση του μεγέθους της άλω και το «-» υποδεικνύει απουσία μεταβολής.

	1η ημέρα	2η ημέρα	7η ημέρα			
						
Επιτιθέμενα στελέχη	Στελέχη-Δέκτες (top agar)					
(wells)	Hir139	Tel34	Tel40	Tel54	Ter61	Ter90
Hil4	-	↓	-	-	↓	↓
Hir102	-	-	↓	-	-	-
Hir105	-	-	↓	-	-	-
Hir110	-	-	-	↓	-	↓
Hir139	-	-	-	↓	-	↓
Tel46	↓	↓	-	-	↓	↓
Tel52	-	-	↓	-	-	-

Κατά την αλληλεπίδραση μεταξύ των στελεχών του γένους *Pseudomonas* (Πίνακας 4.5) με τη μέθοδο υπερκείμενης έγχυσης άγαρ κανένα στέλεχος δεν έδειξε ανταγωνιστικότητα ως προς κάποιο άλλο.

Πίνακας 4.5 Αποτελέσματα της αλληλεπίδρασης βακτηριακών στελεχών του γένους *Pseudomonas* με τη μέθοδο υπερκείμενης έγχυσης άγαρ (soft agar overlay method). Η κατηγοριοποίηση πραγματοποιήθηκε με βάση την ύπαρξη ζώνης παρεμπόδισης γύρω από το πηγαδάκι ως καμμία επίδραση (-), μείωση κυτταρικής πυκνότητας (+), εμφάνιση μικρής ζώνης (++) , εμφάνιση μέτριας ζώνης (+++), Εμφάνιση μεγάλης ζώνης (++++). Ως Επιτιθέμενα Στελέχη ορίζονται τα στελέχη που εμβολιάστηκαν στα πηγαδάκια (wells), ενώ ως Στελέχη-Δέκτες ορίζονται τα στελέχη που περιέχονταν ομοίμορφα στην πάνω στρώση του στερεού θρεπτικού μέσου (top agar). Με αστερίσκο (*) συμβολίζεται ο φαινότυπος που παρατηρήθηκε στις 2 από τις 3 ανεξάρτητες επαναλήψεις του πειράματος.

		Στελέχη-Δέκτες (top agar)						
		Tel31	Tel36	Ter67	Ter70	Ter78	Ter80	Ter82
Επιτιθέμενα Στελέχη (wells)	Tel31	-	-	-	-	-	-	-
	Tel36	-	-	-	-	-	-	-
	Ter67	-	-	-	-	-	-	-
	Ter70	-	-	-	-	-	-	-
	Ter78	-	-	-	-	-	-	-
	Ter80	-	-	-	-	-	-	-
	Ter82	-	-	-	-	-	-	-

4.1.2.2 Αλληλεπίδραση βακτηρίων με τη δοκιμή σχηματισμού γραμμής οριοθέτησης κατά την ομαδική κίνηση σε επιφάνειες (swarm boundary assay)

Άλλη μία μέθοδος για τη μελέτη των αλληλεπιδράσεων των βακτηρίων, που σε αυτή τη μελέτη χρησιμοποιήθηκε και για τη διαφοροποίησή τους, είναι η αλληλεπίδρασή τους όταν κινούνται ομαδικά σε επιφάνειες. Σε *in vitro* δοκιμή φάνηκε πως τα μισά στελέχη του γένους *Bacillus* είχαν την

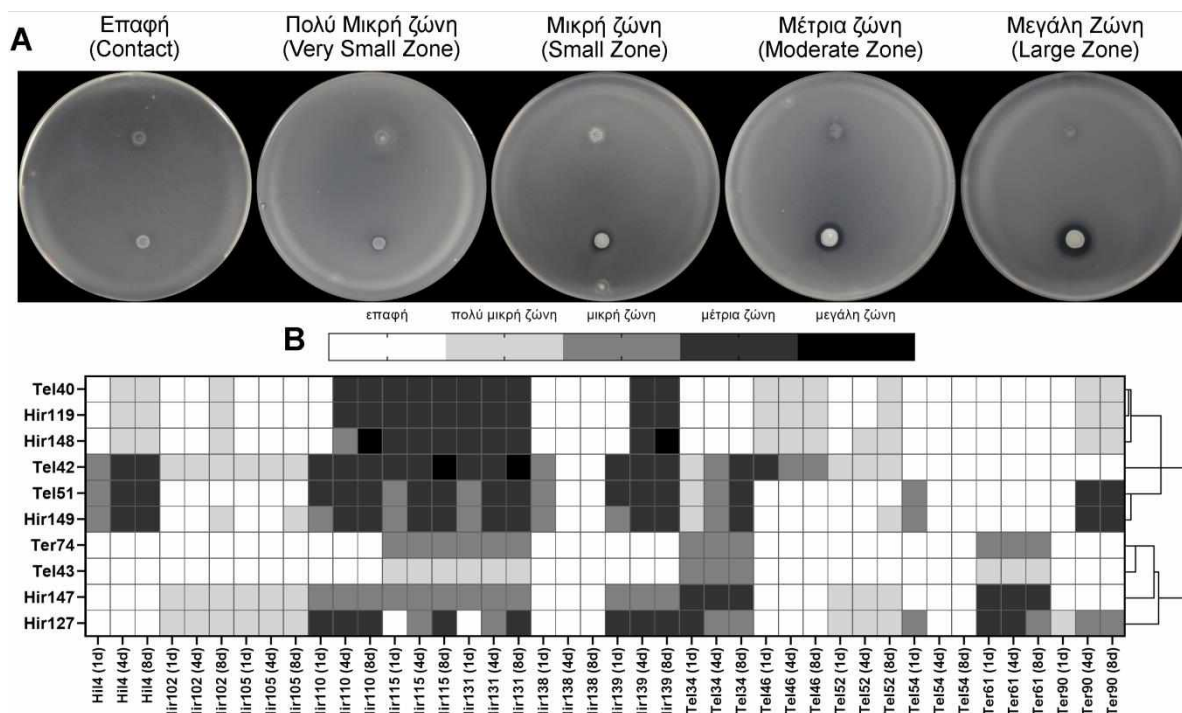
ικανότητα ομαδικής κίνησης σε επιφάνειες, ενώ κανένα στέλεχος του γένους *Pseudomonas* δεν είχε αυτήν την ικανότητα (Πίνακας 4.6). Ειδικότερα, φαίνεται πως τα στελέχη που μπορούν να κινηθούν ομαδικά ανήκουν στους κλάδους της ομάδας *B. subtilis*, ενώ στελέχη που πιθανότατα ανήκουν στο *B. cereus* group, το στέλεχος Hir127 και το στέλεχος 147 (*Paenibacillus* sp.) δεν μπορούν να κινηθούν ομαδικά σε επιφάνειες, τουλάχιστον με γρήγορο ρυθμό.

Πίνακας 4.6 Αποτελέσματα δοκιμής γρήγορης ομαδικής κίνησης σε επιφάνειες (swarming motility). Ποσότητα 5 μl από καλλιέργειες 18-20 ωρών των βακτηριακών στελεχών τοποθετήθηκε σε ημιστερεό θρεπτικό μέσο NA και ακολούθησε επώαση για 24 ώρες στους 30 °C. Ως γρήγορη ομαδική κίνηση ορίστηκε η πλήρης κάλυψη του τρυβλίου στις 24 ώρες.

Στέλεχη	Φυλογένεια (Γένος)	Ικανότητα γρήγορης ομαδικής κίνησης σε επιφάνειες
Hil4	<i>Bacillus</i>	ναι
Hir102	<i>Bacillus</i>	ναι
Hir105	<i>Bacillus</i>	ναι
Hir110	<i>Bacillus</i>	ναι
Hir115	<i>Bacillus</i>	ναι
Hir119	<i>Bacillus</i>	όχι
Hir127	<i>Bacillus</i>	όχι
Hir131	<i>Bacillus</i>	ναι
Hir138	<i>Bacillus</i>	ναι
Hir139	<i>Bacillus</i>	ναι
Hir147	<i>Bacillus</i>	όχι
Hir148	<i>Bacillus</i>	όχι
Hir149	<i>Bacillus</i>	όχι
Tel31	<i>Pseudomonas</i>	όχι
Tel34	<i>Bacillus</i>	ναι
Tel36	<i>Bacillus</i>	όχι
Tel40	<i>Bacillus</i>	όχι
Tel42	<i>Bacillus</i>	όχι
Tel43	<i>Bacillus</i>	όχι
Tel46	<i>Bacillus</i>	ναι
Tel51	<i>Bacillus</i>	όχι
Tel52	<i>Bacillus</i>	ναι
Tel54	<i>Bacillus</i>	ναι
Ter61	<i>Bacillus</i>	ναι
Ter67	<i>Pseudomonas</i>	όχι
Ter70	<i>Pseudomonas</i>	όχι
Ter74	<i>Bacillus</i>	όχι
Ter78	<i>Pseudomonas</i>	όχι
Ter80	<i>Pseudomonas</i>	όχι
Ter82	<i>Pseudomonas</i>	όχι
Ter90	<i>Bacillus</i>	ναι

Η συγκεκριμένη δοκιμή δεν πραγματοποιήθηκε για τα στελέχη του γένους *Pseudomonas*, λόγω της έλλειψης ικανότητας ομαδικής κίνησης σε επιφάνειες. Όσον αφορά τα στελέχη του γένους *Bacillus* και *Paenibacillus*, οι αλληλεπιδράσεις πραγματοποιήθηκαν χωρίζοντας τα σε δύο κατηγορίες, τα στελέχη με ικανότητα ομαδικής κίνησης σε επιφάνειες (swarmers) και τα στελέχη που δεν είχαν αυτήν την ικανότητα (non swarmers). Αρχικά, δοκιμάστηκαν τα στελέχη non swarmers έναντι των στελεχών swarmers και μετά από 1, 4 και 8 ημέρες ημέρες ταυτόχρονης επώασης οι φαινότυποι που παρατηρήθηκαν καταγράφηκαν και ομαδοποιήθηκαν σε κατηγορίες (Εικόνα 4.4Α). Οι φαινότυποι που παρατηρήθηκαν στο σημείο προσέγγισης των στελεχών ήταν η επαφή, η πολύ μικρή διαφανής

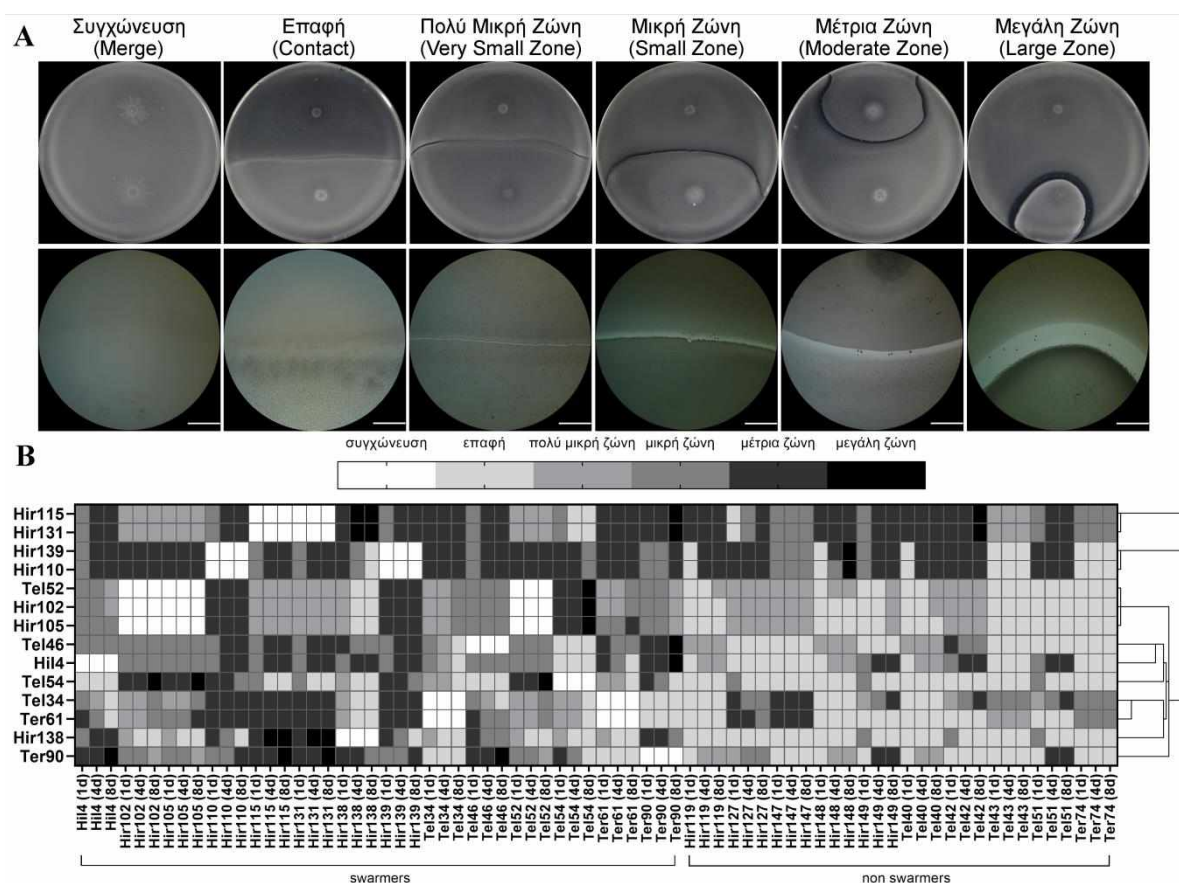
ζώνη, η μικρή διαφανής ζώνη, η μέτρια διαφανής ζώνη και η μεγάλη διαφανής ζώνη, οι οποίοι αποτυπώθηκαν σε διάγραμμα heatmap, ενώ τα στελέχη ομαδοποιήθηκαν σε δένδρογραμμα σύμφωνα με τη συμπεριφορά τους ως προς τα υπόλοιπα στελέχη σε όλα τα χρονικά σημεία (Εικόνα 4.4B).



Εικόνα 4.4 Αποτελέσματα από την αλληλεπίδραση των βακτηριακών στελεχών που διαθέτουν ικανότητα γρήγορης ομαδικής κίνησης σε επιφάνειες (swarmers) με βακτήρια που δε διαθέτουν ικανότητα γρήγορης ομαδικής κίνησης σε επιφάνειες (non swarmers). Η μέθοδος για την εξέταση της αλληλεπίδρασης που χρησιμοποιήθηκε ήταν η δοκιμή σχηματισμού γραμμής οριοθέτησης κατά την ομαδική κίνηση σε επιφάνειες (swarm boundary assay), όπου κηλίδες (spots) ποσότητας 4 μl από εναιώρημα κυττάρων δύο στελεχών τοποθετήθηκαν αντιδιαμετρικά σε απόσταση 2 cm σε ημιστερεό θρεπτικό μέσο NA και πραγματοποιήθηκε επώαση στους 30°C για 8 ημέρες. Τα αποτελέσματα καταγράφηκαν την 1^η, 4^η και 8^η ημέρα. (A) Αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες των φαινοτύπων που παρατηρήθηκαν. (B) Διάγραμμα heatmap με δένδρογραμμα μετά από ιεραρχική ομαδοποίηση (hierarchical clustering) από τα αποτελέσματα της δοκιμής, όπου η επαφή των δύο στελεχών συμβολίζεται με λευκό χρώμα, ο σχηματισμός πολύ μικρής ζώνης συμβολίζεται με ανοιχτό γκρι χρώμα, ο σχηματισμός μικρής ζώνης συμβολίζεται με γκρι χρώμα, ο σχηματισμός μέτριας ζώνης συμβολίζεται με σκούρο γκρι χρώμα και ο σχηματισμός μεγάλης ζώνης συμβολίζεται με μαύρο χρώμα. Πραγματοποιήθηκαν 3 τεχνικές επαναλήψεις για κάθε στέλεχος, ενώ το πείραμα πραγματοποιήθηκε ανεξάρτητα 3 φορές συνολικά.

Τα στελέχη non swarmers που διαμόρφωσαν ομάδες λόγω ίδιας ή σχεδόν ίδιας συμπεριφοράς ως προς τα στελέχη swarmers ήταν α) τα Tel40, Hir119, Hir148, β) τα Tel51, Hir149 και γ) τα Tel43, Ter74. Τα στελέχη Tel40, Hir119, Hir148, Tel51, Hir149 και Tel42 φαίνεται να είναι αρκετά κοντινά, γεγονός που συμφωνεί με την κατάταξή τους στο ίδιο φυλογενετικό group, ενώ οι υποομάδες ίσως φανερώνουν λειτουργικά διαφορετικά στελέχη. Η αλληλεπίδραση σχεδόν όλων των στελεχών non swarmers με τα στελέχη swarmers που πιθανώς ανήκουν στον κλάδο *B. amyloliquefaciens*, τα στελέχη Hir115-Hir131, καθώς και τα στελέχη Tel34-Ter61 οδήγησε στο σχηματισμό διαφανούς ζώνης, υποδεικνύοντας τον ανταγωνισμό των non swarmers προς τους swarmers. Σε αυτήν την τεχνική δεν παρατηρήθηκαν αποκλίσεις του φαινότυπου στις ανεξάρτητες επαναλήψεις του πειράματος, σε αντίθεση με την τεχνική της υπερκείμενης έγχυσης άγαρ (Κεφ. 4.1.2.1).

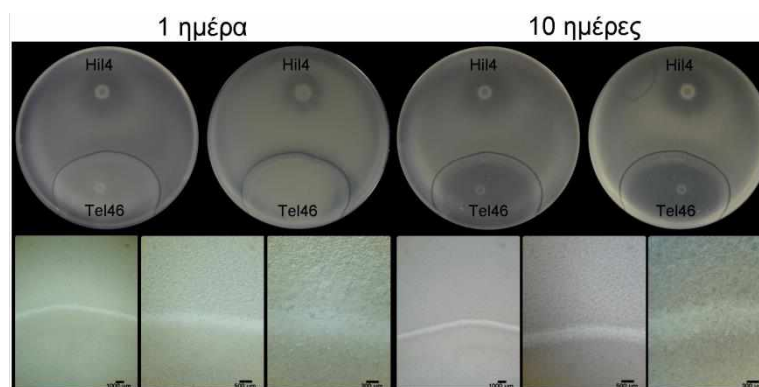
Στη συνέχεια, δοκιμάστηκαν τα στελέχη swarmers ανά ζεύγη και παρατηρήθηκαν οι εξής φαινότυποι στο μέτωπο αλληλεπίδρασης των δύο ομαδικά κινούμενων στελεχών: (α) συγχώνευση, όπου οι δύο αποικίες αναμιγνύονται πλήρως και δεν ξεχωρίζει το σημείο συνάντησής τους, (β) επαφή, όπου οι δύο αποικίες είναι σε επαφή αλλά είναι ξεκάθαρος ο διαχωρισμός τους, (γ) σχηματισμός πολύ μικρής ζώνης, (δ) σχηματισμός μικρής ζώνης, (ε) σχηματισμός μέτριας ζώνης, (στ) σχηματισμός μεγάλης ζώνης (Εικόνα 4.5Α). Τα αποτελέσματα αποτυπώθηκαν σε διάγραμμα heatmap, ενώ το δένδρογραμμα ομαδοποιεί τα στελέχη swarmers σύμφωνα με τη συμπεριφορά τους (Εικόνα 4.5Β).



Εικόνα 4.5 Αποτελέσματα από την αλληλεπίδραση των βακτηριακών στελεχών που διαθέτουν ικανότητα γρήγορης ομαδικής κίνησης σε επιφάνειες (swarmers) με βακτήρια που δε διαθέτουν ικανότητα γρήγορης ομαδικής κίνησης σε επιφάνειες (non swarmers) με τη δοκιμή σχηματισμού γραμμής οριοθέτησης κατά την ομαδική κίνηση σε επιφάνειες (swarm boundary assay). Κηλίδες (spots) ποσότητας 4 μ l από εναιώρημα κυττάρων δύο στελεχών τοποθετήθηκαν αντιδιαμετρικά σε απόσταση 2 cm σε ημιστερεό θρεπτικό μέσο NA και πραγματοποιήθηκε επώαση στους 30°C για 8 ημέρες. Τα αποτελέσματα καταγράφηκαν την 1^η, 4^η και 8^η ημέρα. (A) Κατηγορίες των φαινοτύπων που παρατηρήθηκαν με μία μακροσκοπική (πάνω) και μία στερεοσκοπική (κάτω) φωτογραφία (κλίμακα= 5mm). (B) Διάγραμμα heatmap με δένδρογραμμα μετά από ιεραρχική ομαδοποίηση (hierarchical clustering) από τα αποτελέσματα της δοκιμής, όπου η επαφή των δύο στελεχών συμβολίζεται με λευκό χρώμα, ο σχηματισμός πολύ μικρής ζώνης συμβολίζεται με ανοιχτό γκρι χρώμα, ο σχηματισμός μικρής ζώνης συμβολίζεται με γκρι χρώμα, ο σχηματισμός μέτριας ζώνης συμβολίζεται με σκούρο γκρι χρώμα και ο σχηματισμός μεγάλης ζώνης συμβολίζεται με μαύρο χρώμα. Πραγματοποιήθηκαν 3 τεχνικές επαναλήψεις για κάθε στέλεχος, ενώ το πείραμα πραγματοποιήθηκε ανεξάρτητα 3 φορές συνολικά.

Κάποια στελέχη ήταν σχεδόν ή ακριβώς ίδια σε συμπεριφορά προς τα υπόλοιπα στελέχη και ομαδοποιήθηκαν στο δένδρογραμμα, όπως τα Hir115-Hir131, Hir102-Hir105-Tel52, Hir110-Hir139 και Tel34-Ter61. Ακόμη, όταν τα στελέχη μίας ομάδας δοκιμάστηκαν μεταξύ τους, εμφάνισαν το φαινότυπο «συγχώνευση». Αυτές οι ομάδες είχαν επίσης αναδειχθεί κατά την κατηγοριοποίηση ως προς τη μορφολογία της αποικίας, τη φυλογενετική ανάλυση του 16S rRNA γονιδίου αλλά και στην

αλληλεπίδραση με τη μέθοδο υπερκείμενη έγχυση αγαρ. Παρατηρήθηκε ακόμη πως οι διαφορετικές ομάδες που πιθανώς ανήκουν στον κλάδο *B. amyloliquefaciens* (Hir102-Hir105- Tel52 και Hir110-Hir139) κατά την αλληλεπίδραση τους εμφανίζουν το φαινότυπο «μέτρια ζώνη», ενώ και στην προηγούμενη δοκιμή αναδείχθηκαν ανταγωνιστικές, γεγονός που υποδεικνύει πως οι δύο ομάδες περιέχουν διαφορετικά στελέχη. Λίγες περισσότερες διαφοροποιήσεις παρουσιάζει το ζεύγος Hil4-Tel46 στη συμπεριφορά ως προς τα υπόλοιπα στελέχη, ενώ η μεταξύ τους αλληλεπίδραση κατέληξε σε δημιουργία μικρής ζώνης (**Εικόνα 4.6**). Ωστόσο, τα δύο στελέχη είχαν ίδια μορφολογία αποικίας και είχαν ταξινομηθεί στο ίδιο είδος. Το ίδιο γεγονός συνέβη και με τα στελέχη Tel34-Ter61 σε σχέση με το στέλεχος Tel54. Τα τρία αυτά στελέχη ανήκουν στην ίδια ομάδα μορφολογίας αποικίας και είναι κοντά φυλογενετικά, ωστόσο, τα στελέχη Tel34 και Ter61 εμφανίζουν το φαινότυπο «συγχώνευση» κατά την αλληλεπίδραση, ενώ τα στελέχη Tel34 και Ter61 εμφανίζουν τον τύπο «πολύ μικρή ζώνη» κατά την αλληλεπίδραση με το στέλεχος Tel54.



Εικόνα 4.6 Αλληλεπίδραση των στελεχών Hil4 και Tel46 που πιθανώς ανήκουν στο είδος *Bacillus halotolerans* με βάση το γονίδιο-δείκτη 16S μετά από επώαση 1 και 10 ημερών. Η μέθοδος για την εξέταση της αλληλεπίδρασης που χρησιμοποιήθηκε ήταν η δοκιμή σχηματισμού γραμμής οριοθέτησης κατά την ομαδική κίνηση σε επιφάνειες (swarm boundary assay), όπου κηλίδες (spots) ποσότητας 4 μl από ελαιώρημα κυττάρων των δύο στελεχών τοποθετήθηκαν αντιδιαμετρικά σε απόσταση 2 cm σε ημιστερεό θρεπτικό μέσο NA και πραγματοποιήθηκε επώαση στους 30°C για 10 ημέρες.

4.1.3 Διερεύνηση επιθυμητών βακτηριακών χαρακτηριστικών *in vitro*

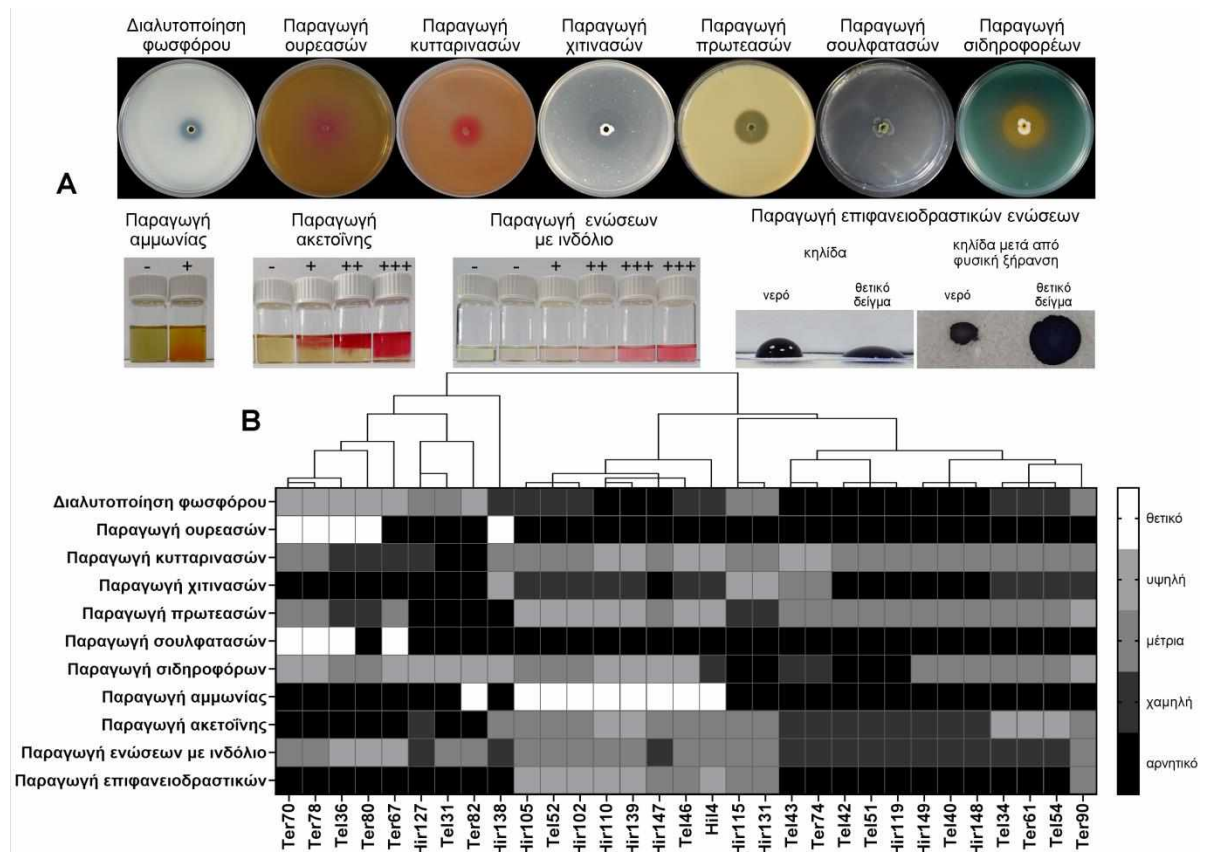
Στη συνέχεια τα βακτήρια εξετάστηκαν με *in vitro* τεχνικές για πληθώρα επιθυμητών χαρακτηριστικών ενός βακτηριακού εμβολίου που αφορούν την προώθηση της ανάπτυξης των φυτών (**Κεφ. 4.1.3.1**), χαρακτηριστικά περιβαλλοντικής προσαρμογής σε εύρος συνθηκών (**Κεφ. 4.1.3.2**) και φυσική ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά (**Κεφ. 4.1.3.3**) με σκοπό την λειτουργική διαφοροποίηση των απομονώσεων και την εύρεση των πιο αποτελεσματικών στελεχών.

4.1.3.1 Χαρακτηριστικά που προωθούν την ανάπτυξη των φυτών (PGP Traits)

Ως χαρακτηριστικά που προάγουν την ανάπτυξη των φυτών αναφέρονται εκείνα τα βακτηριακά χαρακτηριστικά που βοηθούν άμεσα ή έμμεσα την προώθηση της ανάπτυξης των φυτών. Στην άμεση προώθηση περιλαμβάνονται η αύξηση βιοδιαθεσιμότητας θρεπτικών στοιχείων και η παραγωγή ρυθμιστών της ανάπτυξης των φυτών. Στη συγκεκριμένη μελέτη, ελέγχθηκε η ικανότητα αύξησης της

βιοδιαθεσιμότητας των θρεπτικών στοιχείων μέσω της δοκιμής διαλυτοποίησης ιζηματοποιημένου φωσφόρου, της παραγωγής σιδηροφόρων μορίων που αποσυμπλοκοποιούν το χηλικό σίδηρο και της παραγωγής σουλφατασών που καταλύουν την ανοργανοποίηση του εδαφικού θείου. Ακόμη, ελέγχθηκε η παραγωγή ενζύμων που διασπούν την ουρία, αλλά και η παραγωγή αμμωνίας· χαρακτηριστικά τα οποία μπορούν να επηρεάσουν την θρέψη του φυτού αναφορικά με το άζωτο. Η ικανότητα παραγωγής ρυθμιστών της ανάπτυξης των φυτών εξετάστηκε με τη δοκιμή παραγωγής της πτητικής ένωσης ακετοΐνη, αλλά και παραγωγής ενώσεων που περιέχουν ινδόλιο (indole-related compounds) και υποδεικνύουν την παραγωγή ινδολοξεικού οξέος.

Η έμμεση προώθηση της ανάπτυξης των φυτών αναφέρεται στην αντιμετώπιση των φυτοπαθολογικών μικροοργανισμών, οι οποίοι απειλούν την υγεία, ευρωστία και βιωσιμότητα των φυτών. Έτσι, εξετάστηκε η παραγωγή λυτικών ενζύμων που βοηθούν στην αντιμετώπιση των παθογόνων μυκήτων, όπως είναι η χιτινάση και η πρωτεάση, ενώ εξετάστηκε και η παραγωγή της κυτταρινάσης, ένζυμο που διευκολύνει την είσοδο των ενδόφυτων στους φυτικούς ιστούς. Ακόμη, η μέθοδος αντίχενωσης κατάρρευσης της σταγόνας (drop collapse) βοηθά στον άμεσο ποιοτικό χαρακτηρισμό παραγωγής επιφανειοδραστικών ενώσεων, πολλές από τις οποίες είναι ισχυρές αντιμικροβιακές ενώσεις. Η αμμωνία συγκαταλέγεται και στην έμμεση προώθηση της ανάπτυξης, καθώς αποτελεί πτητικό παράγοντα αντιμετώπισης φυτοπαθολογικών. Ακόμη, όλες οι παραγόμενες ενώσεις και ένζυμα που εξετάστηκαν αποτελούν διεγέρτες της άμυνας των φυτών, καθιστώντας τες έτσι και παράγοντες έμμεσης προώθησης της φυτικής ανάπτυξης. Τα αποτελέσματα των δοκιμών για αυτά τα χαρακτηριστικά (**Εικόνα 4.7A**) στα ενδοφυτικά βακτήρια παρουσιάζονται στον **Πίνακα 4.7** και με τη μορφή heatmap ακολουθούμενο από ιεραρχική ομαδοποίηση στην **Εικόνα 4.7B**.



Εικόνα 4.7 Σύνοψη των αποτελεσμάτων από την *in vitro* διερεύνηση ύπαρξης βακτηριακών χαρακτηριστικών που προάγουν την ανάπτυξη των φυτών. (Α) Αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες από τα θετικά αποτελέσματα των βιοχημικών δοκιμών που πραγματοποιήθηκαν. Η δημιουργία διαφανούς ή μεταχρωματισμένης άλω μετά από σποτ 10 μl βακτηριακής καλλιέργειας στο κατάλληλο θρεπτικό μέσο και επώαση στους 30 °C υποδεικνύει θετικό αποτέλεσμα όσον αφορά τη διαλυτοποίηση ιζηματοποιημένου φωσφόρου, την παραγωγή ουρεασών, την παραγωγή κυτταρινασών, την παραγωγή χιτινασών, την παραγωγή πρωτεασών, την παραγωγή σουλφατασών, και την παραγωγή σιδηροφόρων μορίων, ενώ η διάμετρος της άλω υποδηλώνει την ένταση. Ο μεταχρωματισμός του υγρού θρεπτικού μέσου υποδηλώνει θετικό αποτέλεσμα στη δοκιμή παραγωγής αμμωνίας. Η ένταση του μεταχρωματισμού στις δοκιμές παραγωγής ακετοΐνης και ενώσεων που περιέχουν ινδόλιο υποδηλώνει διαφορετική παραγόμενη συγκέντρωση. Ο βαθμός κατάρρευσης της σταγόνας στη μέθοδο drop collapse υποδηλώνει παραγωγή διαφορετικής συγκέντρωσης βιοεπιφανειοδραστικών ενώσεων. (Β) Διάγραμμα heatmap με δένδrogram με τα αποτελέσματα για κάθε δοκιμή και στέλεχος. Τα στελέχη υποβλήθηκαν σε ιεραρχική ομαδοποίηση (hierarchical clustering) με βάση τα αποτελέσματα των δοκιμών (δένδrogram). Παρουσιάζονται το αρνητικό αποτέλεσμα (μαύρο), το θετικό αποτέλεσμα (λευκό), η χαμηλή ικανότητα (σκούρο γκρι), η μέτρια ικανότητα (γκρι) και η υψηλή ικανότητα (ανοιχτό γκρι), με βάση μια αυθαίρετη κλίμακα διαβάθμισης που συγκρίνει τα εξεταζόμενα στελέχη ανάλογα με την εκάστοτε δοκιμή.

Η ιεραρχική ομαδοποίηση (hierarchical clustering) κατηγοριοποίησε τα στελέχη σε δύο βασικές ομάδες. Η πρώτη ομάδα περιέχει τα στελέχη του γένους *Pseudomonas* καθώς και τα στελέχη Hir127 και Hir138, χωρισμένα σε υποομάδες. Φαίνεται πως τα στελέχη του γένους *Pseudomonas* Tel31 και Ter82 είναι πιο απομακρυσμένα λειτουργικά από τα υπόλοιπα στελέχη του γένους, κάτι που επιβεβαιώνει και την ταξινόμηση σε διαφορετικό είδος μέσα από τη φυλογενετική ανάλυση του 16S. Η δεύτερη ομάδα περιέχει όλα τα υπόλοιπα στελέχη χωρισμένα σε 2 βασικές υποομάδες. Η πρώτη υποομάδα περιέχει τα στελέχη Hir102, Hir105, Tel52, Hir110, Hir139, Hir147, Hil4, Tel46. Η δεύτερη υποομάδα περιέχει με την εξής σειρά μια ομάδα των όμοιων στελεχών Hir115, Hir131, μια ομάδα των στελεχών Tel43, Ter74, μια ομάδα των στελεχών Tel42, Tel51, Hir119, μια ομάδα των Hir149, Tel40, Hir148, μια ομάδα των Tel34, Ter61, Tel54 και το Ter90. Και σε αυτές τις δοκιμές διαφαίνεται πως τα βακτήρια που είχαν κατηγοριοποιηθεί μαζί στη μορφολογία αποικιών και στη 16S

rDNA φυλογενετική ανάλυση έχουν ίδιες ή σχεδόν ίδιες ικανότητες και πως φυλογεντικά κοντινά στελέχη κατηγοριοποιήθηκαν στην ίδια ομάδα, όπως είναι τα στελέχη του γένους *Pseudomonas*, τα στελέχη που πιθανώς ανήκουν στο *B. subtilis* group, καθώς και τα στελέχη που πιθανώς ανήκουν στο είδος *B. mycoides*. Εξαιρέσεις φυσικά υπάρχουν, όπως είναι το στέλεχος Ter90 το οποίο φαίνεται να ομαδοποιήθηκε καλύτερα με τα στελέχη που πιθανώς ανήκουν στον κλάδο *B. pumilus*.

Παρατηρήθηκε πως ενώ κάποια χαρακτηριστικά εξαρτώνται από το εκάστοτε στέλεχος, κάποια άλλα καθορίζονται βάσει του γένους των βακτηρίων. Για παράδειγμα, η διαλυτοποίηση φωσφόρου, η παραγωγή ουρεασών και η παραγωγή σουλφατασών ήταν ισχυρότερα στα βακτήρια του γένους *Pseudomonas*. Επίσης, η παραγωγή ενώσεων με ινδόλιο φάνηκε να είναι ένα βασικό χαρακτηριστικό των στελεχών του γένους *Pseudomonas*, κάποια από τα οποία εμφάνισαν και τη μεγαλύτερη παραγωγή σε σχέση με όλα τα στελέχη που εξετάστηκαν. Αντίστοιχα, η παραγωγή χιτινασών και επιφανειοδραστικών ενώσεων που μπορούν να ανιχνευθούν με τη μέθοδο drop collapse ήταν υψηλότερη στα στελέχη του γένους *Bacillus*. Αξιοσημείωτο είναι επίσης το γεγονός της παραγωγής ακετοΐνης μόνο από στελέχη του γένους *Bacillus*. Όσον αφορά το λειτουργικό κομμάτι φαίνεται πως τα βακτήρια του γένους *Bacillus* συνδυάζουν περισσότερα χαρακτηριστικά που προάγουν την ανάπτυξη των φυτών σε σχέση με τα βακτήρια του γένους *Pseudomonas*, ακόμα και αν κάποια από αυτά δεν είναι στο ίδιο ποσοτικό επίπεδο με βάση τις *in vitro* δοκιμές.

Αυτές οι δοκιμές βοήθησαν σε μια γρήγορη προκαταρκτική διερεύνηση για την ανάδειξη κάποιων υποσχόμενων στελεχών ή ομάδων στελεχών τα οποία συγκεντρώνουν αρκετά επιθυμητά χαρακτηριστικά σε *in vitro* συνθήκες. Συγκεκριμένα, τα πιο υποσχόμενα στελέχη είναι τα Ter67, Ter70, Ter78, Ter80 από το γένος *Pseudomonas* και τα Tel46, Tel52, Hir102, Hir105, Hir110, Hir139 και Hil4 από το γένος *Bacillus*.

Πίνακας 4.7 Συγκεντρωτικός πίνακας με τα αποτελέσματα των δοκιμών που αφορούν χαρακτηριστικά προώθησης της ανάπτυξης των φυτών στα ενδοφυτικά βακτηριακά στελέχη. Η παρουσία ή απουσία διαφανούς/μεταχρωματισμένης άλω στο στερεό θρεπτικό μέσο και μεταχρωματισμού του υγρού θρεπτικού μέσου ορίστηκε ως αρνητικό (-) ή θετικό (+) αποτέλεσμα, αντίστοιχα. Σε δοκιμές όπου ήταν δυνατό να οριστεί η ένταση, αυτή ορίστηκε ως χαμηλή (+), μέτρια (++) ή υψηλή (+++) χρησιμοποιώντας μια αυθαίρετη κλίμακα διαβάθμισης που συγκρίνει τα εξεταζόμενα στελέχη μεταξύ τους. Η ένταση διαλυτοποίησης φωσφόρου προσδιορίστηκε ως χαμηλή (+) σε άλω διαμέτρου <1 cm, μέτρια (++) σε άλω διαμέτρου 1-3 cm και σε υψηλή σε άλω διαμέτρου >3 cm. Η παραγωγή κυτταρινάσων, χιτινάσων και πρωτεάσων προσδιορίστηκε ως χαμηλή (+) σε άλω διαμέτρου <1.5 cm, μέτρια (++) σε άλω διαμέτρου 1.5-3 cm και υψηλή (+++) σε άλω διαμέτρου >3 cm. Η ένταση παραγωγής ενώσεων που περιέχουν ινδόλιο προσδιορίστηκε ανάλογα με την ένταση του ροζ μεταχρωματισμού του μέσου, ενώ η παραγωγή ακετοΐνης ανάλογα με το πάχος της μεταχρωματισμένης ζώνης στο μέσο. Η ένταση παραγωγής επιφανειοδραστικών ενώσεων στη μέθοδο drop collapse προσδιορίστηκε ανάλογα με το βαθμό κατάρρευσης της σταγόνας μετά από 1 λεπτό.

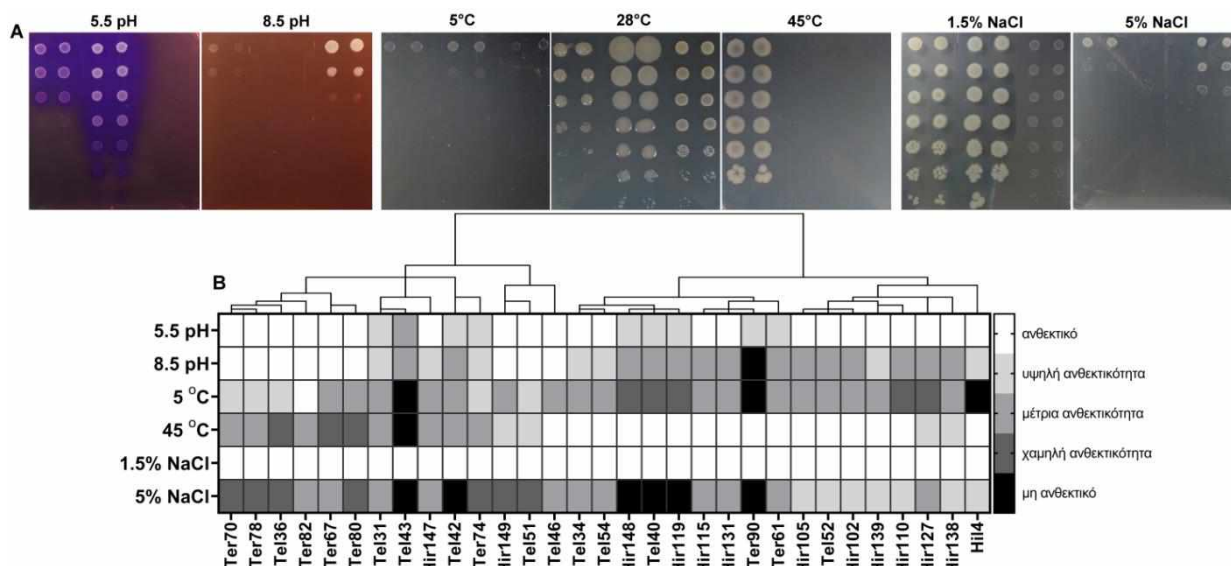
Βακτηριακό Στέλεχος	Διαλυτοποίηση φωσφόρου	Παραγωγή ενζύμων					Παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών				
		Ουρεάσες	Κυτταρινάσες	Χιτινάσες	Πρωτεάσες	Σουλφατάσες	Σιδηροφόρα	Αμμωνία	Ακετοΐνη	Ενώσεις με ινδόλιο	Επιφανειοδραστικές ενώσεις
Hil4	+	-	+++	+	+++	-	+	+	++	++	+++
Hir102	+	-	++	+	+++	-	++	+	++	++	+++
Hir105	+	-	++	+	+++	-	++	+	++	++	+++
Hir110	-	-	+++	+	+++	-	+++	+	+++	++	+++
Hir115	-	-	++	+++	+	-	-	-	++	++	++
Hir119	-	-	++	-	++	-	-	-	+	+	-
Hir127	++	-	+	-	-	-	+++	-	+	+	-
Hir131	++	-	++	+++	+	-	-	-	++	++	++
Hir 138	+	+	++	+++	-	-	+++	-	++	+	-
Hir139	-	-	+++	+	+++	-	+++	+	+++	++	+++
Hir147	-	-	++	-	++	-	+++	+	++	+	++
Hir148	-	-	++	-	++	-	++	-	+	+	-
Hir149	-	-	++	-	++	-	++	-	+	+	-
Tel31	++	-	-	-	-	-	+++	-	-	++	-
Tel34	+	-	++	+	++	-	++	-	+++	+	-
Tel36	+++	+	+	-	+	+	++	-	-	+++	-
Tel40	-	-	++	-	++	-	++	-	+	+	-
Tel42	-	-	++	-	++	-	-	-	+	+	-
Tel43	-	-	+++	++	++	-	+	-	+	+	-
Tel46	+	-	+++	+	+++	-	+++	+	++	++	++
Tel51	-	-	++	-	++	-	-	-	+	+	-
Tel52	+	-	++	+	+++	-	++	+	++	++	+++
Tel54	+	-	++	+	++	-	++	-	+++	+	-
Ter61	+	-	++	+	++	-	++	-	+++	+	-
Ter67	+++	-	+	-	++	+	+++	-	-	+++	-
Ter70	+++	+	++	-	++	+	+++	-	-	++	-
Ter74	-	-	+++	++	++	-	+	-	+	+	-
Ter78	+++	+	++	-	++	+	+++	-	-	++	-
Ter82	+++	+	+	-	+	-	++	-	-	+++	-
Ter80	+++	-	-	-	-	-	+++	+	-	++	-
Ter90	++	-	++	+	+++	-	+++	-	++	++	++

4.1.3.2 Χαρακτηριστικά περιβαλλοντικής προσαρμογής σε εύρος συνθηκών

Ένα ακόμη επιθυμητό χαρακτηριστικό ενός βακτηριακού εμβολίου είναι η ικανότητα προσαρμογής και αντοχής σε εύρος περιβαλλοντικών συνθηκών. Έτσι, εξετάστηκε η επιβίωση των στελεχών σε θερμοκρασίες 5 και 45°C, σε pH 5.5 και 8.5, καθώς και σε συγκεντρώσεις αλατότητας 1.5 (250 mM) και 5% (850 mM) (Εικόνα 4.8, Πίνακας 4.8).

Πίνακας 4.8 Μεταβολή κυτταρικής πυκνότητας επιλεγμένων ενδοφυτικών βακτηριακών στελεχών σε εύρος θερμοκρασιών, τιμών pH και συγκεντρώσεις αλατότητας σε σύγκριση με το μάρτυρα. Οι δοκιμές πραγματοποιήθηκαν με τη μέθοδο των διαδοχικών δεκαδικών αραιώσεων σε τρυβλία, τα οποία περιείχαν ή εκτέθηκαν στον παράγοντα επιλογής και συγκρίθηκαν με το τρυβλίο μάρτυρα που δεν περιείχε παράγοντα επιλογής (pH 6.8, 28 °C). Ως (-) ορίστηκε η απουσία ανάπτυξης, ενώ με αρνητικό ή θετικό πρόσημο υποδηλώνεται η μείωση ή αύξηση της ανάπτυξης σε σχέση με το μάρτυρα, αντίστοιχα.

Μεταβολή κυτταρικής πυκνότητας υπό ακραίες συνθήκες σε σχέση με το μάρτυρα (CFU/ml)						
Στέλεχος	Θερμοκρασία		pH		Αλατότητα	
	5 °C	45 °C	5.5	8.5	1.5%	5%
Hil4	-	+10 ²	0	-10 ²	0	-10
Hir105	-10 ⁴	0	0	-10 ⁴	0	-10 ²
Hir110	-10 ⁵	0	0	-10 ³	0	-10 ²
Hir115	-10 ⁴	0	0	-10 ³	0	-10 ³
Hir119	-10 ⁵	0	-10 ²	-10 ³	0	-
Hir127	-10 ⁵	-10	0	-10 ³	0	-10 ⁴
Hir131	-10 ⁴	0	0	-10 ⁴	0	-10 ³
Hir138	-10 ⁴	-10	0	-10 ⁴	0	-10 ²
Hir139	-10 ⁴	0	0	-10 ²	0	-10 ²
Hir147	-10 ⁴	-10 ³	+10 ²	-10 ²	0	-10 ³
Hir148	-10 ⁵	0	-10 ²	-10 ³	0	-
Hir149	-10 ³	-10 ²	0	0	0	-10 ⁶
Tel31	-10 ³	-10 ³	-10	-10	0	-10 ³
Tel34	-10 ⁴	0	0	-10 ²	0	-10 ²
Tel36	-10 ²	-10 ⁶	0	0	0	-10 ⁵
Tel40	-10 ⁵	0	-10	-10 ³	0	-
Tel42	-10 ⁴	-10 ⁴	-10	-10 ³	0	-
Tel43	-	-	-10 ³	-10 ³	0	-
Tel46	-10 ⁴	0	0	0	0	-10 ³
Tel51	-10 ²	-10 ²	0	0	0	-10 ⁵
Tel52	-10 ⁴	0	0	-10 ⁴	0	-10 ²
Tel54	-10 ⁴	0	0	-10 ²	0	-10 ³
Ter61	-10 ⁴	+10	-10	-10 ⁴	0	-10 ³
Ter67	-10 ⁴	-10 ⁵	0	0	0	-10 ⁴
Ter70	-10 ²	-10 ⁴	0	0	0	-10 ⁵
Ter74	-10 ²	-10 ³	-10	-10 ²	0	-10 ⁶
Ter78	-10 ²	-10 ⁴	0	0	0	-10 ⁵
Ter80	-10 ⁴	-10 ⁵	0	0	0	-10 ⁵
Ter82	0	-10 ⁴	0	0	0	-10 ⁴
Ter90	-	+10 ²	-10	-	0	-



Εικόνα 4.8 Αντοχή επιλεγμένων ενδοφυτικών βακτηριακών στελεχών σε εύρος θερμοκρασιών, τιμών pH και συγκεντρώσεις αλατότητας. Οι δοκιμές πραγματοποιήθηκαν με τη μέθοδο των διαδοχικών δεκαδικών αραιώσεων σε τρυβλία, τα οποία περιείχαν ή εκτέθηκαν στον παράγοντα επιλογής. Η αντοχή στην καταπόνηση ορίστηκε ανάλογα με το μέγεθος της αραιώσης που αναπτύχθηκε το βακτήριο σε σύγκριση με το τρυβλίο μάρτυρα που δεν περιείχε παράγοντα επιλογής (pH 6.8, 28 °C). (A) Αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες των δοκιμών ανθεκτικότητας. (B) Διάγραμμα heatmap με δενδρόγραμμα με τα αποτελέσματα για κάθε δοκιμή και στέλεχος. Τα στελέχη υποβλήθηκαν σε ιεραρχική ομαδοποίηση (hierarchical clustering) με βάση τα αποτελέσματα των δοκιμών. Ως μη ανθεκτικό (μαύρο χρώμα) ορίστηκε το στέλεχος που δεν αναπτύχθηκε σε καμία αραιώση, ως χαμηλή ανθεκτικότητα (σκουρό γκρι χρώμα) ορίστηκε η μεταβολή 10^3 - 10^6 CFU/ml, ως μέτρια ανθεκτικότητα (γκρι χρώμα) ορίστηκε η μεταβολή 10^3 - 10^4 CFU/ml, ως υψηλή ανθεκτικότητα (ανοιχτό γκρι χρώμα) ορίστηκε η μεταβολή 10 - 10^2 CFU/ml και ως ανθεκτικό (λευκό) ορίστηκε το στέλεχος που δεν παρουσίασε μεταβολή ή παρουσίασε θετική μεταβολή.

Φαίνεται πως τα στελέχη του γένους *Pseudomonas* μπόρεσαν να επιβιώσουν χωρίς μεταβολές στην ανάπτυξή τους σε pH 5.5 και 8.5, ενώ τα στελέχη του γένους *Bacillus* είχαν υψηλή ανθεκτικότητα μόνο στο pH 5.5 και μέτρια ανθεκτικότητα στο 8.5. Όσον αφορά τη χαμηλή θερμοκρασία (5 °C), ελάχιστα στελέχη εμφάνισαν υψηλή ανθεκτικότητα (Ter70, Ter78, Tel36, Ter82, Ter74, Tel51), ενώ τα στελέχη Ter90 και Hil4 δεν αναπτύχθηκαν καθόλου. Στην υψηλή θερμοκρασία (45 °C) τα στελέχη του γένους *Bacillus* παρουσίασαν εξαιρετική ανθεκτικότητα, ενώ τα στελέχη του γένους *Pseudomonas* παρουσίασαν μέτρια ή χαμηλή ανθεκτικότητα. Στη δοκιμή αλατότητας με συγκέντρωση 1.5%, δε μεταβλήθηκε η ανάπτυξη των εξεταζόμενων στελεχών, ενώ στη συγκέντρωση 5% καταγράφηκαν διαφορετικά αποτελέσματα. Ειδικότερα, χαμηλή ή καθόλου ανθεκτικότητα εμφάνισαν τα στελέχη του γένους *Pseudomonas* Ter70, Ter78, Tel36, Ter80, τα στελέχη που πιθανώς ανήκουν στο είδος *B. mycoides* Tel43 και Ter74 και τα στελέχη που πιθανώς ανήκουν στην ομάδα *B. cereus* Tel42, Hir149, Tel51.

4.1.3.3 Φυσική ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά

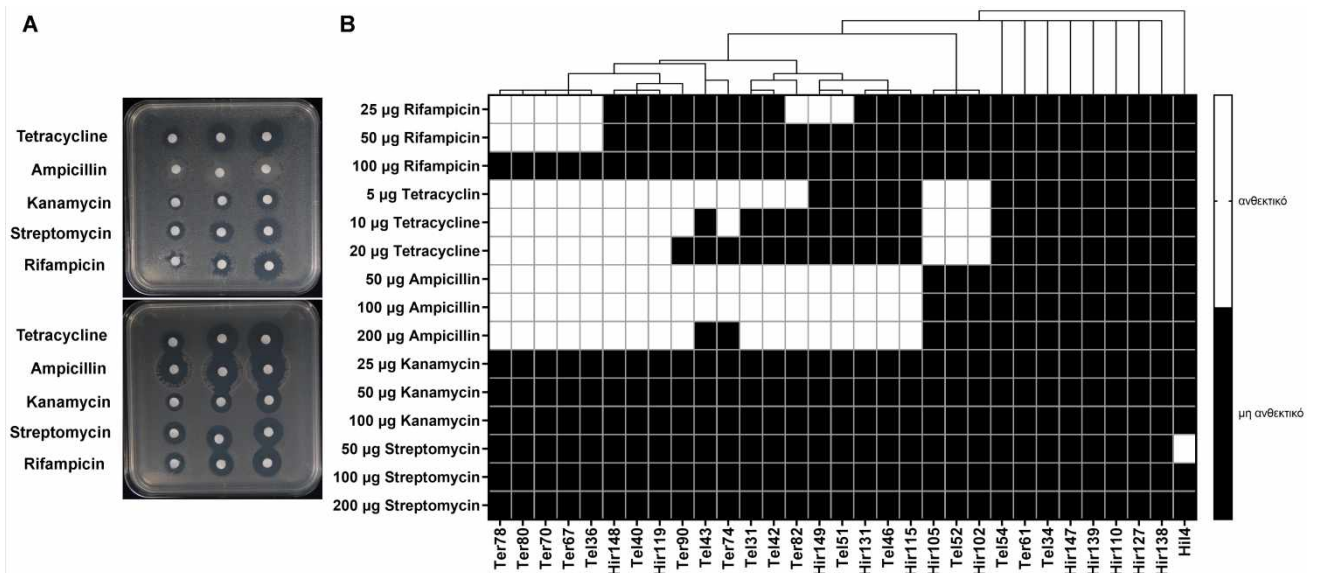
Ένα χαρακτηριστικό που πρέπει να ληφθεί υπ' όψιν για την επιλογή ενός στελέχους ως βακτηριακό εμβόλιο είναι η φυσική ανθεκτικότητά τους σε εύρος αντιβιοτικών, καθώς αποτελεί μειονέκτημα για τη χρήση του στο περιβάλλον. Έτσι, τα στελέχη εξετάστηκαν ως προς την ανθεκτικότητά τους στα αντιβιοτικά ριφαμπικίνη, καναμυκίνη, στρεπτομυκίνη, αμπικιλίνη και τετρακυκλίνη (Πίνακας 4.9, Εικόνα 4.9).

Διαφαίνεται πως τα στελέχη του γένους *Pseudomonas* και τα στελέχη που πιθανώς ανήκουν στο *B. cereus* group ήταν ανθεκτικά σε πάνω από ένα αντιβιοτικά, η μία ομάδα των στελεχών που πιθανώς ανήκουν στον κλάδο *B. amyloliquefaciens* (Hir102, Hir105, Tel52) ήταν ανθεκτικά σε ένα αντιβιοτικό, ενώ τα περισσότερα στελέχη δεν είναι ανθεκτικά σε κανένα αντιβιοτικό. Τα στελέχη που πιθανώς ανήκουν στο *B. cereus* group χωρίζονται σε ομάδες ανάλογα με την ανθεκτικότητά τους. Συγκεκριμένα, ίδια ανθεκτικότητα είχαν τα στελέχη Hir119, Hir148, Tel40, όπως και τα στελέχη Hir149 και Tel51, ενώ το στέλεχος Tel42 φάνηκε να έχει διαφορετικό μοτίβο ανθεκτικότητας και από τις 2 ομάδες.

Πίνακας 4.9 Αποτελέσματα της δοκιμής για φυσική ανθεκτικότητα των ενδοφυτικών βακτηριακών απομονώσεων σε εύρος συγκεντρώσεων των αντιβιοτικών ριφαμπικίνη (Rif), τετρακυκλίνη (Tet), αμπικιλίνη (Amp), καναμυκίνη (Kan) και στρεπτομυκίνη (str). Η εξέταση ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο soft agar overlay method. Η ανθεκτικότητα συμβολίζεται με (+), ενώ η μη ανθεκτικότητα με (-).

Στέλεχος	Φυσική ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά															
	Ριφαμπικίνη (μg/δισκίο)			Τετρακυκλίνη (μg/δισκίο)			Αμπικιλίνη (μg/δισκίο)			Καναμυκίνη (μg/δισκίο)			Στρεπτομυκίνη (μg/δισκίο)			
	25	50	100	5	10	20	50	100	200	25	50	100	50	100	200	
Hir4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Hir102	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hir105	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hir110	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hir115	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Hir119	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Hir127	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hir131	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Hir138	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hir139	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hir147	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hir148	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Hir149	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Tel31	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Tel34	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tel36	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Tel40	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Tel42	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Tel43	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Tel46	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Tel51	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Tel52	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tel54	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ter61	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ter67	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Ter70	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Ter74	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Ter78	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Ter80	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Ter82	+	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Ter90	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-

*Ιδιαίτερος φαινότυπος όπου αρχικά σχηματίστηκε ζώνη παρεμπόδισης ανάπτυξης αλλά στη συνέχεια καλύφθηκε.



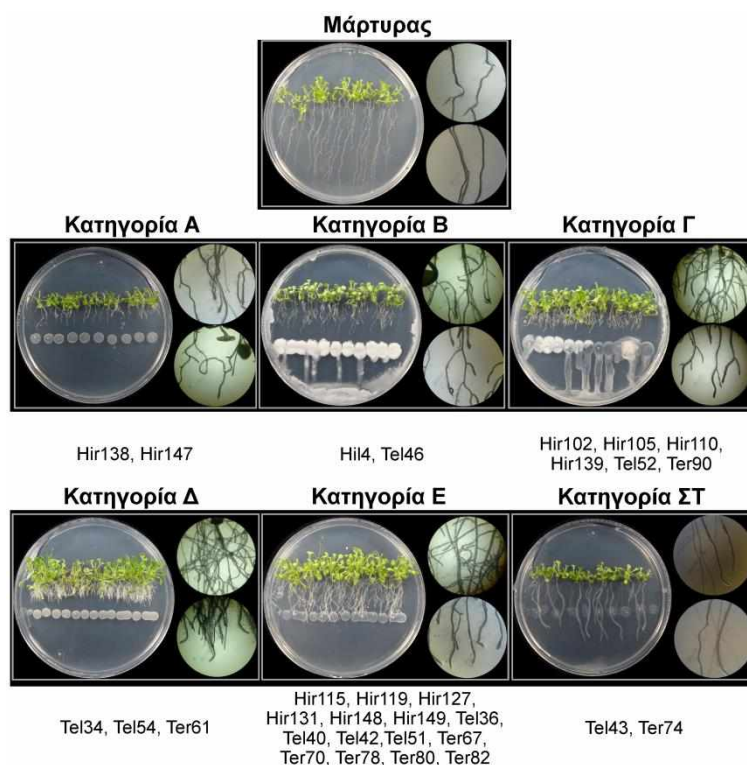
Εικόνα 4.9 Δοκιμή ανθεκτικότητας επιλεγμένων ενδοφυτικών βακτηριακών απομονώσεων σε εύρος αντιβιοτικών και συγκεντρώσεων αυτών. (A) Αντιπροσωπευτικές εικόνες της δοκιμής ανθεκτικότητας με τη μέθοδο soft agar overlay assay (B) Διάγραμμα heatmap με δένδρογραμμα με τα αποτελέσματα για κάθε συγκέντρωση αντιβιοτικού και στέλεχος. Τα στελέχη υποβλήθηκαν σε ιεραρχική ομαδοποίηση (hierarchical clustering) με βάση τα αποτελέσματα της δοκιμής. Ως μη ανθεκτικό (μαύρο χρώμα) ορίστηκε το στέλεχος που δεν αναπτύχθηκε γύρω από το δισκίο (διαφανής άλως), ενώ ως ανθεκτικό εκείνο του οποίου η ανάπτυξη δεν παρεμποδίστηκε.

4.1.4 Επίδραση στο φαινότυπο του φυτού μοντέλου *Arabidopsis thaliana* Col-0 *in vitro*

Άλλος ένας παράγοντας για την κατηγοριοποίηση και διαλογή των βακτηριακών στελεχών υπήρξε η βιωσιμότητα και ο φαινότυπος των φυτών *A.thaliana* μετά από τον εμβολιασμό των βακτηρίων σε απόσταση 3 cm από τη ρίζα του φυτού με σχετικά μεγάλη ποσότητα εμβολίου (10 µl) και τοποθέτηση σε θάλαμο με θερμοκρασία 25°C ώστε να ευνοηθούν τα βακτήρια για 15 ημέρες. Παρατηρήθηκαν διαφορετικοί φαινότυποι των φυτών οι οποίοι διακρίθηκαν σε 6 βασικές διαφορετικές κατηγορίες (Εικόνα 4.10).

Οι κατηγορίες Α έως Ε αφορούν την επίτευξη πολύ πιο κοντής σε μήκος ρίζας σε σχέση με τα φυτά μάρτυρα, ενώ η κατηγορία ΣΤ αφορά φαινότυπο αρκετά όμοιο με του μάρτυρα. Η κατηγορία Α εμφανίζει πολύ κοντή ρίζα με μικρή έκπτυξη πλευρικών ριζών, η οποία φαίνεται λίγο καχεκτική σε σχέση με το μάρτυρα, ωστόσο παρατηρούνται περισσότερα και πιο μακριά ριζικά τριχίδια σε σχέση με το μάρτυρα. Σε αυτήν την κατηγορία ανήκουν τα στελέχη Hir138 και Hir147. Η κατηγορία Β αποτελείται από τα στελέχη Hir4 και Tel46 και εμφανίζει φυτά με κοντή ρίζα αλλά περισσότερες πλευρικές και περισσότερα ριζικά τριχίδια από την κατηγορία Α, ενώ οι ρίζες φαίνεται να έχουν καφετί απόχρωση. Τα φυτά της κατηγορίας Γ εμφάνισαν κοντή ρίζα με περισσότερες πλευρικές ρίζες αλλά κοντύτερα ριζικά τριχίδια από την κατηγορία Β, ενώ οι ρίζες φαίνεται να έχουν καφετί απόχρωση. Σε αυτήν την κατηγορία ανήκουν τα στελέχη Hir102, Hir105, Hir110, Hir139 και Ter90. Τα φυτά της κατηγορίας Δ παρουσιάζουν κοντή ρίζα με μεγαλύτερη διάμετρο, πολλές πλευρικές ρίζες όπως και πολλά ριζικά τριχίδια με μεγάλο μήκος που συνδυασμένα προσδίδουν πυκνές ρίζες. Είναι ο πιο εντυπωσιακός φαινότυπος που παρατηρήθηκε, και προκλήθηκε από τα στελέχη Tel34, Tel54, Ter61. Η κατηγορία Ε περιλαμβάνει φυτά με λίγο πιο κοντή ρίζα σε σχέση με το μάρτυρα με πολλές

πλευρικές ρίζες και μεγάλα σε μήκος ριζικά τριχίδια, ενώ τα στελέχη που ανήκουν σε αυτήν την κατηγορία είναι τα Hir115, Hir119, Hir127, Hir131, Hir148, Hir149, Tel36, Tel40, Tel42, Tel51, Ter67, Ter70, Ter78, Ter80, Ter82. Τέλος, η κατηγορία ΣΤ περιλαμβάνει φυτά με μορφολογία παρόμοια με του μάρτυρα, ωστόσο έχουν ριζικά τριχίδια μεγαλύτερα σε μήκος. Ακόμη, οι κατηγορίες Γ, Δ και Ε φαίνεται να έχουν μεγαλύτερη φυλλική επιφάνεια από το μάρτυρα και από τις κατηγορίες Β και ΣΤ.



Εικόνα 4.10 Αντιπροσωπευτικές μακροσκοπικές και στερεοσκοπικές φωτογραφίες κατηγοριών φαινοτύπων των φυτών *A.thaliana* 15 ημέρες μετά τον εμβολιασμό βακτηριακών καλλιέργειών σε απόσταση από το ακρορριζίο. Φυτάρια *A. thaliana* 4 ημερών μεταφυτεύτηκαν σε στερεό θρεπτικό μέσο ½ MS με 0.5% (w/v) σουκρόζη και ακολούθησε εμβολιασμός με 10 μl βακτηριακής καλλιέργειας (10^9 - 10^{10} CFU/ml) σε απόσταση 3 cm. Τα τρυβλία επώαστηκαν σε θάλαμο ανάπτυξης (16: 8 φωτοπερίοδος, 25 ± 1 °C, 50-60% σχετική υγρασία) για άλλες 15 ημέρες. Σε κάθε κατηγορία φαινοτύπου αναγράφονται τα στελέχη που ανήκουν σε αυτήν. Όλες οι φωτογραφίες αποτυπώθηκαν στην ίδια μεγέθυνση.

Φαίνεται πως όλα τα βακτήρια που εξετάστηκαν είχαν επίδραση στη μορφολογία της ρίζας του φυτού *Arabidopsis thaliana* Col-0 είτε αυξάνοντας τον αριθμό και το μήκος των ριζικών τριχιδίων είτε αυξάνοντας τον αριθμό των πλευρικών ριζών, είτε προκαλώντας και τα δύο, ενώ αυτά που προκάλεσαν πιο έντονη αλλαγή στην αρχιτεκτονική, ταυτόχρονα μείωσαν και το μήκος της κεντρικής ρίζας. Δεν παρατηρήθηκε νέκρωση του φυτού από κανένα βακτήριο, παρ'όλο που το εμβόλιο ήταν σε μεγάλη ποσότητα και η θερμοκρασία ανάπτυξης των φυτών ευνοούσε την γρήγορη ανάπτυξη των βακτηρίων. Την πιο έντονη επίδραση στη ρίζα έδειξαν τα στελέχη Tel34, Tel54 και Ter61 (κλάδος *B. pumilus*), τα οποία προκάλεσαν μεγάλη μείωση του μήκους της ρίζας με ταυτόχρονη μεγάλη αύξηση των πλευρικών ριζών και των ριζικών τριχιδίων, οδηγώντας σε πολύ πυκνό ριζικό σύστημα, ορατό και μακροσκοπικά.

4.1.5 Σύνοψη-Επιλογή των αντιπροσωπευτικών στελεχών

Σκοπός των παραπάνω πειραμάτων ήταν να διαχωριστούν οι επιλεγμένες απομονώσεις σύμφωνα με τη φυλογένεια και τη δράση τους, ώστε να επιλεγούν οι πιο ικανές απομονώσεις από την κάθε ομάδα κοντινών στελεχών. Αρχικά, συγκρίθηκε η μορφολογία της αποικίας κάθε στελέχους και πραγματοποιήθηκε φυλογενετική ανάλυση της 16S rDNA αλληλουχίας, από όπου προέκυψαν ομάδες κοντινών στελεχών, οι οποίες διαφοροποιήθηκαν περαιτέρω με διάφορες δοκιμές.

Τα στελέχη Hir102, Hir105, Hir110, Hir139 και Tel52 πιθανώς να ανήκουν στο *B. subtilis* group και συγκεκριμένα στον κλάδο *B. amyloliquefaciens*, ενώ διαχωρίζονται σε 2 ομάδες που αποτελούνται από τα Hir102, Hir105, Tel52 και τα Hir110, Hir139. Αυτό το γεγονός επιβεβαιώνεται από τις δοκιμές αλληλεπίδρασης βακτηρίων με δύο τεχνικές, όπου η κάθε ομάδα εμφάνισε την ίδια συμπεριφορά ως προς όλα τα υπόλοιπα στελέχη. Μάλιστα, στη δοκιμή ομαδικής κινητικότητας κατά ζεύγη οι 2 ομάδες εμφάνισαν ζώνη μεταξύ τους και όχι συγχώνευση, όπως τα στελέχη της κάθε ομάδας μεταξύ τους. Ακόμα, η κάθε ομάδα σχηματίστηκε βασιζόμενη στα χαρακτηριστικά προώθησης της ανάπτυξης των φυτών και τα χαρακτηριστικά περιβαλλοντικής προσαρμογής, ενώ παρουσίασαν τον ίδιο φαινότυπο στο φυτό *A.thaliana* Col-0. Έτσι, από τη μία ομάδα επιλέχθηκε το στέλεχος Tel52 και από την άλλη ομάδα το στέλεχος Hir139.

Τα στελέχη Tel34, Ter61 και Tel54 αποτέλεσαν μία ομάδα που πιθανώς ανήκει στον κλάδο *B. pumilus*. Τα τρία αυτά στελέχη διαθέτουν ίδια ή παρόμοια χαρακτηριστικά προώθησης της ανάπτυξης των φυτών και χαρακτηριστικά περιβαλλοντικής προσαρμογής, ωστόσο ομαδοποιούνται διαφορετικά στις δοκιμές αλληλεπίδρασης των βακτηριακών στελεχών. Συγκεκριμένα, το στέλεχος Tel54 ξεχωρίζει από τα στελέχη Tel34 και Ter61. Το Tel34 προκάλεσε πολύ καλό φαινότυπο στο φυτό *A.thaliana* κι έτσι επιλέχθηκαν τα στελέχη Tel34 και Tel54 ως αντιπροσωπευτικά στελέχη αυτής της ομάδας.

Η επόμενη ομάδα είναι τα στελέχη Hil4 και Tel46 τα οποία φαίνεται να ανήκουν στον κλάδο *B. subtilis* και συγκεκριμένα στο είδος *B. halotolerans*. Τα συγκεκριμένα στελέχη ομαδοποιήθηκαν σε κάποιες δοκιμές αλλά όχι σε άλλες, ενώ παρουσίασαν ζώνη στη μεταξύ τους αλληλεπίδραση σε στερεό θρεπτικό για swarming. Έτσι, επιλέχθηκαν και τα δύο για περαιτέρω δοκιμές.

Το στέλεχος Ter90 φαίνεται να είναι ξεχωριστό στέλεχος, το οποίο εμφάνισε ομοιότητες με διαφορετικά στελέχη σε κάθε δοκιμή. Συγκεκριμένα, το στέλεχος αυτό είχε διαφορετικό μοτίβο ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά σε σχέση με τα περισσότερο κοντινά φυλογενετικά στελέχη, ομαδοποιήθηκε με τα στελέχη του κλάδου *B. pumilus* στα χαρακτηριστικά προώθησης της ανάπτυξης των φυτών αλλά και στις δοκιμές αλληλεπίδρασης βακτηρίων, ενώ έδειξε τον ίδιο φαινότυπο με τα στελέχη του κλάδου *B. amyloliquefaciens* στις δοκιμές *A. thaliana*.

Άλλη μία ομάδα είναι τα στελέχη Hir115 και Hir131, τα οποία έδειξαν τον ίδιο φαινότυπο σε όλες τις δοκιμές, οπότε επιλέχθηκε τυχαία το στέλεχος Hir115. Από τα στελέχη του *B.cereus* group η ομάδα των στελεχών Tel43 και Ter74 έχουν όμοια αποικία και συμπεριφορά οπότε επιλέχθηκε τυχαία

το στέλεχος Ter74. Από τη δεύτερη ομάδα στελεχών είναι δύσκολο να βγει ασφαλές συμπέρασμα καθώς σε κάθε δοκιμή αλλάζουν τα στελέχη που έχουν παρόμοια συμπεριφορά. Με βάση τις βακτηριακές αλληλεπιδράσεις και τα χαρακτηριστικά προώθησης των φυτών, επιλέχθηκαν τα στελέχη Tel51, Tel42 και Hir148. Από την ομάδα των στελεχών του γένους *Pseudomonas* επιλέχθηκαν με βάση μικρές διαφοροποιήσεις τα στελέχη Ter80, Ter67 και Ter78. Επιπρόσθετα για περαιτέρω ανάλυση συνέχισαν τα στελέχη τα οποία δεν είχαν ομαδοποιηθεί με κάποιο άλλο στις αρχικές ομάδες, τα Hir127, Hir147, Tel31, Ter82, Ter90, Hir138.

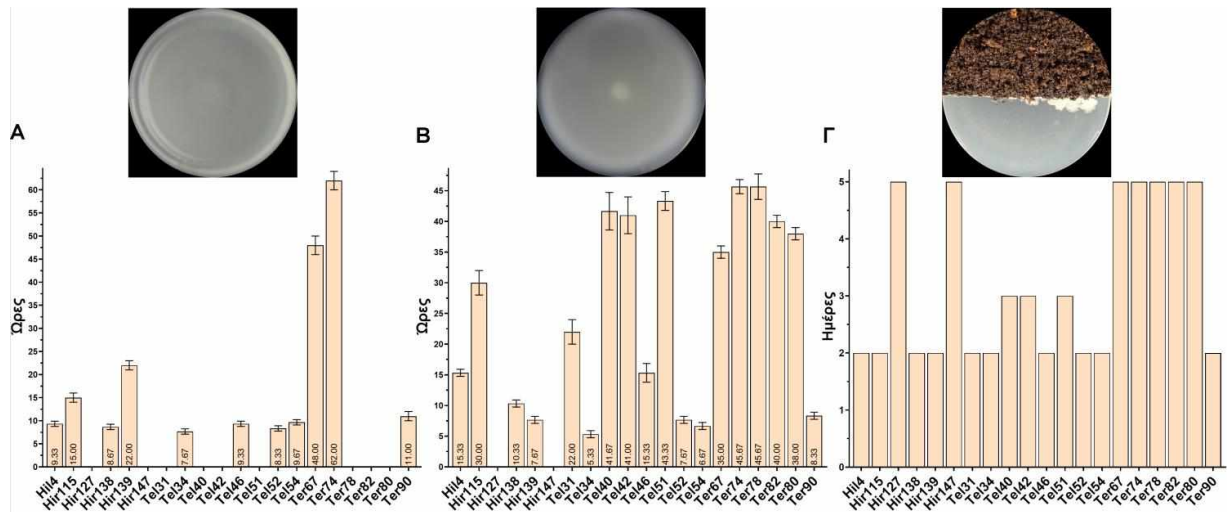
Συνολικά τα στελέχη που επιλέχθηκαν για την επόμενη φάση ήταν τα Hil4, Hir115, Hir139, Hir127, Hir138, Hir147, Hir148, Tel31, Tel34, Tel42, Tel51, Tel52, Tel54, Ter67, Ter74, Ter78, Ter80, Ter82 και Ter90.

4.2 Επιλογή των καταλληλότερων ενδοφυτικών βακτηριακών στελεχών

4.2.1 Διερεύνηση κινητικότητας

Η κίνηση βοηθάει τα βακτήρια να προσεγγίζουν τους φυτικούς ιστούς και να τους αποικίζουν, αλλά και να προσεγγίζουν τα παθογόνα. Σε αυτό το στάδιο μελετήθηκε η ικανότητα των επιλεγμένων στελεχών να κινούνται ομαδικά σε επιφάνειες (swarming motility), να εκτελούν κολυμβητική κίνηση (swimming motility), καθώς και να κινούνται από το έδαφος προς το θρεπτικό υπόστρωμα. Στο προηγούμενο κεφάλαιο είχε πραγματοποιηθεί δοκιμή ομαδικής κίνησης σε επιφάνειες, όπου αξιολογήθηκαν τα πιο γρήγορα βακτήρια που είχαν καλύψει το τρυβλίο σε 24 ώρες. Στις συγκεκριμένες δοκιμές, τα τρυβλία παρακολουθούνταν ανά μία ώρα για κάποιες ημέρες ώστε να εξακριβωθεί η χρονική στιγμή στην οποία γίνεται η κάλυψη των τρυβλίων.

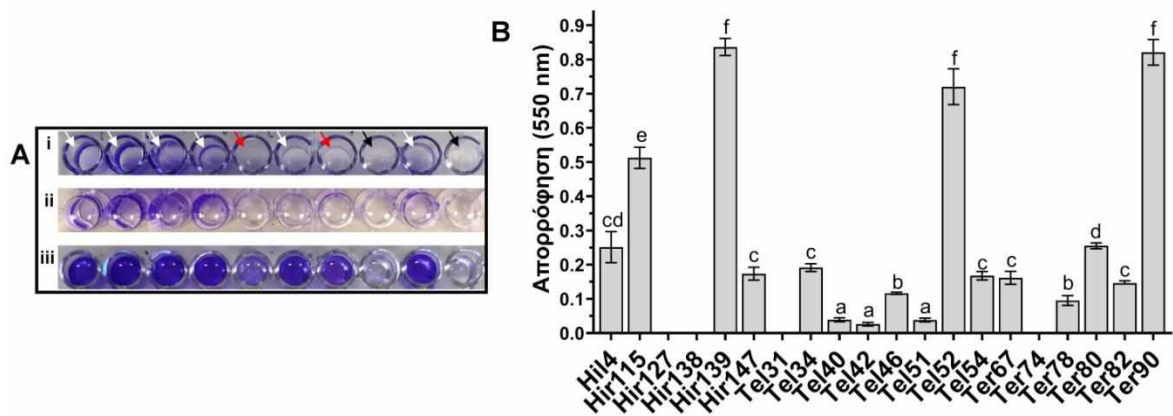
Τα πιο γρήγορα βακτήρια όσον αφορά την ομαδική κίνηση σε επιφάνειες (**Εικόνα 4.11Α**) ήταν τα στελέχη Hil4, Hir138, Tel34, Tel46, Tel52, Tel54 και Ter90, με το γρηγορότερο να αποδεικνύεται το Tel52. Λίγο πιο αργά στελέχη, τα οποία ωστόσο πέτυχαν κάλυψη του τρυβλίου εντός των 24 ωρών ήταν τα στελέχη Hir115 και Hir139. Από τα υπόλοιπα στελέχη κανένα δεν έφτασε τις άκρες του θρεπτικού στη διάρκεια των συγκεκριμένων ημερών παρατήρησης, εκτός από τα στελέχη Ter67 και Ter74, τα οποία χρειάστηκαν περίπου 3 ημέρες. Όσα στελέχη δεν κατάφεραν να καλύψουν το θρεπτικό, δεν προχώρησαν πέρα από την κηλίδα εμβολιασμού. Στη δοκιμή για την κολυμβητική κίνηση (**Εικόνα 4.11Β**) παρατηρήθηκαν λίγο διαφορετικά αποτελέσματα, καθώς τα μοναδικά στελέχη που δεν κατάφεραν να καλύψουν το τρυβλίο ήταν τα Hir127 και Hir147. Τα πιο γρήγορα ήταν τα Hil4, Hir138, Hir139, Tel34, Tel46, Tel52, Tel54, Ter90 με το γρηγορότερο να αποδεικνύεται το Tel34. Στη δοκιμή της κίνησης στο έδαφος (**Εικόνα 4.11Γ**) τα στελέχη Hil4, Hir115, Hir138, Hir139, Tel31, Tel34, Tel46, Tel52 και Ter90 ήταν αυτά που έφτασαν πιο γρήγορα στο θρεπτικό. Έτσι, τα στελέχη που ξεχωρίζουν για την γρήγορη κίνησή τους είναι τα Hil4, Hir138, Tel34, Tel46, Tel52, Tel54 και Ter90 και ακολουθούν τα Hir115 και Hir139.



Εικόνα 4.11 Διερεύνηση της κινητικότητας των ενδοφυτικών βακτηριακών στελεχών σε *in vitro* συνθήκες. Ποσότητα 10 μl από καλλιέργειες 18-20 ωρών τοποθετήθηκε ασηπτικά στο κέντρο του ημιστερεού θρεπτικού μέσου NA ή ημικυκλίου εδάφους και ακολούθησε επώαση στους 30 °C. (A) Αντιπροσωπευτική φωτογραφία και ραβδόγραμμα των ωρών που χρειάστηκε κάθε στέλεχος για να καλύψει το ημιστερέο (0.5% αγαρ) θρεπτικό μέσο NA στη διερεύνηση ικανότητας ομαδικής κινητικότητας σε επιφάνειες (swarming motility) μετά από επώαση 72 ωρών, (B) Αντιπροσωπευτική φωτογραφία και ραβδόγραμμα των ωρών που χρειάστηκε κάθε στέλεχος για να καλύψει το ημιστερέο (0.3% αγαρ) θρεπτικό μέσο NA στη διερεύνηση ικανότητας κολυμβητικής κίνησης (swimming motility) μετά από επώαση 72 ωρών, (Γ) Αντιπροσωπευτική φωτογραφία και ραβδόγραμμα των ημερών που χρειάστηκε κάθε στέλεχος για να φτάσει από το ημικύκλιο εδάφους στο ημιστερέο (0.8%) θρεπτικό μέσο NA στη διερεύνηση κινητικότητας στο έδαφος μετά από επώαση 5 ημερών. Οι απουσίες ράβδοι υποδεικνύουν τα στελέχη που δεν κάλυψαν το τρυβλίο στις 72 ώρες επώασης.

4.2.2 Διερεύνηση ικανότητας σχηματισμού βιοϋμενίου (biofilm)

Ο σχηματισμός βιοϋμενίου συμβάλλει στην πρόσδεση και αγκυροβολήση των βακτηριακών κυττάρων πάνω στο φυτικό ιστό ώστε να αποικίζουν επιτυχώς το φυτό, αλλά και στα εδαφικά σωματίδια της ριζόσφαιρας. Στη συγκεκριμένη μέθοδο, προσδιορίζεται η ικανότητα των στελεχών να σχηματίζουν σταθερά βιοϋμενία σε πηγαδάκια πολυστερενίου (Εικόνα 4.12A). Τα στελέχη που δε σχημάτισαν καθόλου δακτύλιο ήταν τα Hir127, Hir138, Tel31, Ter74, ενώ αυτά που σχημάτισαν ελάχιστο ήταν τα στελέχη Tel40, Tel42, Tel51, Tel46 και Ter78. Αρκετά καλό σχηματισμό βιοφιλμ επέδειξαν τα στελέχη Hir4 και Hir115 ακολουθούμενα από τα Hir147, Tel34, Ter67 και Ter80. Ωστόσο, τα στελέχη που εμφανίζουν ικανότητα σχηματισμού ισχυρού βιοϋμενίου, με μεγάλη και στατιστικά σημαντική διαφορά από τα υπόλοιπα, είναι τα στελέχη Hir139, Tel52 και Ter90.



Εικόνα 4.12 Ικανότητα των ενδοφυτικών βακτηριακών απομονώσεων να σχηματίζουν βιοϋμένιο (biofilm) σε πλαστική επιφάνεια. (Α) Φωτογραφίες της δοκιμής από μία αντιπροσωπευτική πλάκα μετά τη βαφή crystal violet της πάνω (i) και κάτω (ii) όψης της πλάκας όπου φαίνονται οι δακτύλιοι του βιοϋμένιου και (iii) όπου φαίνεται η ένταση χρώματος μετά το ξέβγαμμα της χρωστικής, το οποίο αντιπροσωπεύει την ένταση του σχηματισμού του βιοϋμένιου. Με λευκό βέλος υποδεικνύονται τα δείγματα με ισχυρό σχηματισμό βιοϋμένιου, με κόκκινο βέλος τα δείγματα με μέτριο σχηματισμό και με μαύρο βέλος τα δείγματα με χαμηλή-μηδενική ένταση σχηματισμού βιοϋμένιου (B) Απορρόφηση (550 nm) της χρωστικής crystal violet που είχε βάψει τα βακτηριακά κύτταρα και υποδεικνύει τον αριθμό των κυττάρων που σχημάτισαν βιοϋμένιο.

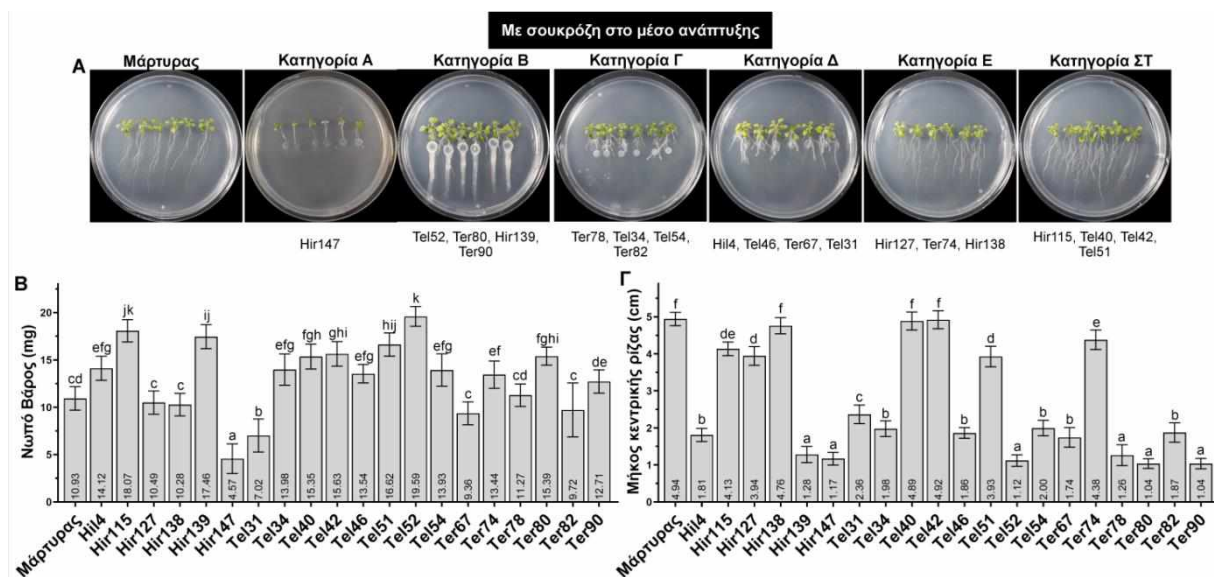
4.2.3 Διερεύνηση *in vitro* προώθησης της ανάπτυξης του φυτού μοντέλου *Arabidopsis thaliana*

Για τη γρήγορη διερεύνηση της ικανότητας προώθησης της ανάπτυξης των φυτών πραγματοποιήθηκε εμβολιασμός των βακτηρίων στο φυτό μοντέλο *A. thaliana* Col-0 με διαφορετικούς τρόπους σε συνθήκες *in vitro*.

4.2.3.1 Εμβολιασμός του βακτηρίου πάνω στη ρίζα

Αρχικά, τα βακτηριακά στελέχη εμβολιάστηκαν επάνω στο ακρορρίζιο νεαρών φυταρίων *A. thaliana* Col-0 σε θρεπτικό μέσο ($\frac{1}{2}$ MS + 0.8% αγαρ) που περιέχει σουκρόζη, το οποίο συνήθως προτιμάται σε τέτοιες μελέτες. Ανάλογα με το φαινότυπο των φυτών μετά το πέρας του πειράματος τα στελέχη ταξινομήθηκαν σε 6 κατηγορίες (Εικόνα 4.13Α). Στην κατηγορία Α, όπου ανήκει το στέλεχος Hir147, τα φυτά ήταν καχεκτικά σε σχέση με το μάρτυρα, με πολύ κοντή ρίζα και υποανάπτυκτο φύλλωμα. Στην κατηγορία Β, παρατηρήθηκε έντονη ανάπτυξη του βακτηρίου και τα φυτά είχαν πολύ κοντή ρίζα, αλλά έντονα ανεπτυγμένο φύλλωμα. Στη συγκεκριμένη κατηγορία ταξινομήθηκαν τα στελέχη του κλάδου *B. amyloliquefaciens* Tel52 και Hir139, το στέλεχος του κλάδου *B. subtilis* Ter90, καθώς και το στέλεχος Ter80 (*Pseudomonas* sp.). Η κατηγορία Γ αποτελείται από φυτά που είχαν κοντή, έντονα διακλαδισμένη ρίζα με κανονικό φύλλωμα, ενώ τα στελέχη που ανήκουν σε αυτήν είναι τα Tel34 και Tel54 (κλάδος *B. pumilus*), καθώς και τα Ter78, Ter82 (*Pseudomonas* sp.). Στην κατηγορία Δ ταξινομήθηκαν φυτά με ρίζα μέτριου μήκους, διακλαδισμένη, όπως και με ανεπτυγμένο φύλλωμα, ενώ τα στελέχη που την απαρτίζουν είναι τα Hir14, Tel46 (κλάδος *B. halotolerans*) καθώς και τα Ter67, Tel31 (*Pseudomonas* spp.). Η κατηγορία Ε αποτελείται από φυτά που ήταν παρόμοια με το μάρτυρα και τα στελέχη Hir127, Ter74, Hir138. Τέλος, στην κατηγορία ΣΤ ανήκουν φυτά με μακριά ρίζα, περισσότερο διακλαδισμένη και με πιο ανεπτυγμένο φύλλωμα σε σχέση με το μάρτυρα, ενώ αποτελείται από τα στελέχη Tel40, Tel42 και

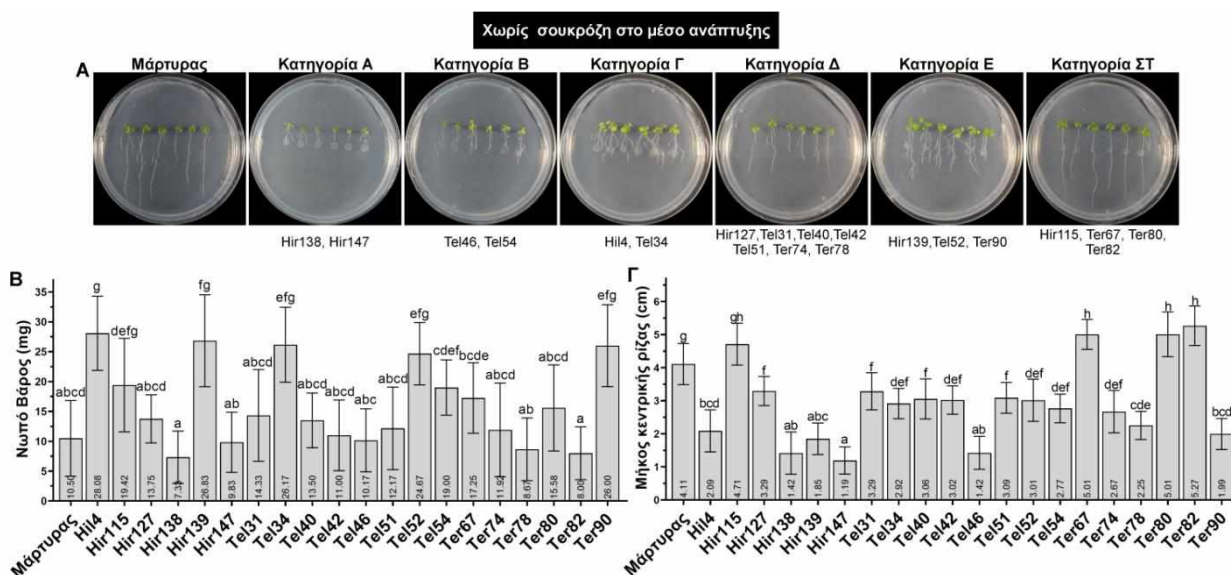
Tel51 (*B. cereus* group) καθώς και το Hir115 (κλάδος *B. licheniformis*). Όσον αφορά το νωπό βάρος των φυτών (Εικόνα 4.13B), οι μεγαλύτερες τιμές παρατηρήθηκαν από τα στελέχη Tel52, Hir139, Hir115 και Tel51. Τα στελέχη που προκάλεσαν το μικρότερο μήκος κεντρικής ρίζας ήταν το Hir147 (*Bacillus* sp.), το οποίο προκάλεσε καχεκτικό φαινότυπο στα φυτά, τα Hir139, Tel52, Ter90 (*Bacillus* sp.) καθώς και το Ter78 (*Pseudomonas* sp.) οποία προκάλεσαν την αύξηση των διακλαδώσεων της ρίζας και του φυλλώματος, οδηγώντας σε υψηλό νωπό βάρος. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι οι μεγαλύτερες τιμές νωπού βάρους φυτών παρατηρήθηκαν στα φυτά που εμβολιάστηκαν με τα στελέχη Tel52 και Hir139 τα οποία προκάλεσαν πολύ κοντή ρίζα, αλλά έντονα ανεπτυγμένο φύλλωμα.



Εικόνα 4.13 Η επίδραση βακτηριακών στελεγχών στην ανάπτυξη φυτών *A. thaliana* Col-0 μετά τον εμβολιασμό τους στο ακρορρίζιο του φυτού και ανάπτυξη σε στερεό θρεπτικό μέσο ½ MS σε *in vitro* συνθήκες. Φυτάρια *A. thaliana* 6 ημερών μεταφύτευτηκαν σε στερεό θρεπτικό μέσο ½ MS με 0.5% (w/v) σουκρόζη και ακολούθησε εμβολιασμός με 5 μl βακτηριακής καλλιέργειας (10^8 CFU/ml) στο ακρορρίζιο. Τα τρυβλία επωάστηκαν σε θάλαμο ανάπτυξης (16: 8 φωτοπερίοδος, 22 ± 1 °C, 50-60% σχετική υγρασία) για άλλες 10 ημέρες. (A) Αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες των διαφορετικών κατηγοριών ανάλογα με την αρχιτεκτονική του ριζικού συστήματος, (B) Νωπό βάρος φυταρίων (mg), (Γ) Μήκος κεντρικής ρίζας φυταρίων (cm). Μεταχειρίσεις με το ίδιο γράμμα δεν έχουν στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0.05$) σύμφωνα με την post hoc ανάλυση Tukey που ακολούθησε την ανάλυση One-way ANOVA για τους μέσους όρους. Οι ράβδοι αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο των συνόλων των φυτών που αναλύθηκαν για κάθε μεταχείριση ($n=12$), ο οποίος αναγράφεται μέσα σε κάθε ράβδο, ενώ οι κάθετες μπάρες υποδεικνύουν την τυπική απόκλιση του μέσου όρου.

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε εμβολιασμός των στελεγχών στο ακρορρίζιο των φυταρίων αλλά σε μέσο που δεν περιέχει σουκρόζη, ώστε τα βακτήρια να αξιοποιήσουν κυρίως τα ριζικά εκκρίματα της ρίζας. Ανάλογα με το φαινότυπο των φυτών μετά το πέρας του πειράματος, τα στελέχη ταξινομήθηκαν σε 6 κατηγορίες (Εικόνα 4.14A). Αρχικά, παρατηρήθηκε πως τα φυτά του μάρτυρα είναι λιγότερο αναπτυγμένα σε σύγκριση με τα φυτά του μάρτυρα στο μέσο όπου υπήρχε σουκρόζη (Εικόνα 4.13A). Στην πρώτη κατηγορία τα φυτά ήταν καχεκτικά, καθώς δεν αναπτύχθηκαν καθόλου μετά τη μεταφύτευση τους στο μέσο και εδώ ανήκουν τα στελέχη Hir147 και Hir138. Η κατηγορία Β αποτελείται από τα στελέχη Tel46 και Tel54, με φυτά που ήταν λίγο πιο ανεπτυγμένα από την προηγούμενη κατηγορία. Στην κατηγορία Γ ανήκουν τα στελέχη Hil4, Tel34, Tel54 και τα φυτάρια αποτελούνταν από κοντή διακλαδισμένη ρίζα και πιο ανεπτυγμένο φύλλωμα σε σχέση με το μάρτυρα. Η κατηγορία Δ αποτελείται από φυτά με εικόνα παρόμοια με αυτή του μάρτυρα, με διαφορά το

μικρότερο μήκος ρίζας και τα στελέχη που ανήκουν σε αυτή είναι τα *Bacillus* spp. Hir127, Tel40, Tel42, Tel51, Ter74 και *Pseudomonas* spp. Tel31, Ter78. Τα φυτά της κατηγορίας Ε είναι τα πιο ανεπτυγμένα σε σχέση με τις υπόλοιπες κατηγορίες και το μάρτυρα, καθώς έχουν μετρίου μήκους ρίζα με έντονες διακλαδώσεις και ανεπτυγμένο φύλλωμα, ενώ τα στελέχη που ανήκουν σε αυτή είναι τα Hir139 και Tel52 (κλάδος *B. amyloliquefaciens*), καθώς και το Ter90 (κλάδος *B. subtilis*). Τέλος, ο φαινότυπος της κατηγορίας ΣΤ ήταν ίδιος με το φαινότυπο του μάρτυρα και τα στελέχη που την απαρτίζουν είναι το Hir115 (κλάδος *B. licheniformis*) και τα Ter67, Ter80, Ter82 (*Pseudomonas* spp.). Τα στελέχη που προσέδωσαν μεγαλύτερο νωπό βάρος στα φυτά ήταν τα Hil4, Hir139, Tel34, Tel52 και Ter90 (Εικόνα 4.14B). Τα στελέχη με το μικρότερο μήκος κεντρικής ρίζας ήταν τα Hir147, Hir138, Tel46 τα οποία προκάλεσαν καχεκτικό φαινότυπο στα φυτά, καθώς και τα Hil4, Hir139, Ter90 τα οποία προκάλεσαν την αύξηση των διακλαδώσεων της ρίζας και του φυλλώματος, οδηγώντας σε υψηλό νωπό βάρος.

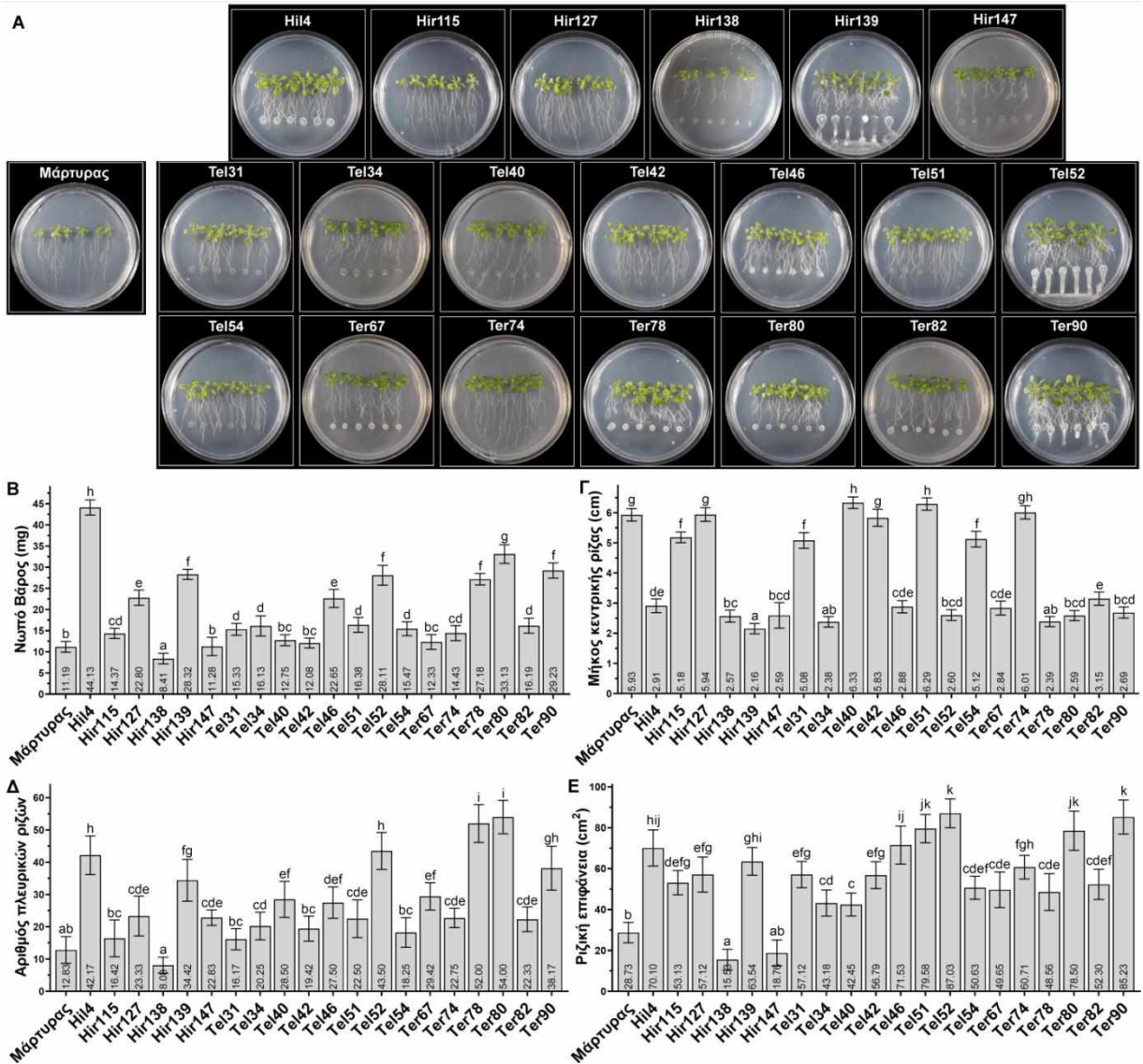


Εικόνα 4.14 Η επίδραση βακτηριακών στελεχών στην ανάπτυξη φυτών *A. thaliana* Col-0 μετά τον εμβολιασμό τους στο ακρορρίζιο του φυτού και ανάπτυξη σε στερεό θρεπτικό μέσο ½ MS σε *in vitro* συνθήκες. Φυτάρια *A. thaliana* 4 ημερών μεταφύτευτηκαν σε στερεό θρεπτικό μέσο ½ MS, όπου αναπτύχθηκαν για 2 ημέρες και ακολούθησε εμβολιασμός με 5 μl βακτηριακής καλλιέργειας (10^8 CFU/ml) στο ακρορρίζιο. Τα τρυβλία επώαστηκαν σε θάλαμο ανάπτυξης (16: 8 φωτοπερίοδος, 22 ± 1 °C, 50-60% σχετική υγρασία) για άλλες 10 ημέρες. (Α) Αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες των διαφορετικών κατηγοριών ανάλογα με την αρχιτεκτονική του ριζικού συστήματος, (Β) Νωπό βάρος φυταρίων (mg), (Γ) Μήκος κεντρικής ρίζας φυταρίων (cm). Μεταχειρίσεις με το ίδιο γράμμα δεν έχουν στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0.05$) σύμφωνα με την post hoc ανάλυση Tukey που ακολούθησε την ανάλυση One-way ANOVA για τους μέσους όρους. Οι ράβδοι αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο του συνόλου των φυτών που αναλύθηκαν για κάθε μεταχείριση ($n=12$), ο οποίος αναγράφεται μέσα σε κάθε ράβδο, ενώ οι κάθετες μπάρες υποδεικνύουν την τυπική απόκλιση του μέσου όρου.

Σε γενικές γραμμές, παρατηρείται πως τα στελέχη Hil4, Hir139, Tel34, Tel52, Tel54, Ter90 έδειξαν παρόμοια συμπεριφορά ανεξάρτητα από την παρουσία σουκρόζης στο θρεπτικό μέσο με αύξηση του νωπού βάρους, μείωση του μήκους της ρίζας και αύξηση των πλευρικών ριζών. Τα στελέχη *Pseudomonas* spp. (Tel31, Ter67, Ter78, Ter80, Ter82), τα στελέχη που πιθανώς ανήκουν στο *B. cereus* group (Tel40, Tel42, Tel51) καθώς και το Hir115 παρουσίασαν θετικό αντίκτυπο στα χαρακτηριστικά του φυτού μόνο στο μέσο που περιείχε σουκρόζη.

4.2.3.2 Εμβολιασμός του βακτηρίου σε απόσταση από τη ρίζα

Μία ακόμα εφαρμογή που πραγματοποιήθηκε ήταν ο εμβολιασμός των στελεχών σε απόσταση από το ακρορρίζιο των φυταρίων, όπου παρατηρήθηκαν διαφορετικοί φαινότυποι (Εικόνα 4.15Α). Με βάση τις φωτογραφίες φαίνεται πως τα στελέχη Hir14, Hir139, Tel46, Tel52, Ter78, Ter80, Ter90 προκάλεσαν τις πιο έντονες αλλαγές στο φύλλωμα και την αρχιτεκτονική της ρίζας των φυταρίων *A. thaliana*.



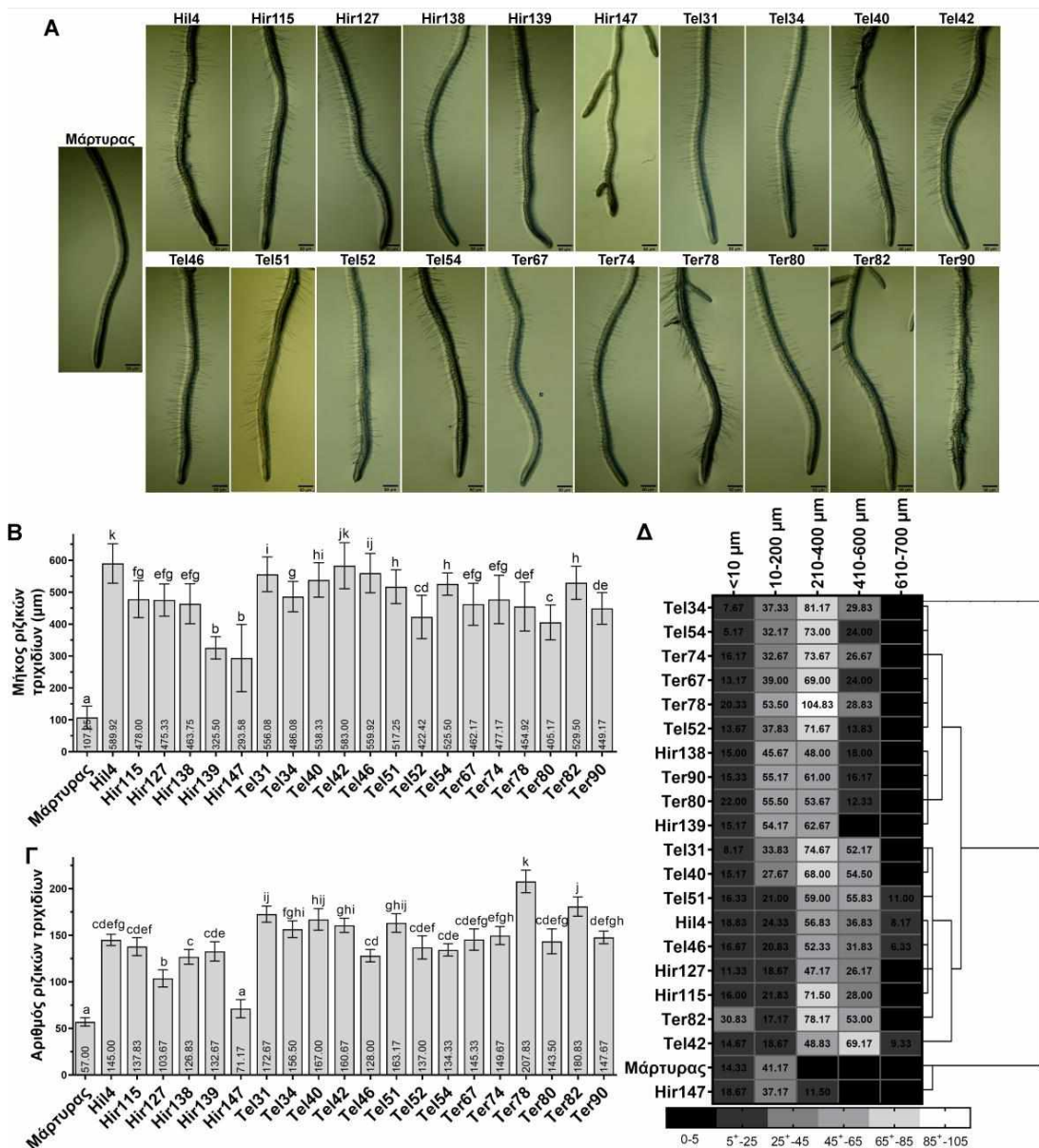
Εικόνα 4.15 Η επίδραση βακτηριακών στελεχών στην ανάπτυξη φυτών *A. thaliana* Col-0 μετά τον εμβολιασμό τους σε απόσταση από το ακρορρίζιο του φυτού και ανάπτυξη σε στερεό θρεπτικό μέσο ½ MS σε *in vitro* συνθήκες. Φυτάρια *A. thaliana* 4 ημερών μεταφυτεύθηκαν σε στερεό θρεπτικό μέσο ½ MS με 0.5% (w/v) σοκρόζη και ακολούθησε εμβολιασμός με 5 μl βακτηριακής καλλιέργειας (10^8 CFU/ml) σε απόσταση 3.5 cm. Τα τρυβλία επωάστηκαν σε θάλαμο ανάπτυξης (16: 8 φωτοπερίοδος, 22 ± 1 °C, 50-60% σχετική υγρασία) για άλλες 11 ημέρες. (Α) Αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες φυταρίων *A. thaliana*, (Β) Νωπό βάρος φυταρίων (mg), (Γ) Μήκος κεντρικής ρίζας φυταρίων (cm), (Δ) Αριθμός συνολικών πλευρικών ριζών των φυταρίων, (Ε) Ριζική επιφάνεια των φυταρίων (cm²). Μεταχειρίσεις με το ίδιο γράμμα δεν έχουν στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0.05$) σύμφωνα με την *post hoc* ανάλυση Tukey που ακολούθησε την ανάλυση One-way ANOVA για τους μέσους όρους. Οι ράβδοι αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο του συνόλου των φυτών που αναλύθηκαν για κάθε μεταχείριση ($n=12$), ο οποίος αναγράφεται μέσα σε κάθε ράβδο, ενώ οι κάθετες μπάρες υποδεικνύουν την τυπική απόκλιση του μέσου όρου.

Αύξηση του νωπού βάρους των φυταρίων παρατηρήθηκε με την εφαρμογή όλων των στελεχών εκτός των Hir147, Tel40, Tel42, Ter67 (Εικόνα 4.15B). Η μεγαλύτερη αύξηση παρατηρήθηκε με τη

χρήση του στελέχους Hil4 ακολουθούμενο από τα Ter80, Hir139, Tel52, Ter78, Ter90. Τα στελέχη που μείωσαν σημαντικά το μήκος της κεντρικής ρίζας (**Εικόνα 4.15Γ**) σε σύγκριση με το μάρτυρα με αύξουσα σειρά μήκους ήταν τα στελέχη Hir139, Tel34, Hir138, Hir147, Tel52, Tel46, Hil4, Ter78, Ter80, Ter90, Ter67. Τα στελέχη που οδήγησαν στην μεγαλύτερη αύξηση του αριθμού των πλευρικών ριζών (**Εικόνα 4.15Δ**) με φθίνουσα σειρά αριθμού ήταν τα Ter80, Ter78, Tel52, Hil4, Ter90, Hir139. Τέλος, η ριζική επιφάνεια των φυταρίων (**Εικόνα 4.15Ε**) αυξήθηκε σημαντικά συγκριτικά με το μάρτυρα ως απόρροια του εμβολιασμού των στελεχών Tel52, Ter90, Tel51, Ter80, Tel46 και Hil4 ακολουθούμενα από τα στελέχη Hir139, Ter74, Tel42, Hir127, Tel31, Hir115.

Έτσι, διαφαίνεται πως τα στελέχη Hir139 και Tel52 (κλάδος *B. amyloliquefaciens*), Ter90 (κλάδος *B. subtilis*), Hil4 (είδος *B. halotolerans*), καθώς και το Ter80 (*Pseudomonas* sp.) οδήγησαν σε μεγάλη μείωση του μήκους της κεντρικής ρίζας, με ταυτόχρονη αύξηση του αριθμού των πλευρικών ριζών και κατ'επέκταση της ριζικής επιφάνειας, μεγάλη αύξηση του νωπού βάρους και ανάπτυξη του φυλλώματος. Αντίθετα, τα στελέχη Tel42 και Tel51 (*B. cereus* group), Ter74 (*B. mycoides*), Hir127 (*Bacillus* sp.) και Tel31 (*Pseudomonas* sp.) αύξησαν τη ριζική επιφάνεια και τον αριθμό των πλευρικών ριζών περίπου 2 φορές συγκριτικά με το μάρτυρα, ενώ το μήκος της κεντρικής ρίζας και των πλευρικών ριζών διατηρήθηκε στα επίπεδα του μάρτυρα.

Στη συνέχεια, διερευνήθηκε η επίδραση των βακτηριακών στελεχών στα ριζικά τριχίδια των ακρορριζίων. Παρατηρήθηκε πως το κάθε στέλεχος επέδρασε διαφορετικά στο μήκος και τον αριθμό των τριχιδίων (**Εικόνα 4.16Α**). Όλα τα στελέχη που εξετάστηκαν αύξησαν σημαντικά το μήκος (**Εικόνα 4.16Β**), από 2 έως 5.5 φορές περίπου. Η μεγαλύτερη αύξηση επιτεύχθηκε από το στέλεχος Hil4 (5.5 φορές) ακολουθούμενο με φθίνουσα σειρά από τα Tel42, Tel46, Tel31, Ter82, Tel54, Tel40, Tel51 τα οποία αύξησαν το μήκος κατά περίπου 5 φορές, και τα Tel34, Hir115, Ter74, Hir127, Hir138, Ter67, Ter78, Ter90, Tel52, Ter80 τα οποία αύξησαν το μήκος κατά περίπου 4 φορές. Ακόμη, όλα τα στελέχη αύξησαν τον αριθμό των τριχιδίων (**Εικόνα 4.16Γ**) τουλάχιστον κατά 2 φορές, εκτός των στελεχών Hir147 και Hir127. Τη μεγαλύτερη αύξηση στον αριθμό των τριχιδίων, ίση ή μεγαλύτερη από 3 φορές συγκριτικά με το μάρτυρα, προκάλεσαν τα στελέχη Ter78, Ter82, Tel31, Tel51, Tel40, Tel42 και Tel34. Τα στελέχη που αύξησαν σημαντικά το μήκος αλλά και τον αριθμό των τριχιδίων ήταν τα Tel40, Tel42, Tel51 (*B. cereus* group), το Tel34 (κλάδος *B. pumilus*) και τα Tel31, Ter78, Ter82 (*Pseudomonas* spp.). Αξίζει να αναφερθεί εδώ πως τα στελέχη του *B. cereus* group δεν αύξησαν τη ριζική επιφάνεια όσο άλλα στελέχη, ωστόσο αύξησαν σημαντικά το μήκος και τον αριθμό των ριζικών τριχιδίων, γεγονός που συμβάλει στην αύξηση της διαθέσιμης ριζικής επιφάνειας. Η αύξηση του μέσου μήκους των ριζικών τριχιδίων στα στελέχη Hil4, Tel46, Tel42, Tel51 φαίνεται να οφείλεται στην ύπαρξη μικρού αριθμού τριχιδίων, σε σχέση με τα συνολικά, τα οποία είχαν ιδιαίτερα αυξημένο μήκος (610-700 μm), το οποίο δεν υπήρχε σε άλλες μεταχειρίσεις, ενώ τα στελέχη Tel42 και Tel51 είχαν αυξημένο αριθμό τριχιδίων και στην κατηγορία μήκους 410-600 μm (**Εικόνα 4.16Δ**). Ακόμα, στις μεταχειρίσεις των περισσότερων στελεχών τα ριζικά τριχίδια βρισκόνταν πιο κοντά στο άκρο της ρίζας, απ' ό,τι στη μεταχείριση του μάρτυρα.

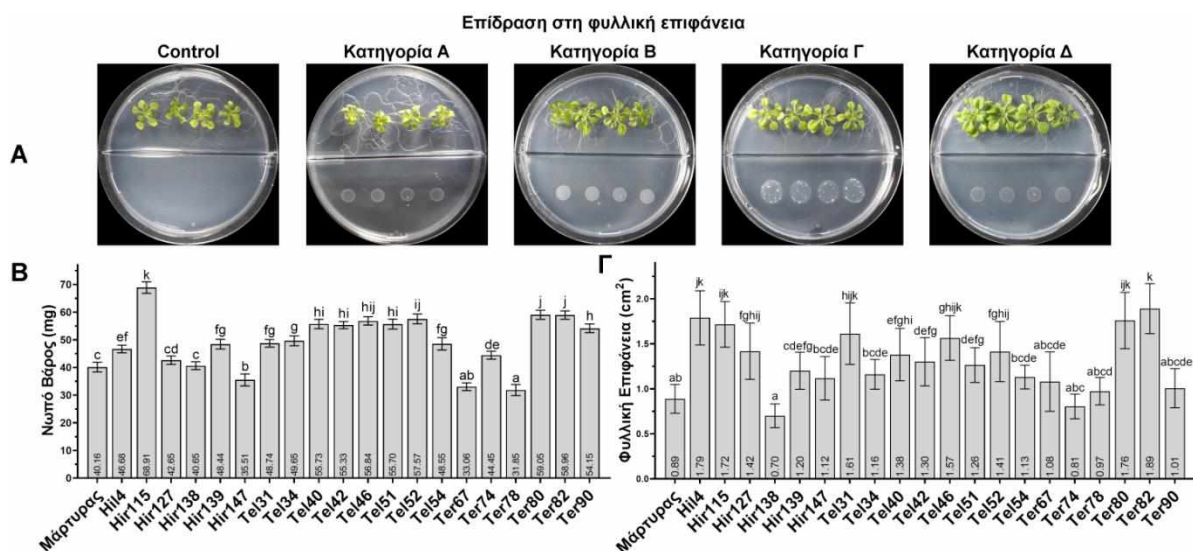


Εικόνα 4.16 Η επίδραση βακτηριακών στελεχών στα χαρακτηριστικά των ριζικών τριχιδίων στο ακρορρίζιο της κεντρικής ρίζας φυτών *A.thaliana* μετά τον εμβολιασμό τους σε απόσταση από το ακρορρίζιο του φυτού και ανάπτυξη σε στερεό θρεπτικό μέσο 1/2 MS σε *in vitro* συνθήκες. Φυτάρια *A. thaliana* 4 ημερών μεταφυτεύτηκαν σε στερεό θρεπτικό μέσο 1/2 MS με 0.5% (w/v) σουκρόζη και ακολούθησε εμβολιασμός με 5 µl βακτηριακής καλλιέργειας (10^8 CFU/ml) σε απόσταση 3.5 cm. Τα τρυβλία επωάστηκαν σε θάλαμο ανάπτυξης (16: 8 φωτοπερίοδος, 22 ± 1 °C, 50-60% σχετική υγρασία) για άλλες 10 ημέρες. Στις αναλύσεις συμπεριλήφθηκαν τα ριζικά τριχίδια σε απόσταση έως και 50 mm από το ακρορρίζιο για 6 φυτά συνολικά. (A) Αντιπροσωπευτικές στερεοσκοπικές φωτογραφίες της κεντρικής ρίζας για κάθε μεταχείριση (κλίμακα=50 µm), (B) Μήκος (µm) των ριζικών τριχιδίων του ακρορριζίου για κάθε μεταχείριση (n=120), (C) Αριθμός των ριζικών τριχιδίων του ακρορριζίου για κάθε μεταχείριση (n=6), (D) Heatmap που απεικονίζει με χρωματική κλίμακα διαβάθμισης τον μέσο αριθμό των ριζικών τριχιδίων για κάθε κατηγορία μήκους (n=6) συνδυασμένο με δένδρογραμμα από ανάλυση ιεραρχικής ομαδοποίησης (hierarchical clustering). Μεταχειρίσεις με το ίδιο γράμμα δεν έχουν στατιστικά σημαντική διαφορά ($p<0.05$) σύμφωνα με την post hoc ανάλυση Games-Howell που ακολούθησε την ανάλυση Welch ANOVA για τους μέσους όρους. Οι ράβδοι αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο του συνόλου των φυτών που αναλύθηκαν για κάθε μεταχείριση, ο οποίος αναγράφεται μέσα σε κάθε ράβδο, ενώ οι κάθετες μπάρες υποδεικνύουν την τυπική απόκλιση του μέσου όρου.

4.2.3.3 Εμβολιασμός του βακτηρίου σε διαφορετικό διαμέρισμα του τρυβλίου (I plate)

Επόμενη εφαρμογή των βακτηρίων ήταν ο εμβολιασμός σε διαφορετικό διαμέρισμα σε τρυβλίο που διαθέτει κεντρικό χώρισμα (I plate) με σκοπό την διερεύνηση της προώθησης της ανάπτυξης μέσω πηκτικών ενώσεων. Με βάση τη φυλλική επιφάνεια των φυτών δημιουργήθηκαν 4 κατηγορίες φαινοτύπων (Εικόνα 4.17A). Μεγαλύτερη επίδραση στο νωπό βάρος των φυτών (Εικόνα 4.17B)

είχαν τα στελέχη Hir115, Ter80, Ter82, Tel52, Ter90 με αύξηση 1.3 έως 1.5 φορές, ενώ μεγαλύτερη επίδραση στη φυλλική επιφάνεια είχαν τα στελέχη Ter82 και Hil4 με αύξηση περίπου 2 φορές, ακολουθούμενα από τα στελέχη Ter80 και Hir115. Φαίνεται πως τα στελέχη Hir115 και Ter80 είχαν τη μεγαλύτερη επίδραση και στα δύο χαρακτηριστικά που εξετάστηκαν.

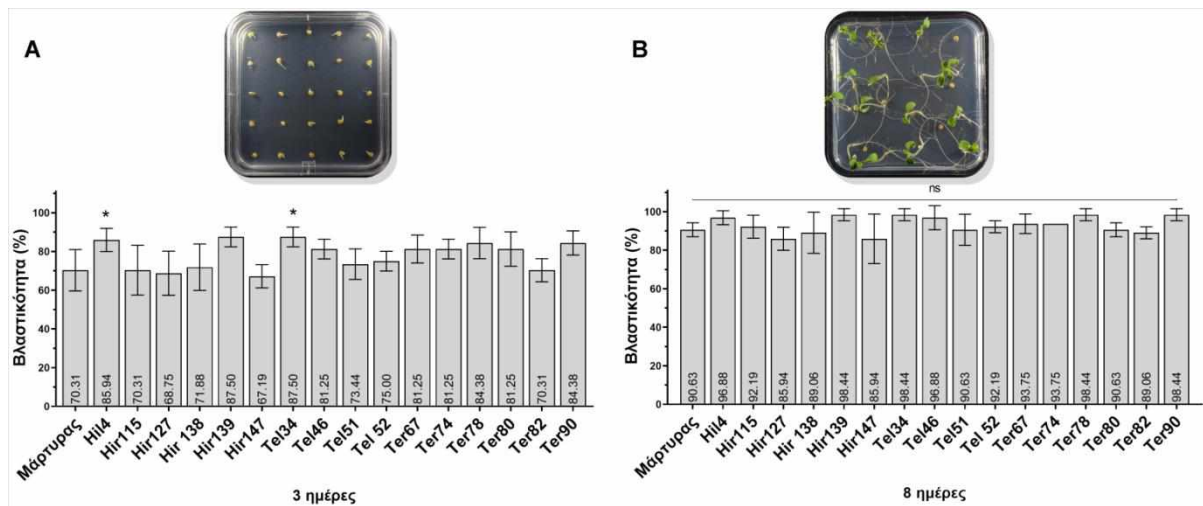


Εικόνα 4.17 Η επίδραση βακτηριακών στελεχών στην ανάπτυξη φυτών *A.thaliana* Col-0 μετά τον εμβολιασμό τους σε διαφορετικό διαμέρισμα του τρυβλίου που διαθέτει κεντρικό χώρισμα (I plate) και ανάπτυξη *in vitro* συνθήκες. Ο εμβολιασμός των βακτηρίων πραγματοποιήθηκε με τη μορφή τεσσάρων κηλίδων των 20 μ l, στο στάδιο του σπόρου. Τα τρυβλία επώαστηκαν σε θάλαμο ανάπτυξης (16: 8 φωτοπερίοδος, 22 ± 1 °C, 50-60% σχετική υγρασία) για 25 ημέρες. (Α) Αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες για τις κατηγορίες των φαινοτύπων της φυλλικής επιφάνειας που παρατηρήθηκαν, (Β) Νοπό βάρος φυταρίων (mg), (Γ) Φυλλική επιφάνεια των φυταρίων (cm^2). Μεταχειρίσεις με το ίδιο γράμμα δεν έχουν στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0.05$) σύμφωνα με την post hoc ανάλυση Tukey που ακολούθησε την ανάλυση One-way ANOVA για τους μέσους όρους. Οι ράβδοι αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο του συνόλου των φυτών που αναλύθηκαν για κάθε μεταχείριση ($n=10$), ο οποίος αναγράφεται μέσα σε κάθε ράβδο, ενώ οι κάθετες μπάρες υποδεικνύουν την τυπική απόκλιση του μέσου όρου.

4.2.4 Διερεύνηση *in vitro* προώθησης της ανάπτυξης του φυτού *Solanum lycopersicum* var. Chondrokatsari Messinias

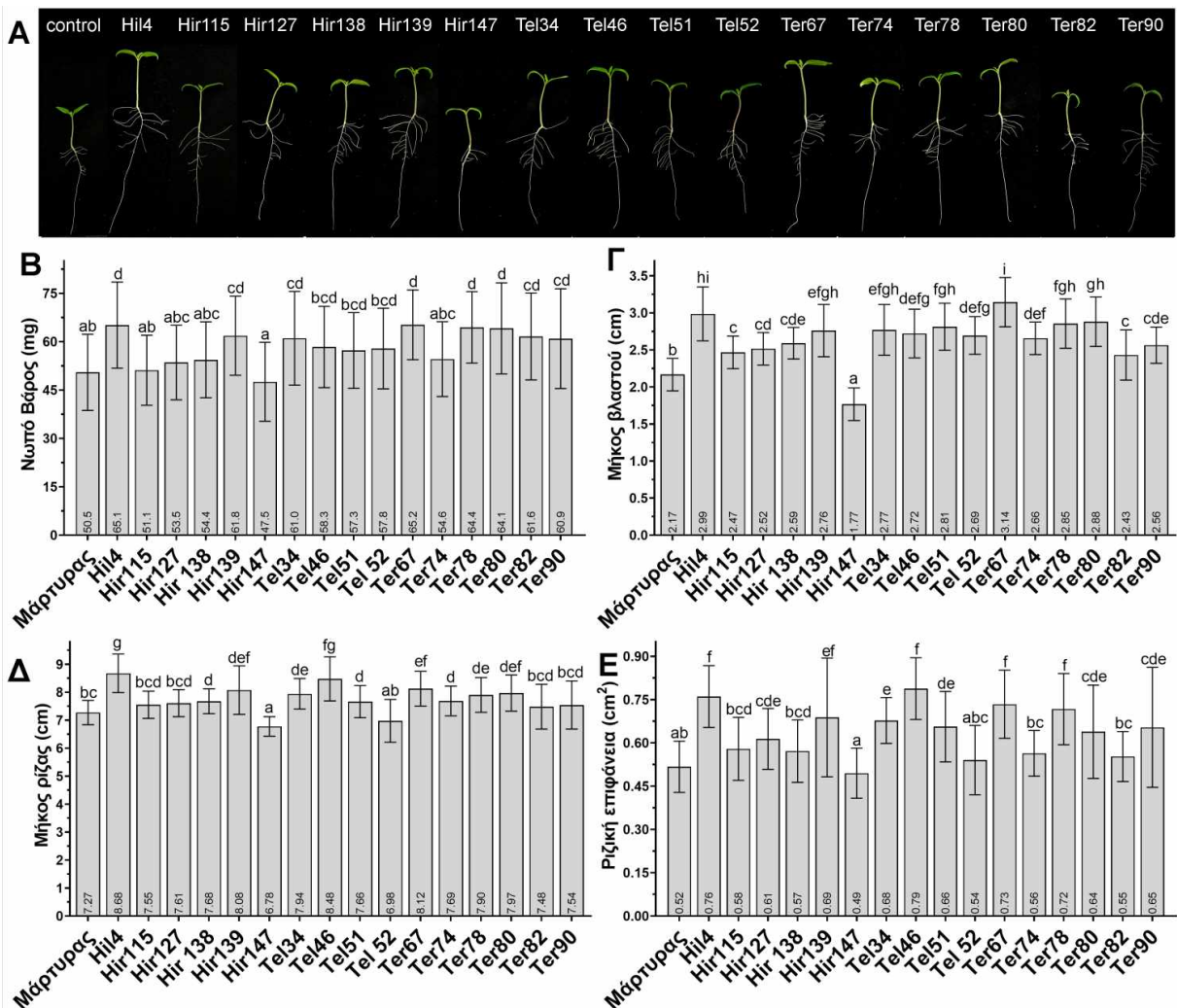
Το φυτό *A. thaliana* θεωρείται φυτό-μοντέλο και ιδανικό για γρήγορη συγκριτική αξιολόγηση, ωστόσο είναι αναγκαίο να πραγματοποιηθεί διερεύνηση της επίδρασης των μικροβίων και σε ένα φυτό οικονομικής σημασίας, όπως είναι η τομάτα. Για τη δοκιμή υτή χρησιμοποιήθηκε ποικιλία τομάτας Χονδροκατσαρή Μεσσηνίας (*Solanum lycopersicum* var. Chondrokatsari Messinias). Η μέθοδος εφαρμογής των βακτηρίων στην τομάτα έγινε με διαφορετικό, πιο εμπορικό τρόπο, και συγκεκριμένα με βιοδιέγερση του σπόρου (seed biopriming) με τη βοήθεια συγκολλητικού παράγοντα, ενώ η ανάπτυξη των φυτών πραγματοποιήθηκε σε *in vitro* συνθήκες.

Αρχικά, μελετήθηκε η βλαστικότητα των σπόρων στις 3 (Εικόνα 4.18Α) και τις 8 ημέρες (Εικόνα 4.18Β). Στις 3 ημέρες μόνο τα στελέχη Hil4 και Tel34 βελτίωσαν τη βλαστικότητα με στατιστικά σημαντική διαφορά από το μάρτυρα, ενώ στις 8 ημέρες οι τιμές βλαστικότητας ήταν παρόμοιες για όλα τα στελέχη και το μάρτυρα. Έτσι, διαφάνηκε η ικανότητα των δύο στελεχών να προωμίζουν την έκπτυξη του φυταρίου από το σπόρο.



Εικόνα 4.18 Η επίδραση βακτηριακών στελεχών στη βλαστικότητα σπόρων *Solanum lycopersicum* ποικ. Χονδροκατσαρή Μεσσηνίας μετά τη βιοδιέγερση του σπόρου και την ανάπτυξη σε *in vitro* συνθήκες. Σπόροι τομάτας μετά τη βιοδιέγερση με εναιωρήματα βακτηριακών στελεχών (10^8 CFU/ml) με τη βοήθεια του συγκολλητικού παράγοντα CMC (1%), τοποθετήθηκαν σε τρυβλία που περιείχαν θρεπτικό υλικό $\frac{1}{2}$ MS και 0.8% (w/v) αγαρ, επώαστηκαν 3 ημέρες στο σκοτάδι και άλλες 5 ημέρες σε θάλαμο ανάπτυξης φυτών στους 25 °C. (A) Αντιπροσωπευτική εικόνα του πειράματος και βλαστικότητα (%) μετά από 3 ημέρες επώασης στο σκοτάδι στους 25 °C, (B) Αντιπροσωπευτική εικόνα του πειράματος και βλαστικότητα (%) μετά από 5 ημέρες επιπλέον επώασης σε θάλαμο ανάπτυξης στους 25 °C (σύνολο 8 ημέρες). Στατιστική διαφορά ($p < 0.05$) με τη μεταχείριση του μάρτυρα υποδεικνύεται με αστερίσκο (*), σύμφωνα με την *post hoc* ανάλυση Dunnett's που ακολούθησε την ανάλυση One-way ANOVA για τους μέσους όρους των τιμών μετά από μετασχηματισμό των ποσοστών σε arcsine ή logit τιμές. Οι ράβδοι αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο του ποσοστού βλαστικότητας 4 επαναλήψεων με 16 σπόρους ($n=4$), ο οποίος αναγράφεται μέσα σε κάθε ράβδο, ενώ οι κάθετες μπάρες υποδεικνύουν την τυπική απόκλιση του μέσου όρου.

Μετά τη δοκιμή βλαστικότητας, ακολούθησε η διερεύνηση των χαρακτηριστικών των φυταρίων 8 ημερών (Εικόνα 4.19). Το κάθε στέλεχος επηρέασε διαφορετικά τη μορφολογία του φυτού (Εικόνα 4.19A). Στατιστικά σημαντική αύξηση στο νωπό βάρος (Εικόνα 4.19B) προκλήθηκε από όλα τα στελέχη, εκτός των Hir115, Hir127, Hir138, Hir147 και Ter74, ενώ τη μεγαλύτερη αύξηση (≥ 10 mg) προκάλεσαν τα στελέχη Ter67, Hil4, Ter78, Ter80, Hir139, Ter82, Tel34, Ter90. Αύξηση του μήκους του βλαστού (Εικόνα 4.19Γ) προκάλεσαν όλα τα στελέχη εκτός του Hir147, ενώ η μεγαλύτερη αύξηση παρατηρήθηκε με τα Ter67, Hil4, Ter80, Ter78, Tel51, Tel34, Hir139. Επιμήκυνση της ρίζας (Εικόνα 4.19Δ) παρατηρήθηκε με τη χρήση των στελεχών Hil4, Ter67, Hir139, Ter80, Tel34, Ter78. Τέλος, αύξηση της ριζικής επιφάνειας (Εικόνα 4.19Ε) ως απόρροια επιμήκυνσης της κεντρικής ρίζας, αλλά και αύξηση του αριθμού και του μήκους των πλευρικών ριζών, παρατηρήθηκε από τα στελέχη Tel46, Hil4, Ter67, Ter78, Hir139 και Tel34. Έτσι, τα στελέχη Hil4 (είδος *B. halotolerans*), Tel34 (κλάδος *B. pumilus*), Hir139 (κλάδος *B. amyloliquefaciens*), όπως και τα Ter67 και Ter78 (*Pseudomonas* spp.) οδήγησαν σε σημαντική αύξηση του νωπού βάρους, μήκους βλαστού, μήκους ρίζας και επιφάνειας ρίζας. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι το στέλεχος Hir147 (*Paenibacillus* sp.) προκάλεσε μικρότερες τιμές συγκριτικά με το μάρτυρα σε όλα τα χαρακτηριστικά που εξετάστηκαν.



Εικόνα 4.19 Η επίδραση βακτηριακών στελεχών σε φυτά *S. lycopersicum* ποικ. chondrokatsari μετά τη βιοδιέγερση του σπόρου και την ανάπτυξη σε θρεπτικό μέσο ½ MS σε *in vitro* συνθήκες. Σπόροι τομάτας μετά τη βιοδιέγερση με εναιωρήματα βακτηριακών στελεχών (10^8 CFU/ml) με τη βοήθεια του συγκολλητικού παράγοντα CMC (1%), τοποθετήθηκαν σε τρυβλία που περιείχαν θρεπτικό υλικό ½ MS και 0.8% (w/v) αγαρ, επωάστηκαν 3 ημέρες στο σκοτάδι και άλλες 5 ημέρες σε θάλαμο ανάπτυξης φυτών σε αποστειρωμένα κλειστά διαφανή πλαστικά δοχεία στους 25 °C. (A) Αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες φυταρίων τομάτας 8 ημερών για κάθε μεταχείριση (όλες οι φωτογραφίες έχουν τραβηχτεί από το ίδιο ύψος), (B) Νεπό βάρος φυταρίων (mg), (Γ) Μήκος βλαστού φυταρίων (cm), (Δ) Μήκος ρίζας φυταρίων (cm), (E) Συνολική ριζική επιφάνεια φυταρίων (cm²). Μεταχειρίσεις με το ίδιο γράμμα δεν έχουν στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0.05$) σύμφωνα με την *post hoc* ανάλυση πολλαπλών συγκρίσεων Games-Howell που ακολούθησε την ανάλυση Welch ANOVA για τους μέσους όρους. Οι ράβδοι αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο του συνόλου των φυτών που αναλύθηκαν για κάθε μεταχείριση ($n=45$), ο οποίος αναγράφεται μέσα σε κάθε ράβδο, ενώ οι κάθετες μπάρες υποδεικνύουν την τυπική απόκλιση του μέσου όρου.

4.2.5 Διερεύνηση ικανότητας παρεμπόδισης φυτοπαθογόνων μυκήτων *in vitro* με τη μέθοδο της διπλής καλλιέργειας

Εκτός από την άμεση προώθηση, εξετάστηκε και η έμμεση προώθηση της ανάπτυξης των φυτών μέσω του βιολογικής αντιμετώπισης φυτοπαθογόνων μυκήτων σε *in vitro* συνθήκες με τη μέθοδο της διπλής καλλιέργειας (dual culture) και δύο διαφορετικές ποσότητες του βακτηρίου. Οι μύκητες που χρησιμοποιήθηκαν είναι σημαντικά φυτοπαθογόνα που καλύπτουν ένα ευρύ φάσμα ασθενειών προ- και μετασυλλεκτικά: *R. solani*, *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*, *Colletotrichum acutatum*, *Pythium debaryanum*, *Verticillium dahliae* και *Botrytis cinerea*. Αρχικά, τα στελέχη χωρίστηκαν σε κατηγορίες ανάλογα με τον τρόπο δράσης τους. Παρατηρήθηκαν οι εξής ομαδοποιήσεις: α) κάλυψη

της βακτηριακής αποικίας από το μύκητα (καμμία παρεμπόδιση) (Κ), β) επαφή στο μέτωπο συνάντησης (ΕΠ), γ) είσοδος του βακτηρίου στη μυκηλιακή αποικία (Ε), δ) ζώνη παρεμπόδισης (Ζ) (Πίνακας 4.10).

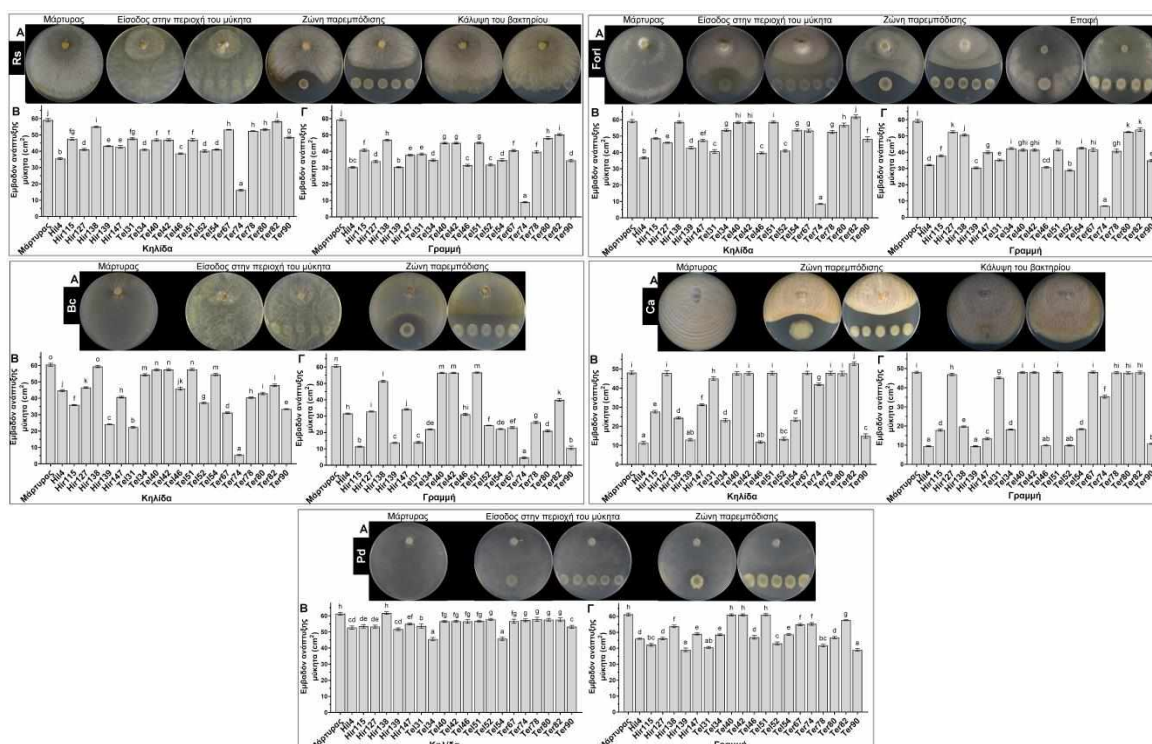
Πίνακας 4.10 Κατηγοριοποίηση των φαινοτύπων που παρατηρήθηκαν μετά από *in vitro* διπλή καλλιέργεια των βακτηρίων σε μορφή κηλίδας ή γραμμής κηλίδων με τους φυτοπαθογόνους μύκητες *Rhizoctonia solani* (Rs), *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersicum* (Forl), *Botrytis cinerea* (Bc), *Colletotrichum acutatum* (Ca), *Pythium debaryanum* (Pd). Οι κατηγορίες είναι οι εξής: Ζώνη παρεμπόδισης (Ζ), Είσοδος στην περιοχή του μύκητα (Ε), Επαφή (ΕΠ), Κάλυψη του βακτηρίου (Κ).

Στέλεχος	Γένος	Κατηγορία									
		Rs		Forl		Bc		Ca		Pd	
		κηλίδα	γραμμή	κηλίδα	γραμμή	κηλίδα	γραμμή	κηλίδα	γραμμή	κηλίδα	γραμμή
Hil4	<i>Bacillus</i>	Z	Z	Z	Z	Z	Z	Z	Z	Z	Z
Hir115	<i>Bacillus</i>	Z	Z	ΕΠ	ΕΠ	Z	Z	Z	Z	Z	Z
Hir127	<i>Bacillus</i>	Z	Z	Z	Z	Z	Z	Κ	Κ	Z	Z
Hir138	<i>Bacillus</i>	E	E	ΕΠ	ΕΠ	Z	Z	ΕΠ	ΕΠ	Z	Z
Hir139	<i>Bacillus</i>	Z	Z	Z	Z	Z	Z	Z	Z	Z	Z
Hir147	<i>Bacillus</i>	Z	Z	ΕΠ	ΕΠ	Z	Z	Z	Z	Z	Z
Tel31	<i>Pseudomonas</i>	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E
Tel34	<i>Bacillus</i>	E	E	E	E	Z	Z	ΕΠ	ΕΠ	E	E
Tel40	<i>Bacillus</i>	ΕΠ	ΕΠ	ΕΠ	ΕΠ	Z	Z	Κ	Κ	Z	Z
Tel42	<i>Bacillus</i>	ΕΠ	ΕΠ	ΕΠ	ΕΠ	Z	Z	Κ	Κ	Z	Z
Tel46	<i>Bacillus</i>	Z	Z	Z	Z	Z	Z	Z	Z	Z	Z
Tel51	<i>Bacillus</i>	ΕΠ	ΕΠ	ΕΠ	ΕΠ	Z	Z	Κ	Κ	Z	Z
Tel52	<i>Bacillus</i>	Z	Z	Z	Z	Z	Z	Z	Z	Z	Z
Ter67	<i>Pseudomonas</i>	E	E	E	E	Z	Z	Κ	Κ	Z	Z
Ter74	<i>Bacillus</i>	E	E	E	E	E	E	ΕΠ	ΕΠ	E	E
Ter78	<i>Pseudomonas</i>	E	E	E	E	Z	Z	Κ	Κ	E	E
Ter80	<i>Pseudomonas</i>	E	E	E	E	Z	Z	Κ	Κ	E	E
Ter82	<i>Pseudomonas</i>	E	E	E	E	Z	Z	Κ	Κ	E	E
Ter90	<i>Bacillus</i>	ΕΠ	Z	ΕΠ	Z	Z	Z	ΕΠ	ΕΠ	Z	Z

Παρατηρείται πως οι αλληλεπιδράσεις κάποιων συγκεκριμένων στελεχών με τους μύκητες έχουν ως αποτέλεσμα ένα είδος φαινοτύπου, ενώ άλλα στελέχη αλληλεπιδρούν διαφορετικά με τον κάθε μύκητα. Ακόμη, παρατηρήθηκε πως ο σχηματισμός ζώνης παρεμπόδισης είναι χαρακτηριστικό κυρίως των στελεχών *Bacillus* και *Paenibacillus* spp., και σε κάποια είναι ο μοναδικός τρόπος δράσης (π.χ. Hil4, Tel52). Τέλος, η έκβαση του αποτελέσματος της αλληλεπίδρασης του Ter90 με τους μύκητες *R. solani* και *F. oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici* φαίνεται να εξαρτάται από την ποσότητα του εμβολίου.

Αρκετά στελέχη ήταν αποτελεσματικά εναντίον των φυτοπαθογόνων μυκήτων σε *in vitro* συνθήκες (Εικόνα 4.20). Τα στελέχη που μείωσαν σημαντικά το εμβαδόν του μυκηλίου του *R. solani* όταν εμβολιάστηκαν ως κηλίδα ήταν τα Ter74, Hil4 και Tel46, ενώ ως γραμμή κηλίδων αποδείχτηκαν πολύ αποτελεσματικά και τα στελέχη Hir139, Tel52. Μεγάλη μείωση του εμβαδού ανάπτυξης του μύκητα *F. oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici* επέφεραν τα στελέχη Ter74, Hil4, Tel46 και Tel52, ενώ το στέλεχος Hir139 ήταν πολύ αποτελεσματικό όταν εμβολιάστηκε σε μεγαλύτερη ποσότητα. Στην περίπτωση του μύκητα *B. cinerea*, τα στελέχη Ter74, Ter90, Hir139, Tel31 επέφεραν ισχυρή παρεμπόδιση της ανάπτυξής του, καθώς και το Ter80 στην περίπτωση εμβολιασμού του σε

μεγαλύτερη ποσότητα. Μείωση του εμβαδού ανάπτυξης του μύκητα *C. acutatum* προκάλεσαν τα στελέχη Hil4, Hir139, Tel46, Tel52, Ter90, ενώ σε μεγαλύτερη ποσότητα πολύ αποτελεσματικά ήταν και τα Hir115, Tel34, Tel54. Τέλος, κανένα στέλεχος δεν ήταν ιδιαίτερα αποτελεσματικό στην παρεμπόδιση του *P. debaryanum*. Τα πιο ικανά στελέχη όσον αφορά την παρεμπόδιση της ανάπτυξης των μυκήτων ήταν τα Ter74, Hil4, Ter90, Hir139, Tel52. Το στέλεχος Ter74 καταλαμβάνει γρήγορα το χώρο του θρεπτικού μέσου και εισέρχεται στο μυκήλιο, ενώ τα υπόλοιπα σχηματίζουν ζώνη παρεμπόδισης. Γενικά, αποτελεσματικότερα φάνηκαν τα στελέχη που είχαν ως τρόπο δράσης το σχηματισμό ζώνης παρεμπόδισης, η οποία υποδεικνύει τη διάχυση αντιμυκητιακών ουσιών, με εξαίρεση το στέλεχος Ter74 που ήταν εξαιρετικά αποτελεσματικό με την είσοδο στο μυκήλιο.



Εικόνα 4.20 Δράση ενδοφυτικών βακτηριακών απομονώσεων εναντίον των φυτοπαθογόνων μυκήτων *Rhizoctonia solani* (Rs), *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici* (Forl), *Botrytis cinerea* (Bc), *Colletotrichum acutatum* (Ca) και *Pythium debaryanum* (Pd) σε θρεπτικό μέσο NA (1.5% αγαρ) μετά από επώαση 15 ημερών στους 25 °C. (A) Αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες των κατηγοριών που παρατηρήθηκαν στις αλληλεπιδράσεις των βακτηριακών στελεχών με τον εκάστοτε μύκητα, (B) Εμβαδόν ανάπτυξης (cm²) του μύκητα όταν βακτηριακή καλλιέργεια εμβολιάστηκε με τη μορφή κηλίδας, (Γ) Εμβαδόν ανάπτυξης μύκητα (cm²) όταν η βακτηριακή καλλιέργεια εμβολιάστηκε με τη μορφή γραμμής κηλίδων. Μεταχειρίσεις με το ίδιο γράμμα δεν έχουν στατιστικά σημαντική διαφορά (p<0.05) σύμφωνα με την post hoc ανάλυση Tukey's HSD που ακολούθησε την One-way ANOVA για τους μέσους όρους. Οι ράβδοι αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο 6 τρυβλίων, ενώ οι κάθετες μπάρες υποδεικνύουν την τυπική απόκλιση του μέσου όρου.

4.2.6 Σύνοψη-Επιλογή των καταλληλότερων στελεχών

Για να επιλεγούν τα καταλληλότερα βακτηριακά στελέχη από τις ενδοφυτικές απομονώσεις για περαιτέρω δοκιμές, λήφθηκαν υπ'όψιν όλα τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν έως αυτό το σημείο.

Τα στελέχη του γένους *Pseudomonas* φάνηκε πως έχουν την ικανότητα παραγωγής μεγαλύτερης ποσότητας ενώσεων που περιέχουν ινδόλιο και εντονότερης διαλυτοποίησης του ιζηματοποιημένου

φωσφόρου σε σχέση με τα στελέχη των γενών *Bacillus* και *Paenibacillus*, ενώ παράγουν σουλφατάσες σε αντίθεση με τα στελέχη των άλλων δύο γενών. Ακόμη, είχαν μεγάλη θετική επίδραση στη φυτική ανάπτυξη των φυτών *A. thaliana* και *S. lycopersicum* υπό τις συνθήκες που δοκιμάστηκαν. Ωστόσο, δεν είχαν ικανότητα ομαδικής κίνησης, είχαν περιορισμένη ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου και βιολογικής αντιμετώπισης *in vitro* συγκριτικά με τα στελέχη *Bacillus* spp., ενώ επίσης δεν παρήγαγαν ακετοΐνη. Η παραγωγή χιτινασών και επιφανειοδραστικών ενώσεων που μπορούν να ανιχνευθούν με τη μέθοδο drop collapse φάνηκε εντονότερη στα στελέχη του γένους *Bacillus*. Ακόμη, κάποια στελέχη *Bacillus* επηρέασαν πολύ θετικά τη φυτική ανάπτυξη και είχαν μεγάλη επίδραση στο ριζικό σύστημα, αλλά και στο φύλλωμα, σε όλες τις συνθήκες που εξετάστηκαν. Τα στελέχη που ανήκουν στο γένος *Pseudomonas* μπορούσαν να αναπτυχθούν κανονικά σε τιμές pH 5.5 και 8.5, ενώ τα στελέχη του γένους *Bacillus* εμφάνισαν υψηλή ανθεκτικότητα μόνο σε τιμές pH 5.5 και μέτρια ανθεκτικότητα σε pH 8.5. Σε χαμηλή θερμοκρασία πιο ανθεκτικά φάνηκαν τα στελέχη του γένους *Pseudomonas*, ενώ σε υψηλή θερμοκρασία τα στελέχη του γένους *Bacillus*. Τέλος, ανθεκτικά ή μέτρια ανθεκτικά στην υψηλή συγκέντρωση αλατότητας φάνηκαν τα στελέχη του γένους *Bacillus* και ιδιαίτερα εκείνα που πιθανώς ανήκουν στον κλάδο *B. amyloliquefaciens* και τα στελέχη που πιθανώς ανήκουν στο είδος *B. halotolerans*. Όσον αφορά το λειτουργικό κομμάτι φαίνεται πως τα βακτήρια του γένους *Bacillus* συνδυάζουν περισσότερα χαρακτηριστικά που προάγουν την ανάπτυξη των φυτών σε σχέση με τα βακτήρια του γένους *Pseudomonas*, ακόμα και αν κάποια από αυτά δεν είναι στα ίδια ποσοτικά επίπεδα, οπότε η περαιτέρω επιλογή έγινε μεταξύ αυτών των στελεχών.

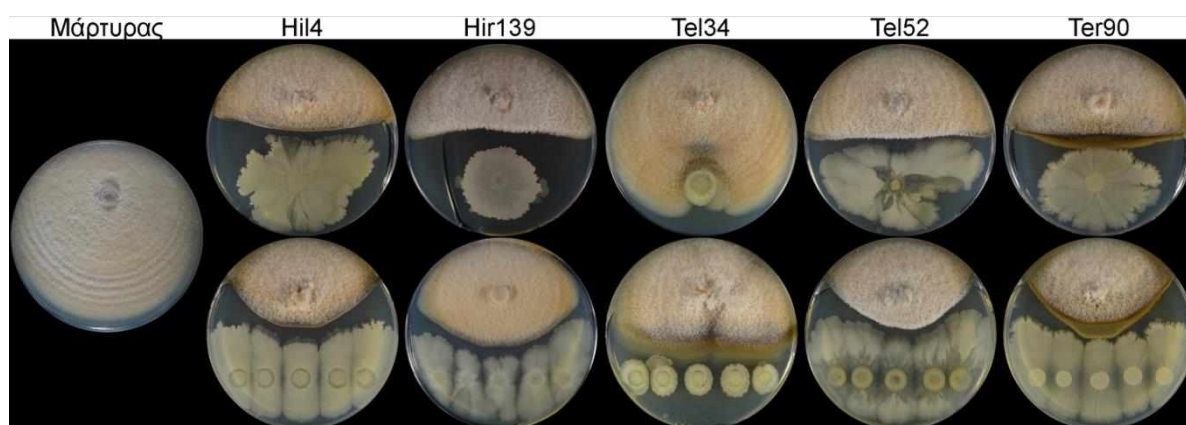
Από τα στελέχη του γένους *Bacillus* ξεχώρισαν τα στελέχη Hil4, το οποίο πιθανώς ανήκει στο είδος *B. halotolerans*, τα Hir139 και Tel52, που ανήκουν στον κλάδο *B. amyloliquefaciens*, το Tel34 που ανήκει στον κλάδο *B. pumilus* και το Ter90 που ανήκει στον κλάδο *B. subtilis* για το συνδυασμό κατοχής πολλών επιθυμητών χαρακτηριστικών προώθησης των φυτών και περιβαλλοντικής προσαρμογής, γρήγορης κινητικότητας, σχηματισμού βιοϋμενίου, αλλά και για την επίδρασή τους στην ανάπτυξη των φυτών ή/και την παρεμπόδιση φυτοπαθογόνων μυκήτων *in vitro*. Το πιο γρήγορο στέλεχος όσον αφορά την ομαδική κίνηση σε επιφάνειες και την κολυμβητική κίνηση ήταν το στέλεχος Tel34 ακολουθούμενο από το Tel52. Τα στελέχη με τη μεγαλύτερη ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου ήταν τα στελέχη Hir139, Tel52 και Ter90. Κατά την δοκιμή των στελεχών στο φυτό *A. thaliana* στην πρώτη διαλογή όπου χρησιμοποιήθηκε μεγαλύτερη συγκέντρωση κυττάρων και πιο υψηλή θερμοκρασία ώστε να ευνοηθεί η ανάπτυξη των βακτηρίων, το στέλεχος Tel34 παρουσίασε τους πιο εντυπωσιακούς φαινότυπους, με έντονη αύξηση της φυλλικής επιφάνειας και της πυκνότητας του ριζικού συστήματος όταν εμβολιάστηκε σε απόσταση από το ακρορρίζιο παρουσία σουκρόζης. Στα πειράματα της δεύτερης διαλογής, υπό φυσιολογικές συνθήκες ανάπτυξης και συγκέντρωσης κυττάρων, όταν ο εμβολιασμός πραγματοποιήθηκε στο ακρορρίζιο, παρατηρήθηκε πως τα Hil4, Hir139, Tel34, Tel52, Ter90 έδειξαν παρόμοια συμπεριφορά ανεξάρτητα από την παρουσία σουκρόζης στο θρεπτικό μέσο με αύξηση του νωπού βάρους, μείωση του μήκους της ρίζας και αύξηση των πλευρικών ριζών. Μετά τον εμβολιασμό των στελεχών σε απόσταση από τη ρίζα, διαφάνηκε πως, μεταξύ των στελεχών *Bacillus* spp. που εξετάστηκαν, τα στελέχη Hil4, Hir139, Tel52

και Ter90 οδήγησαν σε μεγάλη μείωση του μήκους της κεντρικής ρίζας, με ταυτόχρονη αύξηση του αριθμού των πλευρικών ριζών και κατ'επέκταση της ριζικής επιφάνειας, μεγάλη αύξηση του νωπού βάρους και ανάπτυξη του φυλλώματος. Τα στελέχη Hil4, Tel34, Tel52 και Ter90 προκάλεσαν έντονη αύξηση του μήκους των ριζικών τριχιδίων. Κατά τη δοκιμή επίδρασης στην τομάτα, τα στελέχη Hil4 και Tel34 ήταν τα μόνα που αύξησαν την βλαστικότητα στις 3 ημέρες μετά από βιοδιέγερση του σπόρου, ενώ μαζί με το Hir139 οδήγησαν σε σημαντική αύξηση του νωπού βάρους, μήκους βλαστού, μήκους ρίζας και επιφάνειας ρίζας, με το Hil4 να έχει τη μεγαλύτερη επίδραση από τα 3. Τέλος, όσον αφορά την παρεμπόδιση της ανάπτυξης των μυκήτων τα Hil4, Hir139, Tel52 και Ter90 ήταν ανάμεσα στα πιο ικανά στελέχη, ενώ εντύπωση προκάλεσε ο τρόπος δράσης του Tel34 εναντίον του *F. oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici*, αλλά και η ικανότητα παρεμπόδισης του φυτοπαθογόνου *C. acutatum*. Συνοψίζοντας, το στέλεχος Tel34 θεωρήθηκε ως ένα στέλεχος με εξαιρετικές ικανότητες άμεσης προώθησης της φυτικής ανάπτυξης *in vitro* και ήπια ικανότητα αντιμετώπισης φυτοπαθογόνων μυκήτων *in vitro*, ενώ τα υπόλοιπα φάνηκε να συνδυάζουν άμεση προώθηση της ανάπτυξης των φυτών και ικανότητα ισχυρής αντιμετώπισης φυτοπαθογόνων μυκήτων *in vitro*.

4.3 Περαιτέρω διερεύνηση της ικανότητας των επιλεγμένων βακτηριακών στελεχών στην αντιμετώπιση φυτοπαθογόνων μυκήτων *in vitro*

4.3.1 Δράση των στελεχών έναντι του φυτοπαθογόνου *Colletotrichum acutatum* σε διπλή καλλιέργεια *in vitro* και σε αποκομμένους καρπούς ελιάς

Ο μύκητας *C. acutatum* είναι ένας σημαντικός φυτοπαθογόνος μύκητας που προσβάλλει την ελιά. Τα 5 βακτηριακά στελέχη έδειξαν να ανταγωνίζονται το μύκητα κατά τη διπλή καλλιέργεια σε *in vitro* συνθήκες κατά το στάδιο επιλογής των καταλληλότερων στελεχών (Εικόνα 4.20, Εικόνα 4.21).



Εικόνα 4.21 Αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες φαινοτύπων αλληλεπίδρασης επιλεγμένων βακτηριακών στελεχών και του φυτοπαθογόνου μύκητα *Colletotrichum acutatum* μετά από διπλή καλλιέργεια (dual culture) 15 ημερών σε στερεό θρεπτικό μέσο NA στους 25°C. Ως βακτηριακό εμβόλιο χρησιμοποιήθηκε κηλίδα 10 μl ή γραμμική κηλίδα.

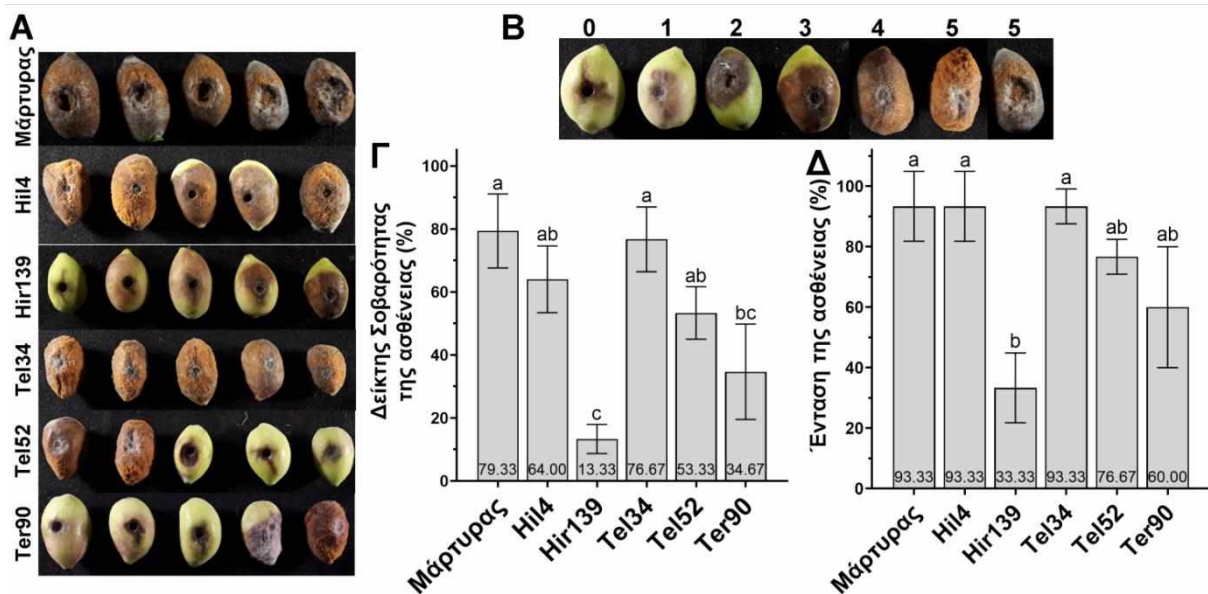
Έτσι, τα βακτηριακά στελέχη δοκιμάστηκαν σε καρπούς ελιάς εναντίον του φυτοπαθογόνου μύκητα *C. acutatum* που προκαλεί την ασθένεια ανθράκνωση. Συγκεκριμένα, καρποί ελιάς στο στάδιο ωρίμανσης 1 (κιτρινοπράσινο χρώμα) αποκόπηκαν από δέντρα ελιάς ποικιλίας Κορωνέικη (*Olea*

europaea var. *Koroneiki*) και εμβολιάστηκαν με βακτηριακά εναιωρήματα σε τεχνητή πληγή. Μετά το πέρας επώασης 36 ωρών προστέθηκε εμβόλιο του μύκητα στην ίδια πληγή και μετά από 5 ημέρες επώασης επιπλέον, αξιολογήθηκαν η συχνότητα εμφάνισης της ασθένειας και ο δείκτης σοβαρότητας της ασθένειας. Η κλίμακα διαβάθμισης της ασθένειας που χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό του δείκτη σοβαρότητας της ασθένειας προέρχεται από τους Moral και συνεργάτες (2008) (0=0% , 1= 0⁺-25%, 2= 25⁺-50%, 3= 50⁺-75%, 4= 75⁺-100%, 5= καρπός που φέρει έντονη σποριογένεση του παθογόνου ή καρπός που έχει υποστεί μουμιοποίηση και φέρει λευκά-γκρι μυκήλια).

Υπήρχε διαφορετική ένταση και σοβαρότητα της ασθένειας τόσο μεταξύ των στελεχών, όσο και μεταξύ των στελεχών και του μάρτυρα (**Εικόνα 4.22Α**). Υιοθετώντας τις τιμές της κλίμακας διαβάθμισης της ασθένειας από τους Moral και συνεργάτες (2008) (**Εικόνα 4.22Β**) υπολογίστηκε ο δείκτης σοβαρότητας της ασθένειας (**Εικόνα 4.22Γ**). Ο μάρτυρας, καθώς και το στέλεχος Tel34 είχαν σχεδόν όμοιους δείκτες, χωρίς στατιστικά σημαντική διαφορά. Ακολούθησαν τα στελέχη Hir4 και Tel52 με περίπου 15% και 26% μικρότερο δείκτη από τη μεταχείριση μάρτυρα, αντίστοιχα, χωρίς ωστόσο στατιστικά σημαντική διαφορά από αυτήν. Το στέλεχος Ter90 είχε διαφορά περίπου 45% με τη μεταχείριση του μάρτυρα και στατιστικά σημαντική διαφορά από αυτήν, υποδηλώνοντας πως είναι ένα αρκετά αποτελεσματικό στέλεχος για τη μείωση της σοβαρότητας της ασθένειας. Τέλος, το στέλεχος Hir139 ήταν το πιο αποτελεσματικό εκ των επιλεγμένων στελεχών, με δείκτη σοβαρότητας 13.33% και διαφορά από το μάρτυρα περίπου 57%, ενώ έδειξε στατιστικά σημαντική διαφορά από όλες τις μεταχειρίσεις εκτός της Ter90.

Όσον αφορά την ένταση της ασθένειας (%) (**Εικόνα 4.22Γ**), τα δεδομένα των στελεχών συνάδουν αρκετά με εκείνα του δείκτη σοβαρότητας. Συγκεκριμένα, η μεταχείριση του μάρτυρα και των στελεχών Tel34 και Hir4 είχαν ίδια τιμή έντασης της ασθένειας, ενώ τα στελέχη Tel52 και Ter90 είχαν περίπου 17% και 33% διαφορά με τη μεταχείριση του μάρτυρα, αντίστοιχα, χωρίς στατιστικά σημαντική διαφορά. Τέλος, το στέλεχος Hir139 είχε τιμή 33.33%, δηλαδή 60% διαφορά από τη μεταχείριση του μάρτυρα.

Συμπερασματικά, το στέλεχος Hir139 ήταν το πιο αποτελεσματικό στη μείωση της έντασης της ασθένειας, αλλά και του δείκτη σοβαρότητας της ασθένειας σε σύγκριση με τα υπόλοιπα στελέχη που δοκιμάστηκαν.



Εικόνα 4.22 Η δράση βακτηριακών στελεχών εναντίον της ανθράκωσης σε καρπούς ελιάς (ποικ. Κορωνέικη). Πληγή που προκλήθηκε στους καρπούς εμβολιάστηκε με 5 μl καλλιέργειας βακτηριακών στελεχών (10^8 CFU/ml), ακολούθησε επώαση για 36 ώρες στους 25°C και εμβολιασμός με 5 μl του φυτοπαθογόνου *C. acutatum* (10^5 σπόρια/ml). Η ασθένεια αξιολογήθηκε 5 ημέρες μετά τον εμβολιασμό του παθογόνου. (Α) Αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες καρπών για κάθε στέλεχος, (Β) Αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες καρπών για κάθε κλάση της κλίμακας διαβάθμισης της ασθένειας (0-5), (Γ) Δείκτης Σοβαρότητας της ασθένειας (%) που υπολογίστηκε με τη χρήση της κλίμακας διαβάθμισης (0-5), (Δ) Ένταση της ασθένειας (%) που υπολογίστηκε ως το ποσοστό μολυσμένων καρπών. Μεταχειρίσεις με το ίδιο γράμμα δεν έχουν στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0.05$) σύμφωνα με την post hoc ανάλυση Tukey's HSD που ακολούθησε την One-way ANOVA για τους μέσους όρους. Οι ράβδοι αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο 3 ανεξάρτητων επαναλήψεων με 10 καρπούς, ο οποίος αναγράφεται μέσα σε κάθε ράβδο, ενώ οι κάθετες μπάρες υποδεικνύουν την τυπική απόκλιση του μέσου όρου.

4.3.2 Επίδραση βακτηριακών καλλιεργειών και υπερκείμενου βακτηριακών καλλιεργειών στην ανάπτυξη του φυτοπαθογόνου μύκητα *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* κατά τη διπλή καλλιέργεια *in vitro*

Στην αρχική διαλογή των βακτηρίων όπου εξετάστηκε η ικανότητα τους να παράγουν βιοεπιφανειοδραστικές ενώσεις με τη μέθοδο drop collapse όλα τα επιλεγμένα στελέχη εκτός του Tel34 βρέθηκαν θετικά. Το Tel34 παρουσίασε μια ιδιαίτερη δράση όταν συγκαλλιεργήθηκε με το φυτοπαθογόνο όπου εισήλθε στη μυκηλιακή αποικία και κάλυψε τις υφές, ενώ η συγκαλλιέργεια των υπόλοιπων στελεχών με το φυτοπαθογόνο οδήγησε σε σχηματισμό ζώνης παρεμπόδισης. Έτσι, πραγματοποιήθηκε εξέταση του υπερκείμενου καλλιεργειών 48 ωρών ως προς την ικανότητα του να παρεμποδίζει την ανάπτυξη του μύκητα σε στερεό θρεπτικό μέσο και συγκρίθηκε με τη χρήση βακτηριακής καλλιέργειας.

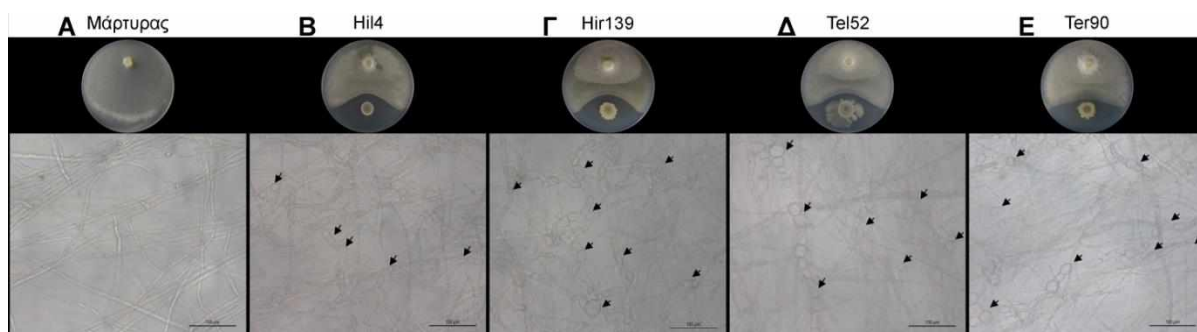
Το υπερκείμενο των καλλιεργειών κατάφερε να παρεμποδίσει την ανάπτυξη του φυτοπαθογόνου μύκητα υποδηλώνοντας την ύπαρξη αντιμυκητιακών διαχεόμενων ουσιών (Εικόνα 4.25). Ωστόσο, παρατηρείται η σταδιακή ανάπτυξη του φυτοπαθογόνου πέραν του σημείου εμβολιασμού του υπερκείμενου, σε αντίθεση με την περίπτωση όπου υπάρχουν ζώντα βακτηριακά κύτταρα. Αυτό πιθανόν συμβαίνει επειδή οι ενώσεις βιοδιασπώνται ενώ παρουσία του βακτηρίου παράγονται μεγάλες ποσότητες των αντιμικροβιακών ενώσεων με συνεχή ρυθμό.

Όσον αφορά το βακτήριο που χρησιμοποιήθηκε ως σύγκριση (Hir115), το οποίο σχηματίζει ζώνη παρεμπόδισης, αλλά το υπερκείμενο της καλλιέργειάς του είναι ανενεργό στη διπλή καλλιέργεια, αυτό μπορεί να οφείλεται στην παραγόμενη ποσότητα των ενώσεων, σε ένζυμα, διαχεόμενες ενώσεις που δεν εκκρίνονται στο υγρό μέσο καλλιέργειας ή πτητικές ενώσεις.



Εικόνα 4.23 Επίδραση καλλιέργειας και υπερκείμενου επιλεγμένων βακτηριακών ενδοφυτικών στελεχών στο φυτοπαθογόνο μύκητα *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici*. Στερεό εμβόλιο μύκητα τοποθετήθηκε απέναντι από πηγαδάκι που περιείχε 50 μl NB (μάρτυρας), βακτηριακής καλλιέργειας ή υπερκείμενου βακτηριακής καλλιέργειας 2 ημερών και ακολούθησε επώαση στους 25 °C για 8 ημέρες.

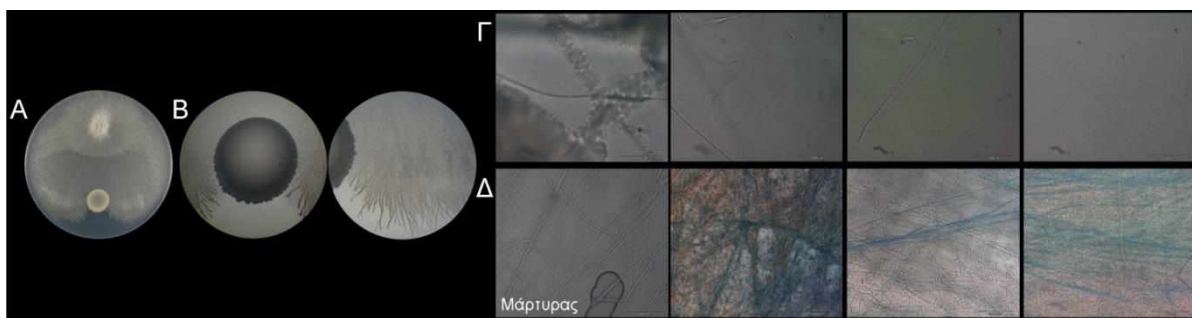
Τα 5 επιλεγμένα στελέχη παρουσιάζουν διαφοροποιήσεις στη μέθοδο δράσης τους έναντι του φουζαρίου. Συγκεκριμένα, τα στελέχη Hil4, Tel52, Ter90 και Hir139 είναι ικανά να παρεμποδίζουν την ανάπτυξη του φυτοπαθογόνου *F. oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici* με το σχηματισμό ζώνης παρεμπόδισης, ενώ το στέλεχος Tel34 μέσω επαφής. Έτσι, ενδιαφέρον θα παρουσίαζε η εξέταση της επίδρασης αυτών των βακτηρίων στη μορφολογία των υφών του *F. oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici* μετά από διπλή καλλιέργεια σε στερεό θρεπτικό μέσο ανάπτυξης (dual culture) με τη βοήθεια μικροσκοπίου. Παρατηρήθηκε πως τα στελέχη Hil4, Hir139, Tel52 και Ter90 προκάλεσαν αλλαγές στη μορφολογία των υφών του μύκητα και συγκεκριμένα διογκωμένες υφές και αυξημένο αριθμό κάθετων διαφραγμάτων (σέπτα), ενώ κανένα από αυτά τα χαρακτηριστικά δεν παρατηρήθηκαν στο μάρτυρα (**Εικόνα 4.24**).



Εικόνα 4.24 Αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες μακροσκοπικής και μικροσκοπικής παρατήρησης των υφών του φυτοπαθογόνου μύκητα *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* μετά από διπλή καλλιέργεια (dual culture) απουσία ή παρουσία βακτηριακού εμβολίου και επώαση 10 ημερών. (Α) Μάρτυρας (απουσία βακτηριακού εμβολίου), (Β) Βακτηριακό στέλεχος Hil4, (Γ) Βακτηριακό στέλεχος Tel52, (Δ) Βακτηριακό στέλεχος Ter90, (Ε) Βακτηριακό στέλεχος Hir139. Τα βέλη υποδεικνύουν παραμορφώσεις των υφών.

Όσον αφορά το στέλεχος Tel34, κατά τη διπλή καλλιέργεια με το φυτοπαθογόνο, η βακτηριακή αποικία ήρθε σε επαφή με τη μυκηλιακή αποικία και κάλυψε τις υφές (**Εικόνα 4.25A,B**). Κατά την εξέταση στο μικροσκόπιο, παρατηρήθηκε η πλήρης κάλυψη των υφών από τη βακτηριακή αποικία στο σημείο συνάντησής τους, ενώ βακτηριακά κύτταρα είχαν προχωρήσει μέσα στη μυκηλιακή αποικία όπου κύκλωναν τις υφές και πιθανώς σχημάτιζαν βιοϋμένιο (**Εικόνα 4.25Γ**). Μετά από χρώση των υφών με τη χρωστική ζωτικότητας Evans Blue, ανακαλύφθηκε πως πολλές από τις υφές

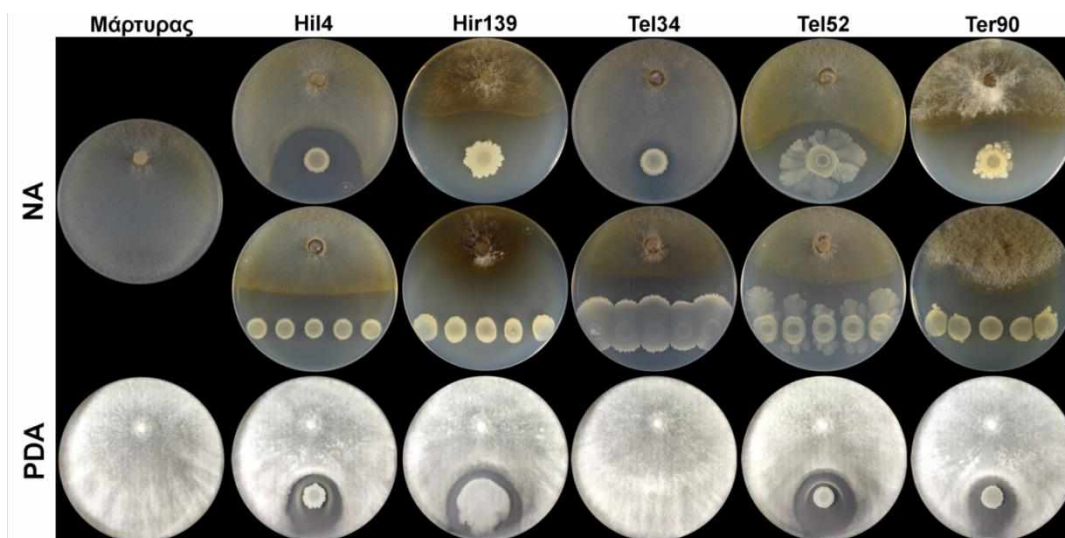
ήταν νεκρές (Εικόνα 4.25Γ), άρα το στέλεχος Tel34 έχει ανταγωνιστική δράση έναντι του φυτοπαθογόνου.



Εικόνα 4.25 Αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες μακροσκοπικής, στερεοσκοπικής και μικροσκοπικής παρατήρησης των υφών του φυτοπαθογόνου μύκητα *Fusarium oxysporum* fsp *lycopersici* μετά από διπλή καλλιέργεια με το βακτηριακό στέλεχος Tel34 και επώαση 10 ημερών. (Α) Μακροσκοπική φωτογραφία του φαινοτύπου, (Β) Στερεοσκοπικές φωτογραφίες του φαινοτύπου, (Γ) Φωτογραφίες μικροσκοπίου της αλληλεπίδρασης υφών και βακτηριακών κυττάρων, (Δ) Φωτογραφίες μικροσκοπίου από τη δοκιμή ζωτικότητας υφών.

4.3.3 Απομόνωση και ανάλυση ακατέργαστων εκχυλισμάτων από μονή βακτηριακή καλλιέργεια και συγκαλλιέργεια με *Botrytis cinerea* σε στερεό θρεπτικό υποστρώμα

Σε προηγούμενο κεφάλαιο είχε διερευνηθεί η αποτελεσματικότητα των επιλεγμένων στελεχών έναντι του φυτοπαθογόνου *B. cinerea* με τη μέθοδο της διπλής καλλιέργειας *in vitro* σε στερεό θρεπτικό μέσο ΝΑ. Όλα τα στελέχη έδειξαν ανταγωνιστική δράση με το σχηματισμό ζώνης παρεμπόδισης, με τη μεγαλύτερη παρεμπόδιση να ασκεί το στέλεχος Hir139 (Εικόνα 4.26). Η μικρότερη παρεμπόδιση παρατηρήθηκε από το στέλεχος Tel34 όταν αυτό εμβολιάζεται ως κηλίδα, ενώ η παρεμπόδιση βρέθηκε στα επίπεδα άλλων στελεχών όταν εμβολιάστηκε σε μεγαλύτερη ποσότητα, ως γραμμή κηλίδων (Εικόνα 4.26). Κατά τη δοκιμή σε θρεπτικό μέσο PDA, που ευνοεί την ανάπτυξη του μύκητα, σχηματίστηκε ζώνη παρεμπόδισης κατά τη διπλή καλλιέργεια του μύκητα με όλα τα στελέχη εκτός του Tel34. Ακόμη, παρατηρήθηκε ο σχηματισμός υπόλευκου ιζήματος στο σημείο της ζώνης παρεμπόδισης κοντά στη βακτηριακή αποικία (Εικόνα 4.26), με πιο έντονη την παρουσία στα στελέχη Hil4 και Tel52, ενώ δε φαίνεται να σχηματίστηκε κατά τη διπλή καλλιέργεια του μύκητα με το Ter90, υποδεικνύοντας την ύπαρξη δευτερογενών μεταβολιτών που καθιζάνουν.

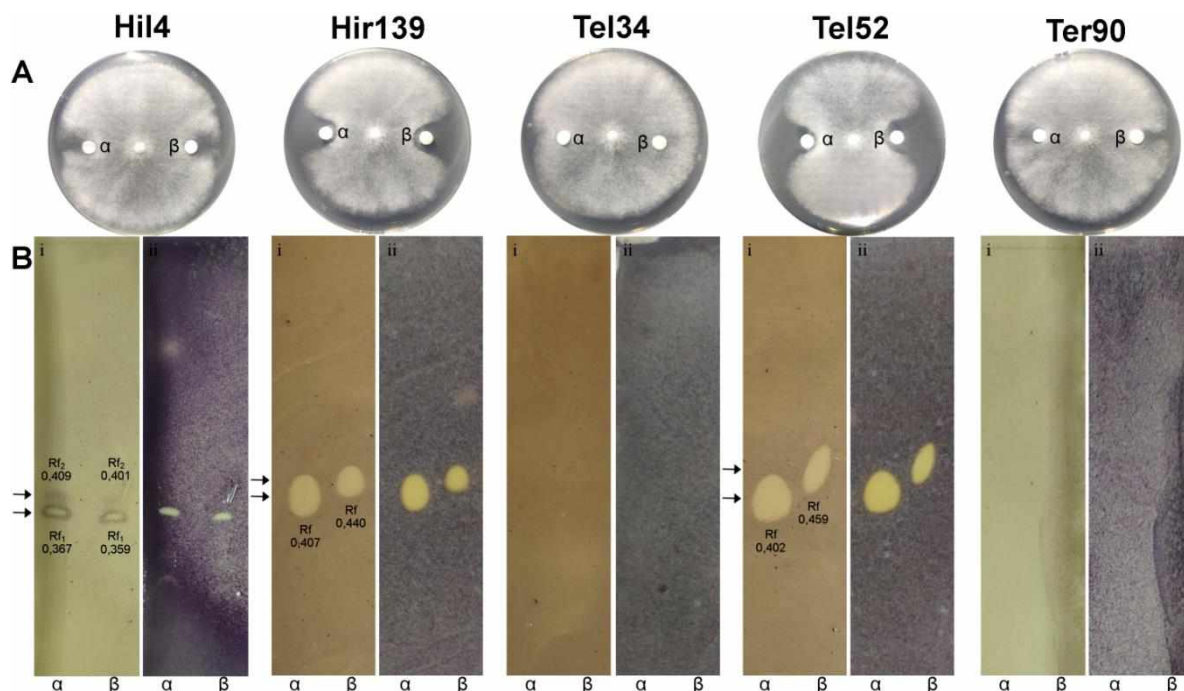


Εικόνα 4.26 Αντιπροσωπευτικές μακροσκοπικές και στερεοσκοπικές φωτογραφίες αλληλεπίδρασης επιλεγμένων βακτηριακών στελεχών και του φυτοπαθογόνου μύκητα *Botrytis cinerea* μετά από διπλή καλλιέργεια (dual culture) 15 ημερών σε στερεό θρεπτικό μέσο NA και PDA. Ως βακτηριακό εμβόλιο χρησιμοποιήθηκε κηλίδα 10 μ l ή γραμμή κηλίδων.

Με σκοπό να ταυτοποιηθούν οι αντιμυκητιακοί μεταβολίτες που εκκρίνονται από τα βακτηριακά κύτταρα και διαχέονται στο στερεό θρεπτικό μέσο κατά τη διπλή καλλιέργεια, πραγματοποιήθηκε διπλή καλλιέργεια των βακτηριακών στελεχών με το μύκητα *B. cinerea*, όπου αυξημένο βακτηριακό εμβόλιο τοποθετήθηκε σε πηγαδάκι. Μετά από επώαση 6 ημερών, η περιοχή της ζώνης παρεμπόδισης αποκόπηκε και έγινε προσπάθεια εκχύλισης των περιεχόμενων μεταβολιτών, και ιδιαίτερα των κυκλικών λιποπεπτιδίων, με οξικό αιθυλεστέρα (ethyl acetate). Παράλληλα, ζώνη θρεπτικού παρόμοιου μεγέθους με τη ζώνη παρεμπόδισης για το εκάστοτε βακτηριακό στέλεχος αποκόπηκε από αξενικές βακτηριακές καλλιέργειες για να διαπιστωθεί αν αντιμυκητιακοί μεταβολίτες παράγονταν ιδιосуστατικά (constitutively).

Στη συνέχεια, τα δύο ακατέργαστα εκχυλίσματα δοκιμάστηκαν έναντι του φυτοπαθογόνου μύκητα για να ελεγχθεί η βιοδραστικότητά τους και αναλύθηκαν με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) σε συνδυασμό με βιοαυτογραφία για να εντοπιστούν οι βιοδραστικές ενώσεις, αλλά και να ελεγχθεί αν τα δείγματα από τη μονή και τη διπλή καλλιέργεια ήταν παρόμοια. Όλα τα εκχυλίσματα, προερχόμενα από μονή ή διπλή καλλιέργεια, ήταν βιοδραστικά έναντι του μύκητα, σε λιγότερο ή μεγαλύτερο βαθμό, εκτός των εκχυλισμάτων του στελέχους Tel34 (Εικόνα 4.27A). Επίσης, το μοτίβο των βιοδραστικών ζωνών κάθε στελέχους ήταν ίδιο για το εκχύλισμα της διπλής και της μονής καλλιέργειας, υποδεικνύοντας τη συνεχή παραγωγή των ενώσεων χωρίς την ανάγκη σήματος από το φυτοπαθογόνο (Εικόνα 4.27B). Τα δείγματα του στελέχους Hil4 εμφάνισαν 2 βιοδραστικές ζώνες στη βιοαυτογραφία, οι οποίες με βάση το συντελεστή επιβράδυνσης (R_f) και τη βιβλιογραφία ανήκουν στην οικογένεια των ιουρινικών λιποπεπτιδίων. Τα δείγματα από τα στελέχη Tel52 και Hir139 εμφανίζουν μια μεγάλη ζώνη, ακόμα και σε μικρές ποσότητες εμβολιασμού στην πλάκα, η οποία μπορεί να περικλείει και 2 ζώνες που δεν μπορούν να διαχωριστούν λόγω μεγάλης συγκέντρωσης των ενώσεων. Οι τιμές R_f παραπέμπουν σε ενώσεις της οικογένειας των ιουρινών σύμφωνα με τη βιβλιογραφία. Τα δείγματα του στελέχους Tel34 δεν εμφάνισαν καμία βιοδραστική ζώνη, ακόμα και

σε μεγάλη ποσότητα κηλίδας, κάτι αναμενόμενο λόγω της απουσίας βιοδραστικότητας του εκχυλίσματος στη διπλή καλλιέργεια, ενώ τα δείγματα του στελέχους Ter90 ήταν βιοδραστικά στη διπλή καλλιέργεια αλλά όχι στην πλάκα TLC.

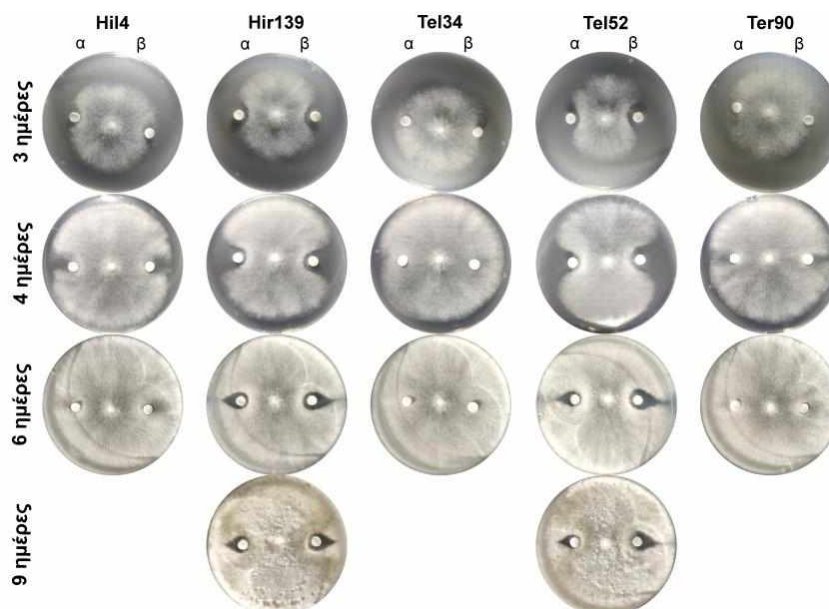


Εικόνα 4.27 Δραστηριότητα και χρωματογραφική ανάλυση TLC με βιοαυτογραφία του απομονωμένου ακατέργαστου εκχυλίσματος διαχόμενων μεταβολιτών από την καλλιέργεια των βακτηριακών στελεχών σε στερεό θρεπτικό μέσο NA είτε κατά μόνας (α), είτε με το φυτοπαθογόνο μύκητα *Botrytis cinerea* (β) μετά από 6 μέρες επώασης στους 25 °C. (A) Δοκιμή βιοδραστικότητας των απομονωμένων εκχυλισμάτων (α, β) εναντίον του μύκητα *Botrytis cinerea* σε στερεό θρεπτικό μέσο μετά από 4 ημέρες επώασης στους 25 °C. (B) Διαχωρισμός των απομονωμένων εκχυλισμάτων (α,β) με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) με ποσότητες κηλίδας 150 μl (Tel34), 80μl (Hil4, Ter90) και 18 μl (Tel52, Hir139) ακολουθούμενη από βιοαυτογραφία με τη μέθοδο υπερκείμενης έγχυσης άγαρ (agar overlay bioautography). Η χρωστική ζωτικότητα MTT έκανε ορατές τις ζώνες παρεμπόδισης, που εικονίζονται μετά από 6 (i) και 18 (ii) ώρες επώασης στους 25 °C. Αναγράφονται οι συντελεστές επιβράδυνσης (Rf) της κάθε ζώνης που εμφανίζεται.

Παρατηρήθηκε πως τα εκχυλίσματα των διαφορετικών στελεχών δεν παρουσιάζουν την ίδια δραστηριότητα (Εικόνα 4.27). Αρχικά, στα δείγματα του στελέχους Hil4 κάποιες βιοδραστικές ζώνες είναι οριακά διακριτές, ενώ εξαφανίζονται μετά από κάποιες ώρες επώασης της πλάκας, παρ'όλο που έχει χρησιμοποιηθεί σχετικά μεγάλη ποσότητα κηλίδας στην πλάκα TLC (80 μl). Αντίθετα, τα στελέχη Tel52 και Hir139 παρουσιάζουν μεγάλη βιοδραστική ζώνη, η οποία μένει σχεδόν αναλλοίωτη στο πέρας της επώασης, ενώ η ποσότητα της κηλίδας που χρησιμοποιήθηκε ήταν μικρή (18 μl). Τέλος, το στέλεχος Tel34 παρεμποδίζει το μύκητα *B. cinerea* σχηματίζοντας ζώνη παρεμπόδισης στη διπλή καλλιέργεια σε στερεό θρεπτικό μέσο NA *in vitro*, ενώ το ακατέργαστο εκχύλισμα δεν παρεμποδίζει το μύκητα ούτε στη διπλή καλλιέργεια ούτε στην πλάκα TLC, παρά τη μεγάλη ποσότητα κηλίδας που εφαρμόστηκε στην πλάκα (150 μl). Τα εκχυλίσματα του στελέχους Ter90 είναι βιοδραστικά στη διπλή καλλιέργεια, αλλά δεν εμφανίζουν δραστηριότητα στην πλάκα TLC.

Το ίδιο φαινόμενο παρατηρήθηκε και στις δοκιμές βιοδραστικότητας των εκχυλισμάτων σε διπλή καλλιέργεια, όπου χρησιμοποιήθηκε η ίδια ποσότητα εκχυλίσματος για όλα τα στελέχη (Εικόνα 4.28). Όσον αφορά τα στελέχη Hil4 και Ter90, το φυτοπαθογόνο στις 6 ημέρες είχε καλύψει τη ζώνη

παρεμπόδισης που είχε σχηματιστεί, ενώ τα εκχυλίσματα των στελεχών Tel52 και Hir139 παραμένουν βιοδραστικά για πάνω από 9 ημέρες. Έτσι, φαίνεται πως τα εκχυλίσματα των βακτηρίων Tel52 και Hir139 είτε περιείχαν μεγαλύτερη ποσότητα των δραστικών ενώσεων άρα ήταν πιο δραστικά στην πάροδο του χρόνου, είτε περιείχαν ενώσεις περισσότερο δραστικές, είτε περιείχαν μεγαλύτερη ποικιλία αντιμυκητιακών ενώσεων.



Εικόνα 4.28 Δραστηριότητα του απομονωμένου εκχυλίσματος διαχεόμενων μεταβολιτών που προέρχεται από την καλλιέργεια των επιλεγμένων ενδοφυτικών βακτηριακών στελεχών σε στερεό θρεπτικό μέσο ΝΑ είτε κατά μόνας (α) είτε με το φυτοπαθογόνο μύκητα *Botrytis cinerea* (β) μετά από 9 μέρες επώασης στους 25 °C. Ποσότητα 20 μl από τα εκχυλίσματα α και β σε φίλτρο Whatmann τοποθετήθηκαν εκατέρωθεν του μύκητα *Botrytis cinerea* σε στερεό θρεπτικό μέσο PDA και ακολούθησε επώαση για 9 μέρες στους 25 °C.

4.3.4 Ανίχνευση μεταβολιτών του ακατέργαστου εκχυλίσματος από μονή βακτηριακή καλλιέργεια σε στερεό μέσο με χημική ανάλυση UHPLC-HRMS

Εφ'όσον φάνηκε στην ανάλυση TLC πως κάποιοι αντιμυκητιακοί μεταβολίτες παράγονται κατά την αξενική βακτηριακή καλλιέργεια επιλέχθηκε το εκχύλισμα της μονής καλλιέργειας για περαιτέρω ανάλυση. Για να ανιχνευθούν οι εκκρινόμενοι και διαχεόμενοι μεταβολίτες που υπάρχουν στο εκχύλισμα πραγματοποιήθηκε χημική ανάλυση υγρής χρωματογραφίας εξαιρετικά υψηλής απόδοσης σε συνδυασμό με φασματομετρία μάζας υψηλής ανάλυσης (UHPLC-HRMS). Η πιθανή ταυτοποίηση των ενώσεων πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας χημικούς τύπους από προηγούμενες μελέτες σε συνδυασμό με τιμές μοριακών βαρών.

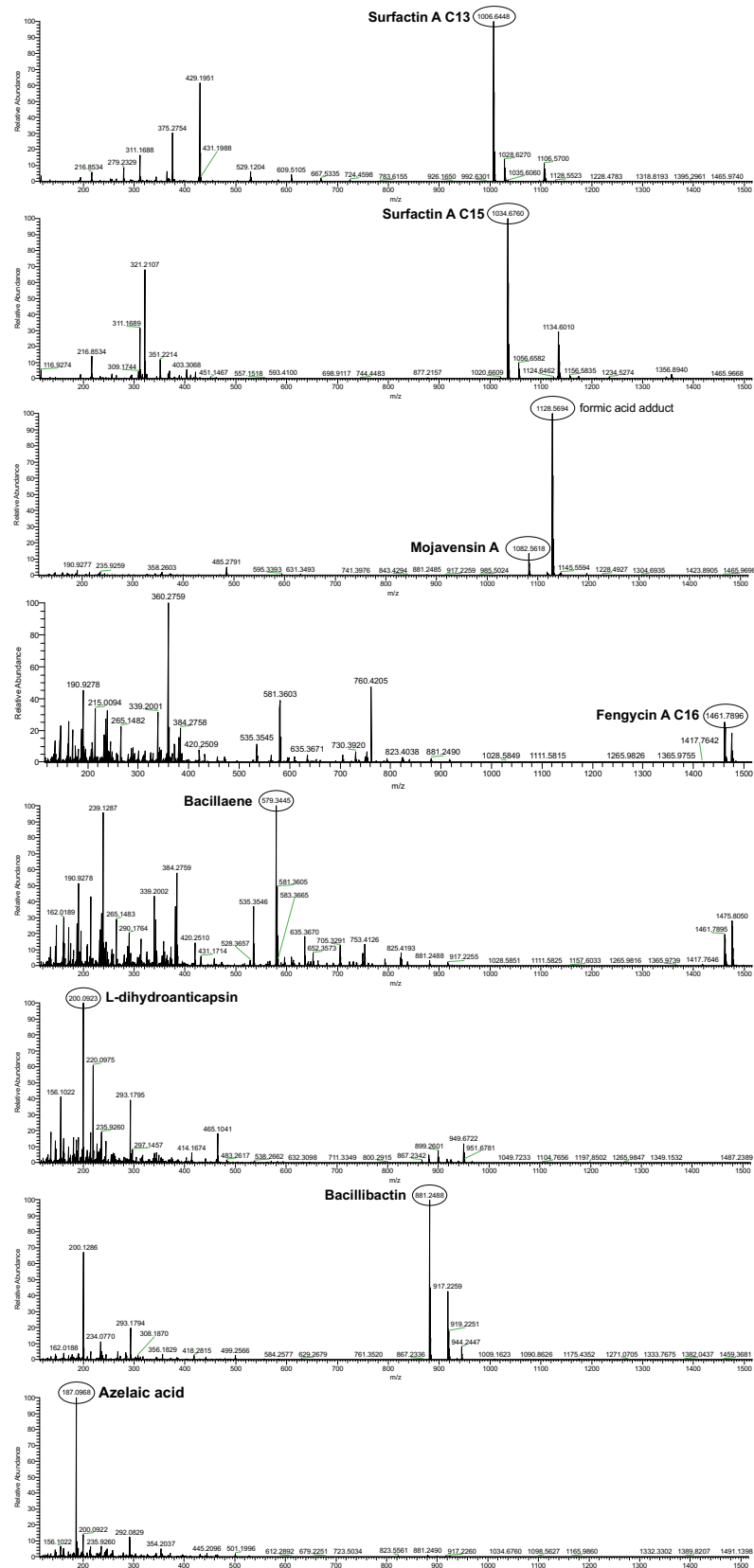
4.3.4.1 Στέλεχος Hil4

Η ανάλυση του εκχυλίσματος από τη στερεή καλλιέργεια του βακτηριακού στελέχους Hil4 ανέδειξε την παρουσία αντιμικροβιακών μεταβολιτών και διεγερτών της φυτικής άμυνας (Πίνακας 4.11, Εικόνα 4.29).

Πίνακας 4.11 Ανίχνευση και πιθανή ταυτοποίηση των εκκρινόμενων και διαχεόμενων μεταβολιτών από ακατέργαστο εκχύλισμα στερεής καλλιέργειας του στελέχους Hil4 μέσω της ανάλυσης UHPLC-HRMS για το στέλεχος Hil4 (*Bacillus halotolerans*).

Πιθανός μεταβολίτης	Μοριακός Τύπος	Calculated <i>m/z</i>	Experimental <i>m/z</i>	Χρόνος έκλουσης (min)	Αναφορές
Surfactin A C13	C ₅₁ H ₈₉ N ₇ O ₁₃	1008.29	1006.6448	22.68	Luo et al., 2015a
Surfactin A C15	C ₅₃ H ₉₃ N ₇ O ₁₃	1036.34	1034.6760	23.96	Janek et al., 2020
Mojavensin A	C ₅₀ H ₇₇ N ₁₃ O ₁₄	1084.22	1082.5618	14.66	Ma et al., 2012
Fengycin A C16	C ₇₂ H ₁₁₀ N ₁₂ O ₂₀	1463.71	1461.7890	16.52	Toral et al., 2018
L-dihydroanticapsin	C ₉ H ₁₅ NO ₄	201.22	200.0923	11.42	Parker et al., 2013
Bacillibactin	C ₃₉ H ₄₂ N ₆ O ₁₈	882.78	881.2488	11.89	Cheon et al., 2020
Bacillaene A1	C ₃₄ H ₄₈ N ₂ O ₆	580.75	579.3445	16.49	Xie et al., 2020
Azelaic acid	C ₉ H ₁₆ O ₄	188.22	187.0968	11.01	Javvadi et al., 2018

Η πιθανή επισημείωση των μεταβολιτών βασίστηκε στην ακριβή μάζα (± 5 ppm) και το μοριακό τύπο. Τα μοριακά βάρη 1006.6448 και 1034.6760 που αντιστοιχούν στους μοριακούς τύπους C₅₁H₈₉N₇O₁₃ και C₅₃H₉₃N₇O₁₃, υποδεικνύουν την παρουσία του κυκλικού λιποπεπτιδίου Surfactin A με τις δύο ομόλογες ενώσεις C13 και C15. Ακόμη, ανιχνεύθηκαν ιόντα με *m/z* 1082.5618 που υποδεικνύουν την παρουσία της ένωσης Mojavensin A με μοριακό τύπο C₅₀H₇₇N₁₃O₁₄, καθώς και ιόντα με *m/z* 1461.7890 που αντιστοιχούν στο μοριακό τύπο C₇₂H₁₁₀N₁₂O₂₀, υποδεικνύοντας την ύπαρξη του κυκλικού λιποπεπτιδίου Fengycin A (C16). Άλλη μια ένωση που πιθανά ανιχνεύθηκε ήταν η L-dihydroanticapsin, πρόδρομη ένωση της Bacilysin, με μοριακό βάρος 200.0923 και μοριακό τύπο C₉H₁₅NO₄. Άλλες πιθανές ενώσεις που βρέθηκαν ήταν η σιδηροφόρος ένωση Bacilibactin με μοριακό βάρος 881.2488 και μοριακό τύπο C₃₉H₄₂N₆O₁₈, η ένωση Bacillaene με μοριακό βάρος 881.2488 και μοριακό τύπο C₃₉H₄₂N₆O₁₈, καθώς και η ένωση Azelaic acid με μοριακό βάρος 187.0968 και μοριακό τύπο C₉H₁₆O₄.



Εικόνα 4.29 Χρωματογραφήματα των ενώσεων που ανιχνεύθηκαν στο εκχύλισμα της στερεής καλλιέργειας του στελέχους Hii4. Ζώνη θρεπτικού από στερεή καλλιέργεια 6 ημερών στους 25 °C αποκόπηκε και οι εκκρινόμενοι διαχειρόμενοι μεταβολίτες εκχυλίστηκαν με οξικό αιθυλεστέρα (ethyl acetate), διαλυτοποιήθηκαν σε μεθανόλη και υπεβλήθησαν σε ανάλυση UHPLC-HRMS. Οι κορυφές των μεταβολιτών που αναγράφονται σε κάθε χρωματογράφημα βρίσκονται σε κύκλο.

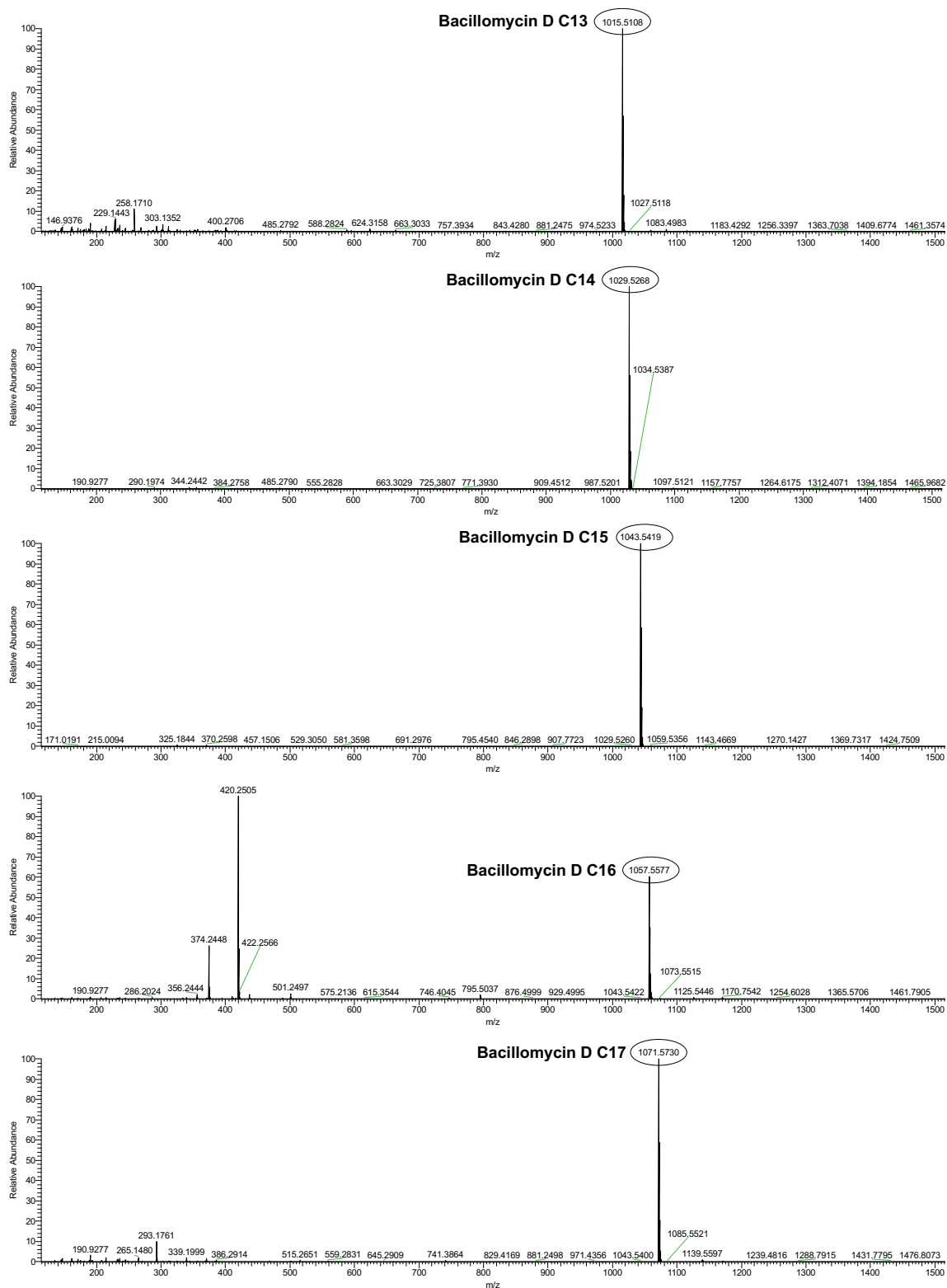
4.3.4.2 Στέλεχος Hir139

Το βακτηριακό στέλεχος Hir139 φάνηκε να παράγει πλήθος αντιμικροβιακών μεταβολιτών και διεγερτών της φυτικής άμυνας κατά την καλλιέργειά του σε στερεό θρεπτικό μέσο (Πίνακας 4.12, Εικόνα 4.30, Εικόνα 4.31).

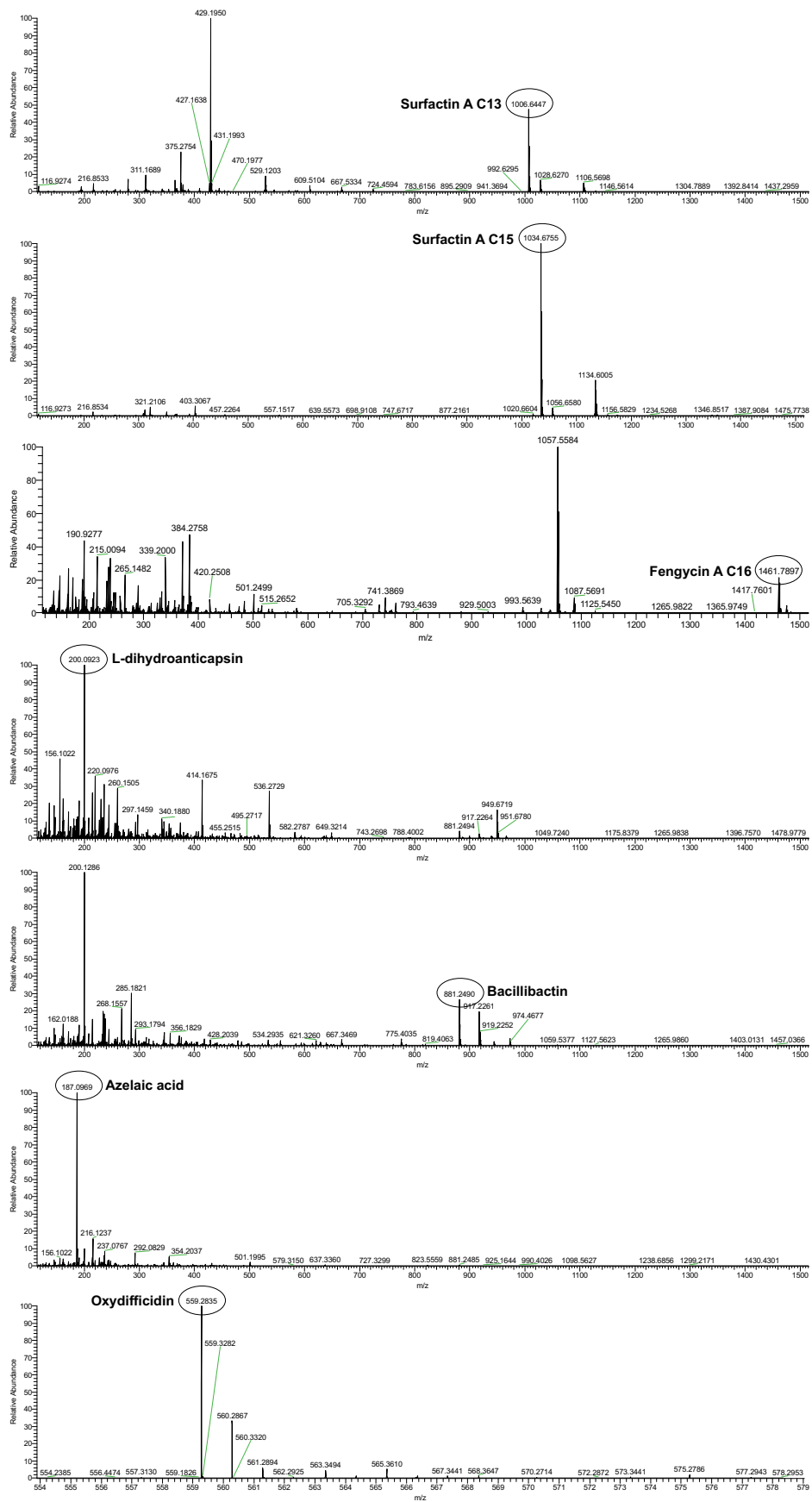
Πίνακας 4.12 Ανίχνευση και ταυτοποίηση πιθανών εκκρινόμενων και διαχεόμενων μεταβολιτών από ακατέργαστο εκχύλισμα στερεής καλλιέργειας του στελέχους Hir139 μέσω της ανάλυσης UHPLC-HRMS.

Πιθανός Μεταβολίτης	Μοριακός Τύπος	Calculated m/z	Experimental m/z	Χρόνος έκλουσης (min)	Αναφορές
Bacillomycin D C13	$C_{47}H_{72}N_{10}O_{15}$	1017.13	1015.5108	14.13	Nasfi et al., 2018
Bacillomycin D C14	$C_{48}H_{74}N_{10}O_{15}$	1031.16	1029.5268	14.86	Nasfi et al., 2018
Bacillomycin D C15	$C_{49}H_{76}N_{10}O_{15}$	1045.18	1043.5419	15.46	Nasfi et al., 2018
Bacillomycin D C16	$C_{50}H_{78}N_{10}O_{15}$	1059.21	1057.5577	16.20	Nasfi et al., 2018
Bacillomycin D C17	$C_{51}H_{80}N_{10}O_{15}$	1073.24	1071.5730	16.89	Mácha et al., 2021
Surfactin A C13	$C_{51}H_{89}N_7O_{13}$	1008.29	1006.6447	22.69	Luo et al., 2015
Surfactin A C15	$C_{53}H_{93}N_7O_{13}$	1036.34	1034.6755	23.97	Janek et al., 2020
Fengycin A C16	$C_{72}H_{110}N_{12}O_{20}$	1463.71	1461,7897	16.64	Toral et al., 2018
L-dihydroantcapsin	$C_9H_{15}NO_4$	201.22	200.0923	11.39	Parker et al., 2013
Bacillibactin	$C_{39}H_{42}N_6O_{18}$	882.78	881.2490	11.88	Cheon et al., 2020
Azelaic acid	$C_9H_{16}O_4$	188.22	187.0969	11.01	Javvadi et al., 2018
Oxydifficidin	$C_{31}H_{45}O_7P$	560.66	559.2835	17.61	Im et al., 2020

Κατά την ανάλυση του εκχυλίσματος του στελέχους Hir139 ανιχνεύθηκαν πολλές πιθανές ομόλογες ενώσεις του ιουρινικού λιποπεπτιδίου Bacillomycin D (Πίνακας 4.12, Εικόνα 4.30). Ειδικότερα, βρέθηκαν οι ομόλογες ενώσεις C13, με μοριακό βάρος 1015.5108 και μοριακό τύπο $C_{47}H_{72}N_{10}O_{15}$, C14 με μοριακό βάρος 1029.5268 και μοριακό τύπο $C_{48}H_{74}N_{10}O_{15}$, C15 με μοριακό βάρος 1043.5419 και μοριακό τύπο $C_{49}H_{76}N_{10}O_{15}$, C16 με μοριακό βάρος 1057.5577 και μοριακό τύπο $C_{50}H_{78}N_{10}O_{15}$ και C17 με μοριακό βάρος 1071.5730 και μοριακό τύπο $C_{51}H_{80}N_{10}O_{15}$. Άλλη πιθανή ένωση που ανιχνεύθηκε ήταν το κυκλικό λιποπεπτίδιο Surfactin A, με 2 ομόλογες ενώσεις, τη C13 με μοριακό βάρος 1006.6447 και μοριακό τύπο $C_{51}H_{89}N_7O_{13}$ και τη C15 με μοριακό βάρος 1034.6755 και μοριακό τύπο $C_{53}H_{93}N_7O_{13}$ (Πίνακας 4.12, Εικόνα 4.31). Ακόμη, ανιχνεύθηκε πιθανή ένωση με μοριακό βάρος 1461,7897 και μοριακό τύπο $C_{72}H_{110}N_{12}O_{20}$, η οποία αποδόθηκε στη Fengycin A (Πίνακας 4.12, Εικόνα 4.31). Το μοριακό βάρος 200.0923 που αντιστοιχεί στο μοριακό τύπο $C_9H_{15}NO_4$ υποδεικνύει την παρουσία της L-dihydroantcapsin, πρόδρομη ένωση της Bacilysin, ενώ η πιθανή ένωση με μοριακό βάρος 881.2490 και μοριακό τύπο $C_{39}H_{42}N_6O_{18}$ αποδόθηκε στη σιδηροφόρα ένωση Bacilibactin (Πίνακας 4.12, Εικόνα 4.31). Επίσης, ανιχνεύθηκε η ένωση Azelaic με μοριακό βάρος 187.0969 και μοριακό τύπο $C_9H_{16}O_4$ (Πίνακας 4.12, Εικόνα 4.31). Τέλος, ανιχνεύθηκε πιθανή ένωση με μοριακό βάρος 559.2835 και μοριακό τύπο $C_{31}H_{45}O_7P$, η οποία αποδόθηκε στην ένωση Oxydifficidin (Πίνακας 4.12, Εικόνα 4.31).



Εικόνα 4.30 Χρωματογραφήματα των ισομορφών της ένωσης Bacillomycin D που ανιχνεύθηκαν στο εκχύλισμα της στερεής καλλιέργειας του στελέχους Hir139. Ζώνη θεραπευτικού από στερεή καλλιέργεια 6 ημερών στους 25 °C αποκόπηκε και οι εκκρινόμενοι διαχεόμενοι μεταβολίτες εκχυλίστηκαν με οξικό αιθυλεστέρα (ethyl acetate), διαλυτοποιήθηκαν σε μεθανόλη και υπεβλήθησαν σε ανάλυση UHPLC-HRMS. Οι κορυφές των μεταβολιτών που αναγράφονται σε κάθε χρωματογράφημα βρίσκονται σε κύκλο.



Εικόνα 4.31 Χρωματογραφήματα πιθανών ενώσεων που ανιχνεύθηκαν στο εκχύλισμα της στερεής καλλιέργειας του στελέχους *Hir139*. Ζώνη θρεπτικού από στερεή καλλιέργεια 6 ημερών στους 25 °C αποκόπηκε και οι εκκρινόμενοι διαχεόμενοι μεταβολίτες εκχυλίστηκαν με οξικό αιθυλεστέρα (ethyl acetate), διαλυτοποιήθηκαν σε μεθανόλη και υπεβλήθησαν σε ανάλυση UHPLC-HRMS. Οι κορυφές των μεταβολιτών που αναγράφονται σε κάθε χρωματογράφημα βρίσκονται σε κύκλο.

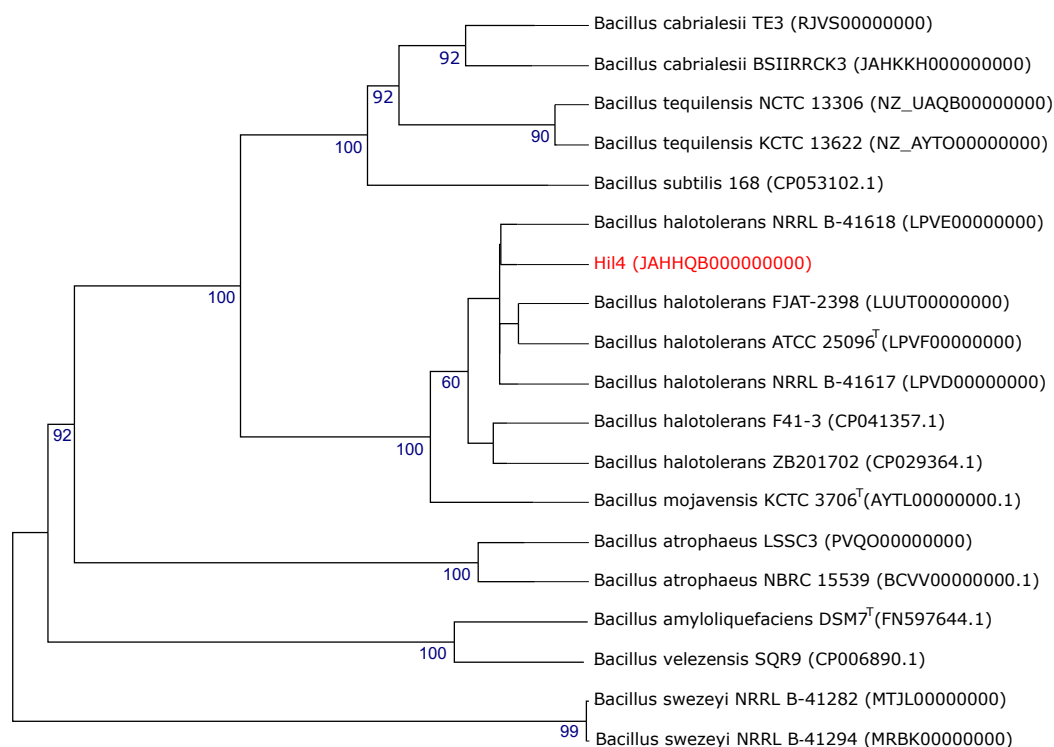
4.4 Αλληλούχιση γονιδιωμάτων των επιλεγμένων βακτηριακών στελεχών

Στα 5 επιλεγμένα στελέχη πραγματοποιήθηκε αλληλούχιση του γονιδιώματος (Whole Genome Sequencing) που αποτελεί την καλύτερη μέθοδο για φυλογενετική ταξινόμηση του κάθε στελέχους, ενώ οδηγεί στον προσδιορισμό του γενετικού δυναμικού του για επιθυμητά χαρακτηριστικά, όπως την ικανότητα για προώθηση της φυτικής ανάπτυξης και την αντιμετώπιση παθογόνων.

4.4.1 Χαρακτηριστικά του γονιδιώματος και φυλογενετική ταξινόμηση

4.4.1.1 Στέλεχος Hil4

Για τη φυλογενετική ταξινόμηση του στελέχους Hil4, πραγματοποιήθηκε φυλογενωμική ανάλυση (phylogenome analysis) μέσω της κατασκευής φυλογενετικού δέντρου που βασίζεται στο γένωμα (phylogenomic tree) και περιείχε στελέχη του γένους *Bacillus*, το οποίο κατασκευάστηκε με τη βοήθεια του διακομιστή των πρότυπων στελεχών (Type Genome Server, TYGS, <https://tygs.dsmz.de>). Το δέντρο αυτό (Εικόνα 4.32) υποδεικνύει την κοντινή φυλογενετική σχέση του στελέχους Hil4 με το είδος *B. halotolerans*.



Εικόνα 4.32 Φυλογενετικό δέντρο γονιδιωμάτων που βασίζεται στην νουκλεοτιδική αλληλουχία και δείχνει τη θέση του βακτηριακού στελέχους Hil4 σε σχέση με άλλα είδη του γένους *Bacillus*. Το δέντρο κατασκευάστηκε στο TYGS (<https://tygs.dsmz.de>) με FastME (Lefort et al., 2015) από τιμές GBDP (Genome BLAST Distance Phylogeny). Τα μήκη των κλαδιών έχουν φτιαχτεί σε κλίμακα με βάση τον τύπο d_s . Η ρίζα του δέντρου βρίσκεται στη μέση (Farris, 1972). Τα πρότυπα στελέχη υποδεικνύονται με [†].

Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε σύγκριση μεταξύ του στελέχους Hil4 και στελεχών των ειδών *B. halotolerans* και *Bacillus mojavensis* με την ανάλυση ορθόλογης μέσης νουκλεοτιδικής ομοιότητας

(orthologous average nucleotide identity, OrthoANI) και του ψηφιακού DNA-DNA υβριδισμού (digital DNA-DNA hybridization, dDDH). Το κατώφλι για διαχώριση των ειδών είναι 95-96% και 70% για τις αναλύσεις orthoANI και dDDH αντίστοιχα. Οι τιμές που παρατηρήθηκαν κατά τη σύγκριση του στελέχους Hir4 με άλλα στελέχη του *B. halotolerans* είναι πάνω από τις τιμές κατωφλιού και για τις δύο αναλύσεις (**Πίνακας 4.13**). Συγκεκριμένα, οι τιμές κυμάνθηκαν μεταξύ 82.10 και 93% για την dDDH, ενώ μεταξύ 98.05 και 99.14% για την orthoANI ανάλυση. Πιο κοντινά στελέχη φαίνεται να είναι τα NRRL B-41618 και ATCC 25096^T. Έτσι, λαμβάνοντας υπ'όψιν τη φυλογενωμική ανάλυση TYGS, καθώς και τις αναλύσεις orthoANI και dDDH, το στέλεχος Hir4 ανήκει στο είδος *B. halotolerans*.

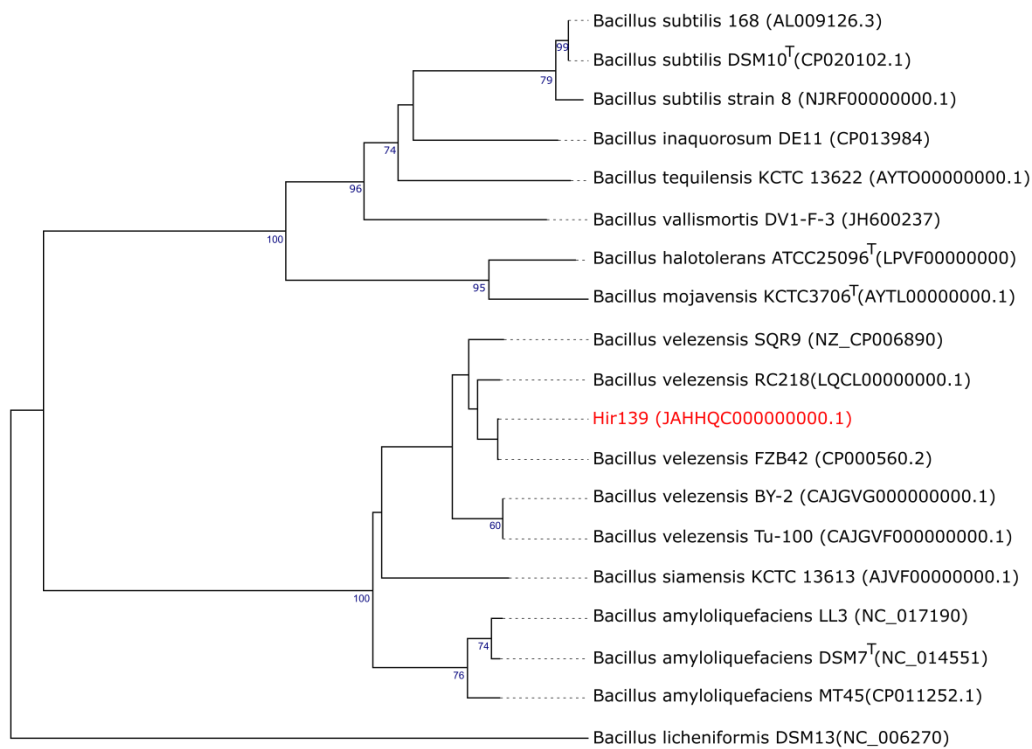
Πίνακας 4.13 Τιμές που προέκυψαν από τη σύγκριση του στελέχους Hir4 με γνωστά στελέχη των ειδών *Bacillus halotolerans* και *Bacillus mojavensis* μέσω των αναλύσεων ορθόλογης μέσης νουκλεοτιδικής ομοιότητας (orthologous average nucleotide identity, OrthoANI) και του ψηφιακού DNA-DNA υβριδισμού (digital DNA-DNA hybridization, dDDH). Τιμές ANI 95-96% και τιμές dDDH 70% θεωρούνται τιμές κατώφλι για τη διαφοροποίηση των ειδών. Τα πρότυπα βακτηριακά στελέχη συμβολίζονται με ^T.

Βακτηριακά στελέχη	OrthoANIu (%)	dDDH (%)
<i>Bacillus halotolerans</i> NRRL B-41618*	99.26	93.50
<i>Bacillus halotolerans</i> ATCC 25096 ^T	99.14	93.00
<i>Bacillus halotolerans</i> FJAT-2398	99.14	92.90
<i>Bacillus halotolerans</i> NRRL B-41617*	99.17	92.90
<i>Bacillus halotolerans</i> KKD1	98.07	87.70
<i>Bacillus halotolerans</i> 36	98.07	88.20
<i>Bacillus halotolerans</i> F41-3	98.06	82.50
<i>Bacillus halotolerans</i> ZB201702	98.05	82.70
<i>Bacillus halotolerans</i> MBH1	98.05	82.10
<i>Bacillus mojavensis</i> KCTC 3706 ^T	95.74	64.70
<i>Bacillus mojavensis</i> UCMB5075	95.70	64.80
<i>Bacillus cabrialesii</i> BSIIRCK3	87.66	33.70

*Έχουν πρόσφατα επαναταξινομηθεί ως *B. halotolerans* (Dunlap et al., 2016)

4.4.1.2 Στέλεχος Hir139

Το στέλεχος Hir139 ανήκει στο *B. amyloliquefaciens* operational group του είδους *B. subtilis* σύμφωνα με την αλληλουχία 16S rDNA. Για πιο ακριβή φυλογενετική ταξινόμηση, χρησιμοποιήθηκε η αλληλουχία ολόκληρου του γονιδιώματος, καθώς και οι αλληλουχίες γονιδιωμάτων άλλων στελεχών από είδη του γένους *Bacillus* για να κατασκευαστεί φυλογενετικό δέντρο (phylogenomic tree) μέσω του διακομιστή των πρότυπων στελεχών (Type Genome Server, TYGS, <https://tygs.dsmz.de>). Το δέντρο αυτό (**Εικόνα 4.33**) καταδεικνύει την κοντινή φυλογενετική σχέση του στελέχους Hir139 με το είδος *B. velezensis*.



Εικόνα 4.33 Φυλογενετικό δέντρο γονιδιωμάτων που βασίζεται στην νουκλεοτιδική αλληλουχία και δείχνει τη θέση του βακτηριακού στελέχους Hir139 σε σχέση με άλλα είδη του γένους *Bacillus*. Το δέντρο κατασκευάστηκε στο TYGS (<https://tygs.dsmz.de/>) με FastME (Lefort et al., 2015) από τιμές GBDP (Genome BLAST Distance Phylogeny). Τα μήκη των κλαδιών έχουν φτιαχτεί σε κλίμακα με βάση τον τύπο d_5 . Η ρίζα του δέντρου βρίσκεται στη μέση (Farris, 1972). Τα πρότυπα στελέχη υποδεικνύονται με ^T.

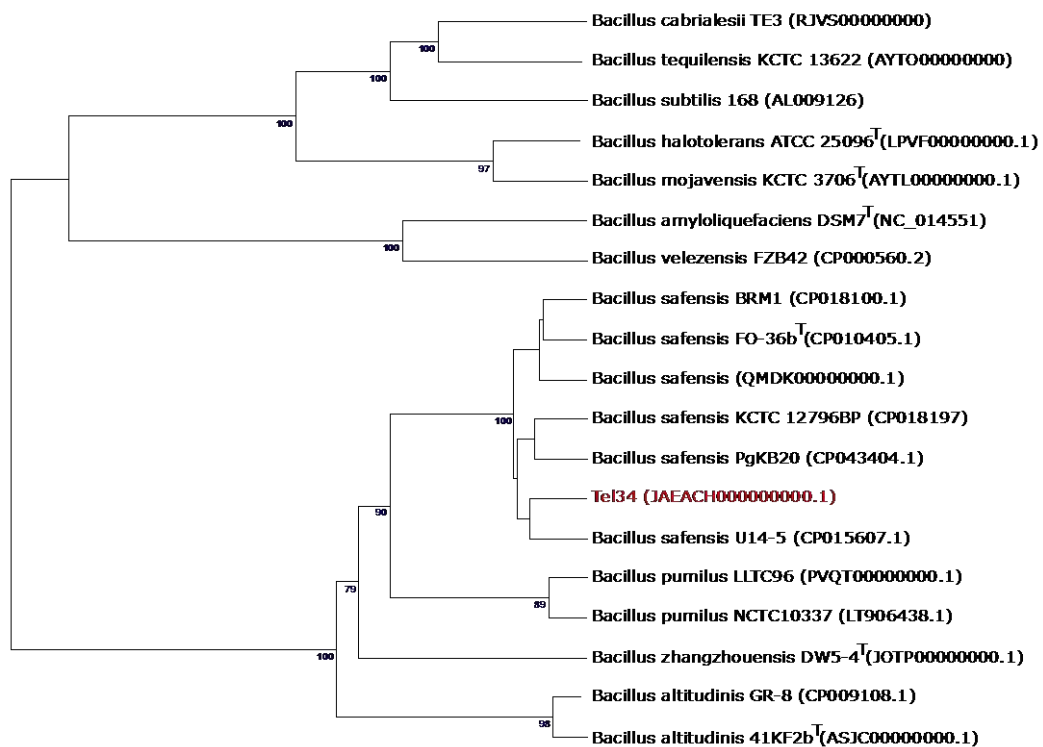
Στη συνέχεια, το στέλεχος Hir139 συγκρίθηκε με στελέχη των κοντινών φυλογενετικά ειδών *B. velezensis* και *B. amyloliquefaciens* σε επίπεδο γονιδιώματος μέσω των αναλύσεων ορθόλογης μέσης νουκλεοτιδικής ομοιότητας (orthologous average nucleotide identity, OrthoANI) και του ψηφιακού DNA-DNA υβριδισμού (digital DNA-DNA hybridization, dDDH). Το κατώφλι για διαχώριση των ειδών είναι 95-96% και 70% για τις αναλύσεις orthoANI και dDDH αντίστοιχα. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των αναλύσεων (Πίνακας 4.14), το στέλεχος ανήκει στο είδος *B. velezensis* με τις τιμές orthoANI και dDDH να έχουν εύρος 99.99-97.63 και 100-80%, αντίστοιχα. Ως πιο κοντινό στέλεχος υποδεικνύεται το FZB42. Έτσι, λαμβάνοντας υπ' όψιν τη φυλογενωμική ανάλυση TYGS, καθώς και τις αναλύσεις ANI και dDDH, το στέλεχος Hir139 ανήκει στο είδος *B. velezensis*.

Πίνακας 4.14 Τιμές που προέκυψαν από τη σύγκριση του στελέχους Hir139 με γνωστά στελέχη των ειδών *Bacillus velezensis* και *Bacillus amyloliquefaciens* μέσω των αναλύσεων ορθόλογης μέσης νουκλεοτιδικής ομοιότητας (orthologous average nucleotide identity, OrthoANI) και του ψηφιακού DNA-DNA υβριδισμού (digital DNA-DNA hybridization, dDDH). Τιμές ANI 95-96% και τιμές dDDH 70% θεωρούνται τιμές κατώφλι για τη διαφοροποίηση των ειδών. Τα πρότυπα βακτηριακά στελέχη συμβολίζονται με ^T.

Βακτηριακά στελέχη	OrthoANIu (%)	dDDH (%)
<i>Bacillus velezensis</i> FZB42	99.99	100.00
<i>Bacillus velezensis</i> RC218	98.97	91.60
<i>Bacillus velezensis</i> SQR9	98.47	86.80
<i>Bacillus velezensis</i> NST6	98.17	84.40
<i>Bacillus velezensis</i> WRN014	97.72	80.40
<i>Bacillus velezensis</i> BY-2	97.68	80.00
<i>Bacillus velezensis</i> Tu-100	97.63	80.00
<i>Bacillus velezensis</i> 9D-6	97.63	91.20
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> DSM7 ^T	94.15	56.10
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> MT45	94.20	56.00
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> LL3	94.06	55.60

4.4.1.3 Στέλεχος Tel34

Για να εξακριβωθεί εάν το στέλεχος Tel34 ανήκει στο είδος *B. safensis*, πραγματοποιήθηκε φυλογενωμική ανάλυση (phylogenome analysis) μέσω της κατασκευής φυλογενετικού δέντρου στο διακομιστή πρότυπων στελεχών (Type Genome Server, TYGS, <https://tygs.dsmz.de>) που βασίζεται στη γονιδιωματική αλληλουχία και περιείχε στελέχη από διάφορα είδη του γένους *Bacillus*. Μέσα από αυτή την ανάλυση φάνηκε πως το στέλεχος Tel34 είναι περισσότερο κοντά φυλογενετικά σε στελέχη του είδους *B. safensis* (Εικόνα 4.34).



Εικόνα 4.34 Φυλογενετικό δέντρο γονιδιωμάτων που βασίζεται στην νουκλεοτιδική αλληλουχία και δείχνει τη θέση του βακτηριακού στελέχους Tel34 σε σχέση με άλλα είδη του γένους *Bacillus*. Το δέντρο κατασκευάστηκε στο TYGS (<https://tygs.dsmz.de/>) με FastME (Lefort et al., 2015) από τιμές GBDP (Genome BLAST Distance Phylogeny). Τα μήκη των κλαδιών έχουν φτιαχτεί σε κλίμακα με βάση τον τύπο d_5 . Η ρίζα του δέντρου βρίσκεται στη μέση (Farris, 1972). Τα πρότυπα στελέχη υποδεικνύονται με $\bar{}$.

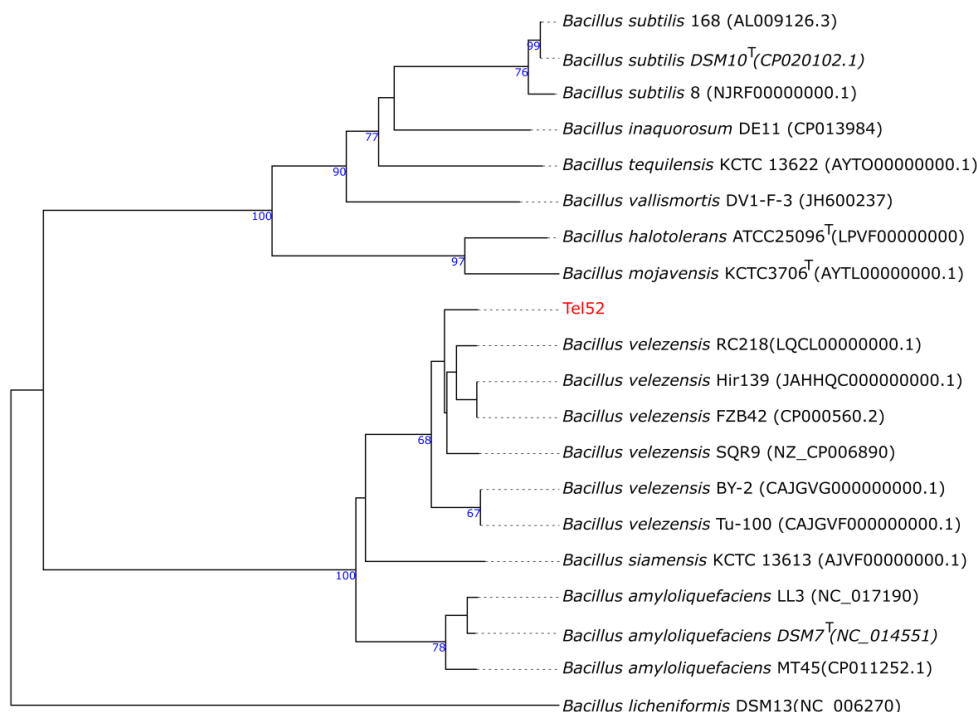
Επιπροσθέτως, πραγματοποιήθηκε ανάλυση ορθόλογης μέσης νουκλεοτιδικής ομοιότητας (orthologous average nucleotide identity, OrthoANI) και ψηφιακού DNA-DNA υβριδισμού (digital DNA-DNA hybridization, dDDH) συγκρίνοντας το γονιδίωμα του στελέχους Tel34 με γονιδιώματα γνωστών στελεχών των ειδών *B. safensis* και *B. pumilus*. Οι τιμές orthoANI και dDDH (Πίνακας 4.15) που παρατηρήθηκαν κατά τη σύγκριση με στελέχη του είδους *B. safensis* ήταν στο εύρος 98.43-97.55 % και 85.30-78.70 %, αντίστοιχα, υποδεικνύοντας πως το στέλεχος Tel34 ανήκει στο είδος *B. safensis*. Έτσι, λαμβάνοντας υπ' όψιν τη φυλογενωμική ανάλυση TYGS, καθώς και τις αναλύσεις orthoANI και dDDH, το στέλεχος Tel34 ανήκει στο είδος *B. safensis*.

Πίνακας 4.15 Τιμές που προέκυψαν από τη σύγκριση του στελέχους Tel34 με γνωστά στελέχη των ειδών *Bacillus safensis* και *Bacillus pumilus* μέσω των αναλύσεων ορθόλογης μέσης νουκλεοτιδικής ομοιότητας (orthologous average nucleotide identity, OrthoANI) και του ψηφιακού DNA-DNA υβριδισμού (digital DNA-DNA hybridization, dDDH). Τιμές ANI 95-96% και τιμές dDDH 70% θεωρούνται τιμές κατώφλι για τη διαφοροποίηση των ειδών. Τα πρότυπα βακτηριακά στελέχη συμβολίζονται με ^T.

Βακτηριακά στελέχη	OrthoANIu (%)	dDDH (%)
<i>Bacillus safensis</i> U14-5	98.43	85.30
<i>Bacillus safensis</i> PgKB20	97.88	81.30
<i>Bacillus safensis</i> KCTC 12796BP	97.86	80.80
<i>Bacillus safensis</i> JG-B5T	97.61	79.20
<i>Bacillus safensis</i> BRM1	97.60	79.10
<i>Bacillus safensis</i> FO-36b ^T	97.55	78.70
<i>Bacillus pumilus</i> LLTC96	91.67	44.50
<i>Bacillus pumilus</i> NCTC10337	91.71	44.70

4.4.1.4 Στέλεχος Tel52

Σύμφωνα με την προκαταρκτική φυλογενετική ανάλυση της 16S rDNA αλληλουχίας, το στέλεχος Tel52 ταξινομήθηκε στο *B. amyloliquefaciens* group. Για να εξακριβωθεί η θέση του στο συγκεκριμένο group χρησιμοποιήθηκε η αλληλουχία ολόκληρου του γονιδιώματος, καθώς και οι αλληλουχίες γονιδιωμάτων άλλων στελεχών από είδη του γένους *Bacillus*, για να κατασκευαστεί φυλογενετικό δέντρο (phylogenomic tree) μέσω του διακομιστή των πρότυπων στελεχών (Type Genome Server, TYGS, <https://tygs.dsmz.de>). Το δέντρο αυτό (Εικόνα 4.35) καταδεικνύει την κοντινή φυλογενετική σχέση του στελέχους Tel52 με το είδος *B. velezensis*.



Εικόνα 4.35 Φυλογενετικό δέντρο γονιδιωμάτων που βασίζεται στην νουκλεοτιδική αλληλουχία και δείχνει τη θέση του βακτηριακού στελέχους Tel52 σε σχέση με άλλα είδη του γένους *Bacillus*. Το δέντρο κατασκευάστηκε στο TYGS (<https://tygs.dsmz.de>) με FastME (Lefort et al., 2015) από τιμές GBDP (Genome BLAST Distance Phylogeny). Τα μήκη των κλαδιών έχουν φτιαχτεί σε κλίμακα με βάση τον τύπο d_3 . Η ρίζα του δέντρου βρίσκεται στη μέση (Farris, 1972). Τα πρότυπα στελέχη υποδεικνύονται με ^T.

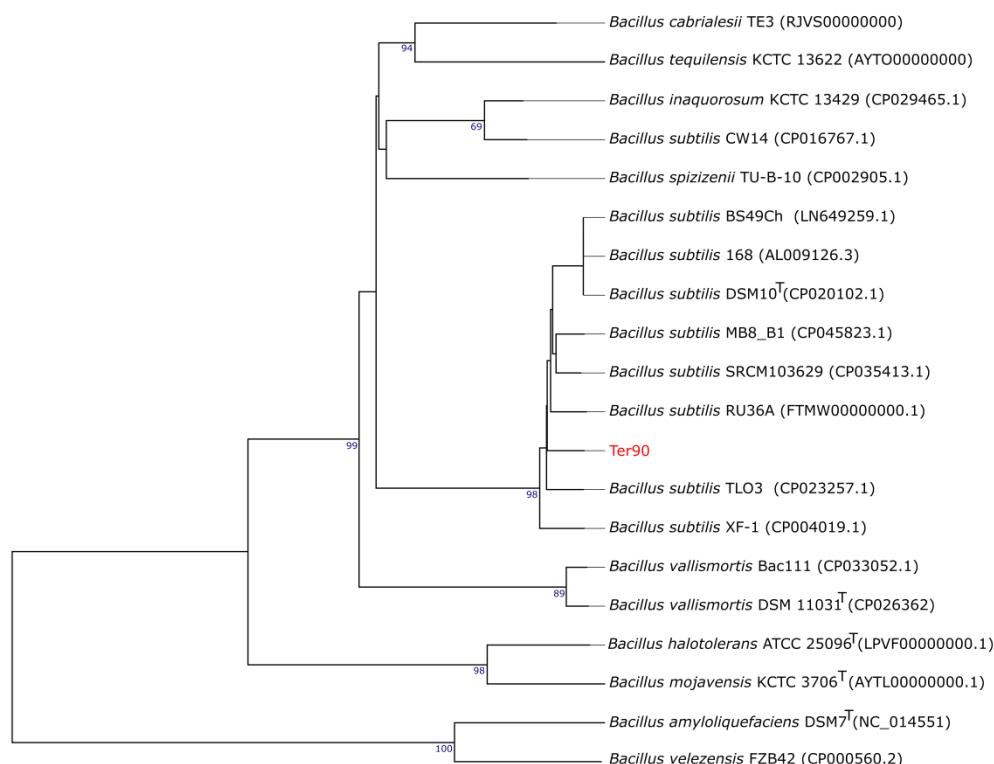
Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε σύγκριση γονιδιώματος του στελέχους Tel52 με στελέχη των κοντινών φυλογενετικά ειδών *B. velezensis* και *B. amyloliquefaciens* μέσω των αναλύσεων ορθόλογης μέσης νουκλεοτιδικής ομοιότητας (orthologous average nucleotide identity, OrthoANI) και του ψηφιακού DNA-DNA υβριδισμού (digital DNA-DNA hybridization, dDDH). Το κατώφλι για διαχώριση των ειδών είναι 95-96% και 70% για τις αναλύσεις orthoANI και dDDH αντίστοιχα. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των αναλύσεων (Πίνακας 4.16), το στέλεχος ανήκει στο είδος *B. velezensis* με τις τιμές orthoANI και dDDH να έχουν εύρος 98.64-97.59 και 88.3-79.5%, αντίστοιχα. Ως πιο κοντινό στέλεχος υποδεικνύεται το NST6. Έτσι, λαμβάνοντας υπ'όψιν τη φυλογενωμική ανάλυση TYGS, καθώς και τις αναλύσεις ANI και dDDH, το στέλεχος Tel52 ανήκει στο είδος *B. velezensis*.

Πίνακας 4.16 Τιμές που προέκυψαν από τη σύγκριση του στελέχους Tel52 με γνωστά στελέχη του είδους *Bacillus subtilis* και μέσω των αναλύσεων ορθόλογης μέσης νουκλεοτιδικής ομοιότητας (orthologous average nucleotide identity, OrthoANI) και του ψηφιακού DNA-DNA υβριδισμού (digital DNA-DNA hybridization, dDDH). Τιμές ANI 95-96% και τιμές dDDH 70% θεωρούνται τιμές κατώφλι για τη διαφοροποίηση των ειδών. Τα πρότυπα βακτηριακά στελέχη συμβολίζονται με ^T.

Βακτηριακά στελέχη	OrthoANIu (%)	dDDH (%)
<i>Bacillus velezensis</i> NST6	98.64	88.30
<i>Bacillus velezensis</i> Hir139	98.39	85.80
<i>Bacillus velezensis</i> FZB42	98.37	85.80
<i>Bacillus velezensis</i> RC218	98.36	85.80
<i>Bacillus velezensis</i> SQR9	98.35	85.50
<i>Bacillus velezensis</i> 9D-6	98.34	85.10
<i>Bacillus velezensis</i> WRN014	97.69	80.00
<i>Bacillus velezensis</i> BY-2	97.64	79.50
<i>Bacillus velezensis</i> Tu-100	97.59	79.50
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> DSM7 ^T	94.09	55.70
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> MT45	94.20	55.70
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> LL3	93.99	55.30

4.4.1.5 Στέλεχος Ter90

Για τη φυλογενετική ταξινόμηση του στελέχους Ter90 πραγματοποιήθηκε φυλογενωμική ανάλυση (phylogenome analysis) μέσω της κατασκευής φυλογενετικού δέντρου που βασίζεται στο γένωμα (phylogenomic tree) και περιλάμβανε στελέχη του γένους *Bacillus*, το οποίο κατασκευάστηκε με τη βοήθεια του διακομιστή των πρότυπων στελεχών (Type Genome Server, TYGS, <https://tygs.dsmz.de>). Το δέντρο αυτό (Εικόνα 4.36) υποδεικνύει την κοντινή φυλογενετική σχέση του στελέχους Ter90 με το είδος *B. subtilis*.



Εικόνα 4.36 Φυλογενετικό δέντρο γονιδιωμάτων που βασίζεται στην νουκλεοτιδική αλληλουχία και δείχνει τη θέση του βακτηριακού στελέχους Ter90 σε σχέση με άλλα είδη του γένους *Bacillus*. Το δέντρο κατασκευάστηκε στο TYGS (<https://tygs.dsmz.de/>) με FastME (Lefort et al., 2015) από τιμές GBDP (Genome BLAST Distance Phylogeny). Τα μήκη των κλαδιών έχουν φτιαχτεί σε κλίμακα με βάση τον τύπο d_5 . Η ρίζα του δέντρου βρίσκεται στη μέση (Farris, 1972). Τα πρότυπα στελέχη υποδεικνύονται με ^T.

Ακολούθως, πραγματοποιήθηκαν οι αναλύσεις ορθόλογης μέσης νουκλεοτιδικής ομοιότητας (orthologous average nucleotide identity, OrthoANI) και ψηφιακού DNA-DNA υβριδισμού (digital DNA-DNA hybridization, dDDH) όπου το στέλεχος Ter90 συγκρίθηκε με άλλα στελέχη του είδους *B. subtilis*. Με βάση τα αποτελέσματα (Πίνακας 4.17), με τιμές orthoANI 98.54-98.33 (%) και τιμές dDDH 87.20-84.70 (%), το στέλεχος Ter90 φαίνεται να ανήκει στο είδος *B. subtilis*. Έτσι, λαμβάνοντας υπ' όψιν τη φυλογενωμική ανάλυση TYGS, καθώς και τις αναλύσεις orthoANI και dDDH, το στέλεχος Ter90 ανήκει στο είδος *B. subtilis*.

Πίνακας 4.17 Τιμές που προέκυψαν από τη σύγκριση του στελέχους Ter90 με γνωστά στελέχη του είδους *Bacillus subtilis* και μέσω των αναλύσεων ορθόλογης μέσης νουκλεοτιδικής ομοιότητας (orthologous average nucleotide identity, OrthoANI) και του ψηφιακού DNA-DNA υβριδισμού (digital DNA-DNA hybridization, dDDH). Τιμές ANI 95-96% και τιμές dDDH 70% θεωρούνται τιμές κατώφλι για τη διαφοροποίηση των ειδών. Τα πρότυπα βακτηριακά στελέχη συμβολίζονται με ^T.

Βακτηριακά στελέχη	OrthoANIu (%)	dDDH (%)
<i>Bacillus subtilis</i> MB8_B1	98.54	87.20
<i>Bacillus subtilis</i> SRCM103629	98.53	87.40
<i>Bacillus subtilis</i> 168	98.49	87.30
<i>Bacillus subtilis</i> BS49Ch	98.49	87.30
<i>Bacillus subtilis</i> DSM10 ^T	98.49	87.30
<i>Bacillus subtilis</i> TLO3	98.49	86.80
<i>Bacillus subtilis</i> XF-1	98.33	84.70

4.4.2 Συστάδες γονιδίων που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση δευτερογενών μεταβολιτών

Οι δευτερογενείς μεταβολίτες ή οι πρωτεΐνες που τα συνθέτουν συνήθως κωδικοποιούνται από ένα σύμπλεγμα γονιδίων που βρίσκονται στον ίδιο γενετικό τόπο και ονομάζεται συστάδα βιοσυνθετικών γονιδίων (Biosynthetic Gene Cluster, BGC) (Tran et al., 2019). Μία BGC αποτελείται από τα γονίδια που απαιτούνται για τη σύνθεση του μεταβολίτη και από ρυθμιστικά στοιχεία, όπως παράγοντες μεταγραφής και εκκινητές. Επίσης, μπορεί να περιέχει γονίδια που εμπλέκονται στη μεταφορά του παραγόμενου μεταβολίτη εκτός του κυττάρου, αλλά και γονίδια που εμπλέκονται στην ανθεκτικότητα του οργανισμού στο συγκεκριμένο μεταβολίτη (Tran et al., 2019).

Το γονιδίωμα κάθε στελέχους υποβλήθηκε σε ανάλυση antiSMASH (antibiotic and secondary metabolites analysis shell) (<https://antismash.secondarymetabolites.org/#!/start>), για να εντοπιστούν περιοχές που περιλαμβάνουν συστάδες βιοσυνθετικών γονιδίων δευτερογενών μεταβολιτών (BGCs). Μέσα στις δυνατότητες του διακομιστή περιλαμβάνεται το εργαλείο KnownClusterBlast, όπου ταυτοποιείται μία συστάδα γονιδίων με βάση τις καταχωρημένες συστάδες γονιδίων της βάσης δεδομένων MIBiG, καθώς και το εργαλείο ClusterBlast, όπου αναφέρονται στελέχη που διαθέτουν συστάδες με ομολογία γονιδιακής οργάνωσης ή συνταϊνίας (synteny).

4.4.2.1 Στέλεχος Hi14

Στο γονιδίωμα του στελέχους Hi14 ταυτοποιήθηκαν 10 περιοχές με συστάδες βιοσυνθετικών γονιδίων για δευτερογενείς μεταβολίτες, μέσα στι

ς οποίες περιλαμβάνονταν συστάδες για 11 πιθανούς μεταβολίτες, καθώς η μία περιοχή περιέχει δύο διαφορετικές συστάδες γονιδίων (Πίνακας 4.18).

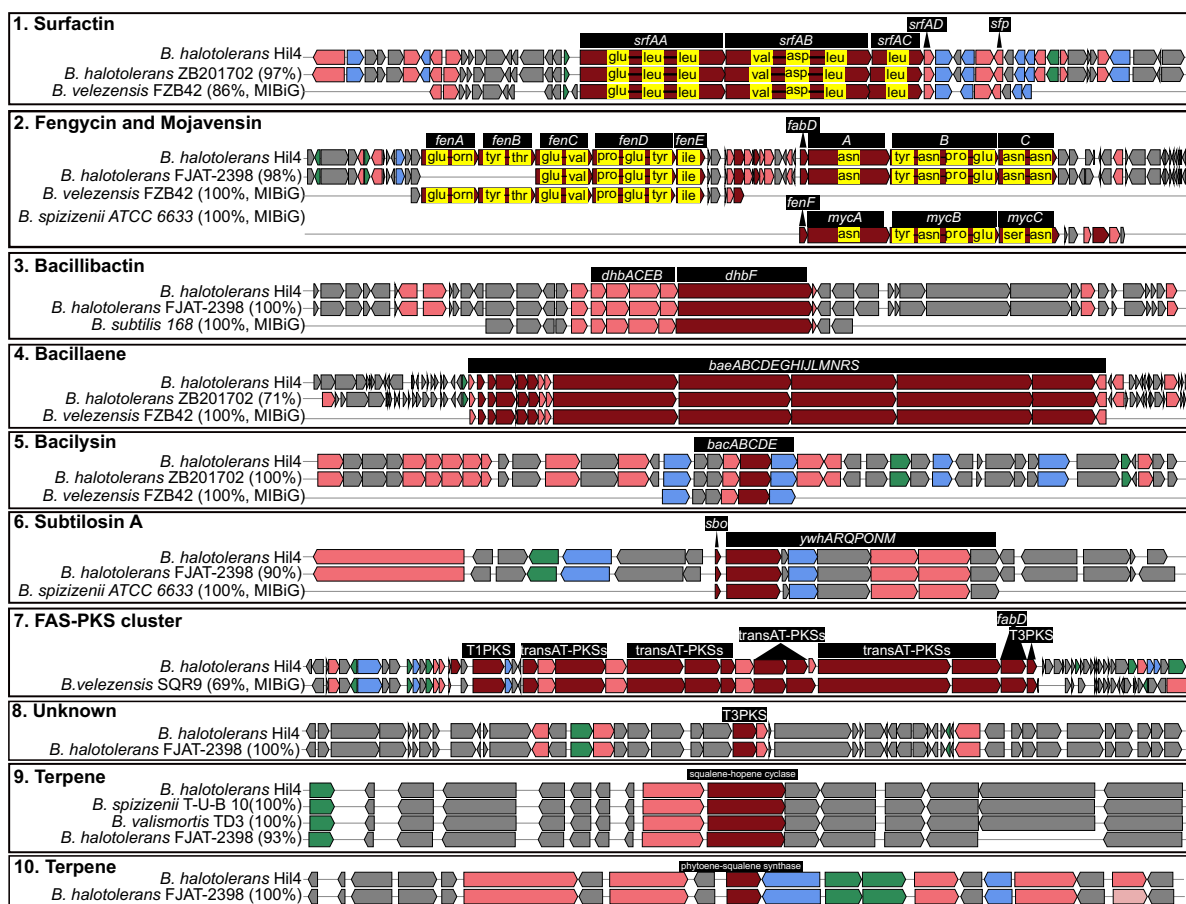
Πίνακας 4.18 Περιγραφή των γενωμικών περιοχών με συστάδες βιοσυνθετικών γονιδίων δευτερογενών μεταβολιτών που εντοπίστηκαν στο γονιδίωμα του ενδοφυτικού βακτηριακού στελέχους Hi14 μέσω της ανάλυσης antiSMASH που χρησιμοποιεί τη βάση δεδομένων MIBiG. PKS:Συνθάση πολυκετιδίου (Polyketide Synthase), NRPS:Συνθετάση μη ριβοσωμικού πεπτιδίου (Non Ribosomal Peptide Synthetase).

Περιοχή	Κωδικός αριθμός παρόμοιας συστάδας γονιδίων MIBiG (% ομοιότητα γονιδίων)	Εκτιμώμενο μέγεθος (bp)	Τύπος	Μεταβολίτης
1	BGC0000433 (86%)	65395	NRPS	Surfactin
2	BGC0001095 (100%)	127469	NRPS	Fengycin
	BGC0001103* (100%)		NRPS, TransAT-PKS	Mycosubtilin*
3	BGC0000309 (100%)	47140	NRPS	Bacillibactin
4	BGC0001089 (100%)	106300	NRPS, TransAT-PKS	Bacillaene
5	BGC0001184 (100%)	41419	other	Bacilysin
6	BGC0000602 (100%)	21613	Sactipeptide	Subtilosin A
7	BGC0001520 (28%)	117782	PKS	Άγνωστος
8	-	40947	T3PKS	Άγνωστος
9	-	21531	Terpene	Terpene (Hopene)
10	-	20807	Terpene	Terpene (Phytoene/Squalene)

*Αυτή η συστάδα γονιδίων αντιστοιχεί στη βιοσύνθεση του μεταβολίτη Mojavensin βάσει της προβλεπόμενης αμινοξικής αλληλουχίας της λειτουργίας NRPS/PKS Monomer Prediction στο antiSMASH (Dunlap et al., 2019)

Μεταξύ των 11 πιθανών μεταβολιτών που ανιχνεύθηκαν περιλαμβάνονταν γνωστοί μεταβολίτες, όπως και μεταβολίτες νέοι ή μεταβολίτες μη καταχωρημένοι στη βάση δεδομένων που χρησιμοποιεί το πρόγραμμα. Δύο συστάδες γονιδίων που φαίνεται να εμπλέκονται στη βιοσύνθεση τερπερίων και μία συστάδα γονιδίων που περιέχει μια συνθάση πολυκετιδίων τύπου III, δεν αντιστοιχούσαν σε κάποιο γνωστό μεταβολίτη της βάσης δεδομένων MIBiG (**Πίνακας 4.18**), αλλά βρέθηκαν σε άλλα στελέχη *B. halotolerans*, *B. subtilis* and *Bacillus valismortis* με 100% ομοιότητα γονιδίων, βάσει της ανάλυσης ClusterBlast. Μία άλλη συστάδα γονιδίων εμφάνισε 28% ομοιότητα γονιδίων με τη συστάδα βιοσυνθετικών γονιδίων του πολυκετιδίου aurantinin (**Πίνακας 4.18**). Η ανάλυση ClusterBlast έδειξε ότι αυτή η συστάδα γονιδίων είχε 69% ομολογία γονιδίων με μία προσφάτως ανακαλυφθείσα συστάδα γονιδίων FAS-PKS του *B. velezensis* SQR9 (**Εικόνα 4.37**), η οποία εμπλέκεται στη βιοσύνθεση των ενώσεων Bacillunoic acids. Περαιτέρω ανάλυση χρησιμοποιώντας το εργαλείο στοίχισης αλληλουχιών του BLASTn ανέδειξε 97.7% νουκλεοτιδική ομολογία μεταξύ των βιοσυνθετικών γονιδίων.

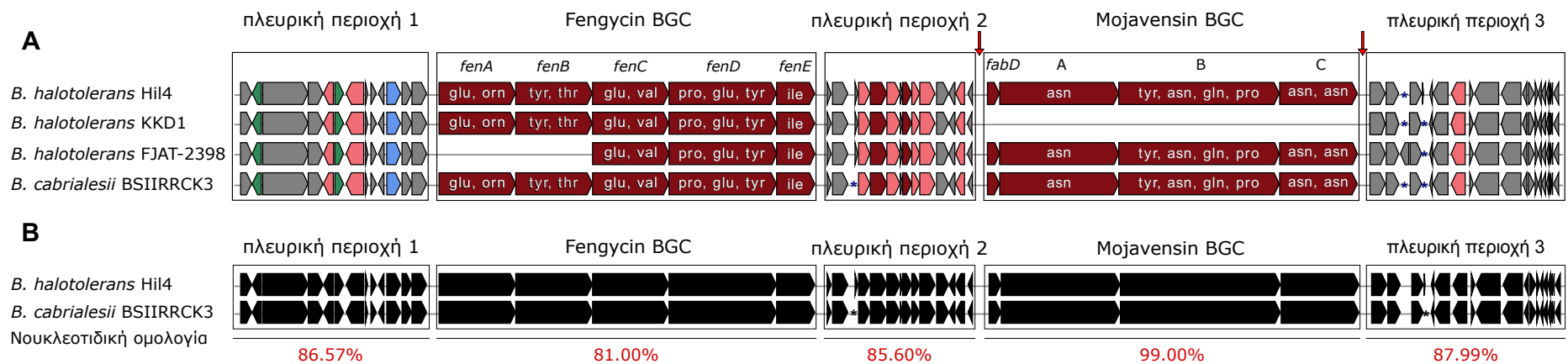
Οι υπολειπόμενες 7 συστάδες παρουσίασαν 100% ομολογία με τις συστάδες που είναι καταχωρημένες στη βάση δεδομένων MIBiG (**Πίνακας 4.18**), εκτός από τη συστάδα βιοσυνθετικών γονιδίων της ένωσης Surfactin (86% ομολογία), ενώ έδειξαν παρόμοια οργάνωση γονιδίων με άλλα στελέχη *B. halotolerans* (**Εικόνα 4.37**). Οι συστάδες αυτές αφορούν γονίδια που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση μη ριβοσωμικών πεπτιδίων, συγκεκριμένα το λιποπεπτίδιο Surfactin, το λιποπεπτίδιο Fengycin και η σιδηροφόρα ένωση Bacillibactin, καθώς και υβριδικών πεπτιδίων που προέρχονται από συνθετάσες μη ριβοσωμικών πεπτιδίων και συνθάσες πολυκετιδίων, συγκεκριμένα το κυκλικό λιποπεπτίδιο Mojavensin και το πεπτίδιο Bacillaene. Ακόμη, ανιχνεύθηκαν συστάδες γονιδίων που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση του μη ριβοσωμικά συντιθέμενου αντιβιοτικού Bacilysin, αλλά και της Subtilosin, η οποία ανήκει στην ομάδα των Sactibiotics της οικογένειας των Bacteriocins.



Εικόνα 4.37 Αποτελέσματα από την ανάλυση του γονιδιώματος του στελέχους Hil4 στην πλατφόρμα antiSMASH για γενομικές περιοχές που περιλαμβάνουν συστάδες βιοσυνθετικών γονιδίων δευτερογενών μεταβολιτών (BGCs) χρησιμοποιώντας τα εργαλεία ClusterBLAST και KnownClusterBLAST. Σχηματική αναπαράσταση των γενομικών περιοχών που εντοπίστηκαν και σύγκριση της συνταίνιας (synteny) μέσω της στοίχισης ίδιων γονιδίων από το στέλεχος Hil4 και του στελέχους με τη μεγαλύτερη ομοιότητα γονιδίων βάσει του ClusterBLAST, καθώς και το κοντινότερο σε ομολογία καταχωρημένο BGC στη βάση δεδομένων MIBiG βάσει του KnownClusterBLAST. Η ομοιότητα της οργάνωσης των γονιδίων (%) με το στέλεχος Hil4 φαίνεται στις παρενθέσεις. Βασικά βιοσυνθετικά γονίδια απεικονίζονται με καφέ χρώμα, επιπρόσθετα βιοσυνθετικά γονίδια με ροζ χρώμα, γονίδια σχετικά με μεταφορά με γαλάζιο χρώμα, ρυθμιστικά γονίδια με πράσινο χρώμα και άλλα γονίδια με γκρι χρώμα. Τα ονόματα βασικών βιοσυνθετικών γονιδίων παρουσιάζονται σε μαύρα ορθογώνια, ενώ η αμινοξική ακολουθία των κυκλικών λιποπεπτιδίων σε κίτρινα ορθογώνια μέσα στο αντίστοιχο γονίδιο συνθέτασης. Περισσότερες πληροφορίες για τις συστάδες και τους μεταβολίτες δίνονται στον Πίνακα 4.18.

Η περιοχή 2 (Πίνακας 4.18) αναγνωρίστηκε ως περιοχή που περιλαμβάνει τη συστάδα των βιοσυνθετικών γονιδίων της ένωσης Fengycin, ωστόσο περιείχε δύο γειτονικές συστάδες γονιδίων, μία για τη βιοσύνθεση της ένωσης Fengycin και μία για τη βιοσύνθεση της ένωσης Mojavensin (Εικόνα 4.37). Η BGC της ένωσης Mojavensin παρουσίασε 100% ομολογία γονιδίων με αυτή της ένωσης Mycosubtilin, 60% ομολογία γονιδίων με τη Bacillomycin D και 44% ομολογία γονιδίων με την Iturin, σύμφωνα με το εργαλείο KnownClusterBlast του antiSMASH. Ωστόσο, σύμφωνα με την προβλεπόμενη αμινοξική αλληλουχία του λιποπεπτιδίου καταδεικνύεται ότι η συστάδα γονιδίων εμπλέκεται στη βιοσύνθεση της ένωσης Mojavensin, λόγω της παρουσίας των Asn₆ and Asn₇ (Dunlap et al., 2019). Έτσι, φαίνεται πως η συστάδα γονιδίων που εμπλέκεται στη βιοσύνθεση της Mojavensin δεν είναι καταχωρημένη στη βάση δεδομένων MIBiG. Μέσω του εργαλείου ClusterBlast παρατηρήθηκε πως τα βασικά βιοσυνθετικά γονίδια της Mojavensin, που αποτελούν τη συστάδα, δεν υπάρχουν σε όλα τα στελέχη *B. halotolerans*. Στη συνέχεια, συγκρίθηκαν τα γονίδια της

συγκεκριμένης περιοχής διάφορων στελεχών *B. halotolerans*, ενώ πραγματοποιήθηκε και αναζήτηση των γονιδίων και των πρωτεϊνών που βρίσκονται στη συγκεκριμένη περιοχή του Hil4 στο BLAST. Αυτές οι αναλύσεις οδήγησαν στην ανακάλυψη πως τα γονίδια εκατέρωθεν των βασικών βιοσυνθετικών γονιδίων, δηλαδή οι πλευρικές περιοχές (flanking regions), εντοπίζονται και στα στελέχη που δεν έχουν τα βασικά βιοσυνθετικά γονίδια. Για παράδειγμα, τα βασικά γονίδια που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση της Mojavensin υπάρχουν στο γονιδίωμα του στελέχους Hil4 και *B. halotolerans* FJAT-2398, αλλά όχι στο γονιδίωμα του στελέχους *B. halotolerans* KKD1, ενώ τα γονίδια της εκατέρωθεν περιοχής (πλευρική περιοχή 2 και 3) υπάρχουν και στα τρία στελέχη, με εξαίρεση 3 γονίδια (μπλε αστερίσκοι) (**Εικόνα 4.38**). Με τη στοίχιση των ίδιων γονιδίων μεταξύ των στελεχών αυτών, αποκαλύπτεται η πανομοιότυπη οργάνωση των γονιδίων στην περιοχή, καθώς και το πιθανό σημείο ένθεσης των βασικών βιοσυνθετικών γονιδίων της ένωσης Mojavensin (κόκκινα βέλη) (**Εικόνα 4.38**). Κατά την αναζήτηση των πρωτεϊνών της συστάδας της ένωσης Mojavensin από το στέλεχος Hil4 στο BLAST, παρατηρήθηκε πως στελέχη του είδους *Bacillus cabrialesii* είχαν τη συγκεκριμένη συστάδα με ομολογία μεγαλύτερη από 98%, σε αντίθεση με άλλα στελέχη του γένους *Bacillus* που είχαν ομολογία κάτω από 92%. Σύγκριση ολόκληρης της περιοχής που περιέχει τις συστάδες γονιδίων των ενώσεων Fengycin και Mojavensin μεταξύ του στελέχους Hil4 και *B. cabrialesii* BSIIRCK3, αποκάλυψε πανομοιότυπη οργάνωση των γονιδίων, τόσο στις πλευρικές περιοχές (1, 2 και 3), όσο και στις συστάδες βιοσυνθετικών γονιδίων (**Εικόνα 4.38**). Στοίχιση των επιμέρους νουκλεοτιδικών περιοχών με το εργαλείο στοίχισης του BLASTn έδειξε 81% ομολογία στη συστάδα βιοσυνθετικών γονιδίων της ένωσης Fengycin, 86.57%, 85.60% και 87.99% στις πλευρικές περιοχές 1,2 και 3, αντίστοιχα, ενώ έδειξε 99% ομολογία στη συστάδα βιοσυνθετικών γονιδίων της ένωσης Mojavensin (**Εικόνα 4.38**).



Εικόνα 4.38 Σχηματική αναπαράσταση και σύγκριση της οργάνωσης και ομολογίας γονιδίων στις συστάδες βιοσυνθετικών γονιδίων των μεταβολιτών Fengycin και Mojavensin του στελέχους Hil4 και παραδείγματα στελεχών από τα είδη *Bacillus halotolerans* και *Bacillus cabrialesii*. Τα σχήματα κατασκευάστηκαν με βάση τα αποτελέσματα antiSMASH, καθώς και ανάλυση BLASTn και BLASTp. Α) Σύνταξη της περιοχής που περιλαμβάνει τις συστάδες βιοσυνθετικών γονιδίων των μεταβολιτών Fengycin και Mojavensin. Βασικά βιοσυνθετικά γονίδια απεικονίζονται με καφέ χρώμα, επιπρόσθετα βιοσυνθετικά γονίδια με ροζ χρώμα, γονίδια σχετικά με μεταφορά με γαλάζιο χρώμα, ρυθμιστικά γονίδια με πράσινο χρώμα και άλλα γονίδια με γκρι χρώμα. Γνωστά βασικά βιοσυνθετικά γονίδια ονομάζονται, ενώ προβλεπόμενα αμινοξέα του τελικού μεταβολίτη σημειώνονται μέσα στα αντίστοιχα γονίδια των συστημάτων με λευκό χρώμα. Κάθε πλευρική περιοχή και συστάδα των βασικών βιοσυνθετικών γονιδίων περιλαμβάνεται σε μαύρο ορθογώνιο, ενώ το πιθανό σημείο ένθεσης της ένωσης mojavensin υποδεικνύεται με κόκκινα βέλη. Απόντα γονίδια από τις πλευρικές περιοχές καταδεικνύονται με μπλε αστέρισκους. Β) Σύγκριση της νουκλεοτιδικής ομολογίας της κάθε υποπεριοχής στην γενωμική περιοχή όπου βρίσκονται οι συστάδες βιοσυνθετικών γονιδίων των μεταβολιτών Fengycin και Mojavensin των στελεχών *B. halotolerans* Hil4 και *B. cabrialesii* BSIIRCK3.

4.4.2.2 Στέλεχος Hir139

Στο γονιδίωμα του στελέχους Hir139 ταυτοποιήθηκαν 13 περιοχές με συστάδες βιοσυνθετικών γονιδίων για δευτερογενείς μεταβολίτες, μέσα στις οποίες περιλαμβάνονταν συστάδες για 15 πιθανούς μεταβολίτες, καθώς σε δύο περιοχές (περιοχή 2 και 3) ανιχνεύθηκαν δύο διαφορετικές συστάδες γονιδίων (Πίνακας 4.19).

Πίνακας 4.19 Περιγραφή των γενωμικών περιοχών με συστάδες βιοσυνθετικών γονιδίων δευτερογενών μεταβολιτών που εντοπίστηκαν στο γονιδίωμα του ενδοφυτικού βακτηριακού στελέχους Hir139 μέσω της ανάλυσης antiSMASH που χρησιμοποιεί τη βάση δεδομένων MIBiG. PKS:Συνθάση πολυκετιδίου (Polyketide Synthase), NRPS:Συνθετάση μη ριβοσωμικού πεπτιδίου (Non Ribosomal Peptide Synthetase), RiPP: Ριβοσωμικά συντιθέμενο και μετα-μεταφραστικά τροποποιημένο πεπτιδιο (Ribosomally synthesised and Post-translationally modified Peptide), LAP: Πεπτιδία που περιέχουν αζόλες (Linear Azol(in)e-containing Peptides).

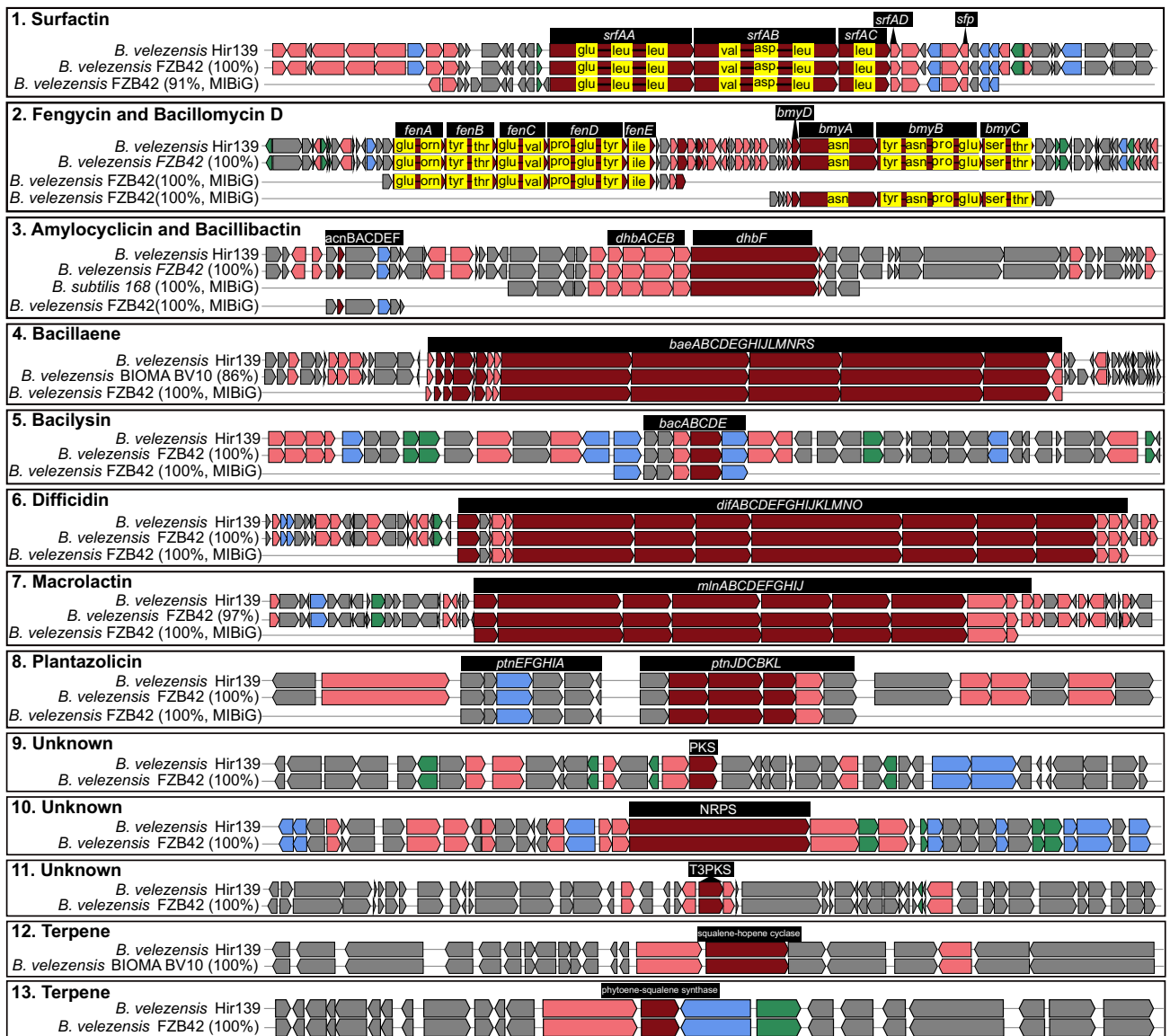
Περιοχή	Κωδικός αριθμός παρόμοιας συστάδας γονιδίων MIBiG (% ομοιότητα γονιδίων)	Εκτιμώμενο μέγεθος (bp)	Προβλεπόμενο προϊόν συστάδας	Μεταβολίτης
1	BGC0000433 (91%)	65408	NRPS	Surfactin
2	BGC0001095 (100%)	137458	NRPS	Fengycin
	BGC0001090 (100%)		NRPS, TransAT-PKS	Bacillomycin D
3	BGC0000309 (100%)	50505	NRPS	Bacillibactin
	BGC0000616 (100%)		RiPP-like	Amylocyclin
4	BGC0001089 (100%)	100603	NRPS, TransAT-PKS	Bacillaene
5	BGC0001184 (100%)	41419	other	Bacilysin
6	BGC0000181 (100%)	88228	transAT-PKS	Macrolactin H
7	BGC0000176 (100%)	92388	transAT-PKS	Difficidin
8	BGC0000569 (100%)	23178	RiPP:LAP	Plantazolicin
9	BGC0000693 (7%)	41245	PKS-like	Άγνωστος
10	-	50236	NRPS	Άγνωστος
11	-	40273	T3PKS	Άγνωστος
12	-	20131	Terpene	Hopene
13	-	20741	Terpene	Terpene (Squalene/Phytoene)

Μεταξύ των 15 πιθανών μεταβολιτών που ανιχνεύθηκαν περιλαμβάνονταν γνωστοί μεταβολίτες, όπως και μεταβολίτες νέοι ή μεταβολίτες μη καταχωρημένοι στη βάση δεδομένων που χρησιμοποιεί το πρόγραμμα.

Οι 10 συστάδες γνωστών μεταβολιτών παρουσίασαν 100% ομολογία με τις συστάδες που είναι καταχωρημένες στη βάση δεδομένων MIBiG (Πίνακας 4.19), εκτός από τη συστάδα βιοσυνθετικών γονιδίων της ένωσης Surfactin (91% ομολογία), ενώ έδειξαν παρόμοια οργάνωση γονιδίων με άλλα στελέχη *B. velezensis* (Εικόνα 4.39). Οι συστάδες αυτές αφορούν γονίδια που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση μη ριβοσωμικών πεπτιδίων, συγκεκριμένα το λιποπεπτίδιο Surfactin, το λιποπεπτίδιο Fengycin και η σιδηροφόρα ένωση Bacillibactin, καθώς και των υβριδικών πεπτιδίων που προέρχονται από συνθετάσες μη ριβοσωμικών πεπτιδίων και συνθάσες πολυκετιδίων, συγκεκριμένα το κυκλικό λιποπεπτίδιο Bacillomycin D και το πεπτιδιο Bacillaene. Στην περιοχή που ανιχνεύθηκε η συστάδα της σιδηροφόρου ένωσης Bacillibactin, ανιχνεύθηκε και άλλη μία συστάδα, η οποία εμπλέκεται στη βιοσύνθεση της ένωσης Amylocyclin. Αυτή η ένωση ανήκει στη γενικότερη κατηγορία των ριβοσωμικά συντιθέμενων και μετα-μεταφραστικά τροποποιημένων πεπτιδίων και συγκεκριμένα στην οικογένεια των Circular Bacteriocins. Επίσης, ανιχνεύθηκαν συστάδες

βιοσυνθετικών γονιδίων ενώσεων της κατηγορίας των πολυκετιδίων, και συγκεκριμένα των ενώσεων Difficidin και Macrolactin. Τέλος, ανιχνεύθηκαν συστάδες γονιδίων που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση του μη ριβοσωμικά συντιθέμενου αντιβιοτικού Bacilysin, αλλά και της ένωσης Plantazolicin, η οποία κατατάσσεται στη γενική κατηγορία των ριβοσωμικά συντιθέμενων και μετα-μεταφραστικά τροποποιημένων πεπτιδίων και συγκεκριμένα στην κατηγορία των πεπτιδίων που περιέχουν αζόλες (LAPs) της οικογένειας των Microcins (Bacteriocins).

Ακόμη, ανιχνεύθηκαν μία συστάδα γονιδίων που περιέχει μια συνθάση πολυκετιδίων τύπου III και μία συστάδα γονιδίων που περιέχει μία συνθετάση μη ριβοσωμικού πεπτιδίου οι οποίες δεν αντιστοιχούσαν σε κάποιο γνωστό μεταβολίτη της βάσης δεδομένων MIBiG, αλλά βρέθηκαν σε άλλα στελέχη *B. velezensis* με 88-100% ομοιότητα γονιδίων, βάσει της ανάλυσης ClusterBlast, αντιπροσωπεύοντας ίσως ενώσεις που δεν έχουν ανακαλυφθεί και χαρακτηριστεί ακόμη. Μία άλλη συστάδα γονιδίων εμφάνισε 7% ομοιότητα γονιδίων με τη συστάδα βιοσυνθετικών γονιδίων του αμινογλυκοσιδικού αντιβιοτικού Butiroticin που είναι καταχωρημένη στη βάση δεδομένων MIBiG (**Πίνακας 4.19**), με όμοια να είναι μόνο δύο γονίδια που αφορούσαν πρωτεΐνες-μεταφορείς στο ένα άκρο της συστάδας (**Εικόνα 4.39**). Αυτή η συστάδα εντοπίστηκε και σε άλλα στελέχη *B. velezensis* με 100% ομολογία γονιδίων μεταξύ των στελεχών, ενώ αναζήτηση BLASTp και BLASTn, καθώς και ανάλυση με τα εργαλεία αμινοξικής και νουκλεοτιδικής στοίχισης, αποκάλυψε αμινοξική και νουκλεοτική ομοιότητα 98-100% μεταξύ των στελεχών *B. velezensis* και *B. amyloliquefaciens* για όλη τη συστάδα. Ακόμη, περιέχει ένα γονίδιο που κωδικοποιεί για συνθάση πολυκετιδίου, οπότε ίσως αφορά κάποιο μεταβολίτη που δεν έχει χαρακτηριστεί έως τώρα. Τέλος, ανιχνεύθηκαν δύο συστάδες γονιδίων που φαίνεται να εμπλέκονται στη βιοσύνθεση τερπενίων (**Πίνακας 4.19**).



Εικόνα 4.39 Αποτελέσματα από την ανάλυση του γονιδιώματος του στελέχους Hir139 στην πλατφόρμα antiSMASH για γενωμικές περιοχές που περιλαμβάνουν συστάδες βιοσυνθετικών γονιδίων δευτερογενών μεταβολιτών (BGCs) χρησιμοποιώντας τα εργαλεία ClusterBLAST και KnownClusterBLAST. Σχηματική αναπαράσταση των γενωμικών περιοχών που εντοπίστηκαν και σύγκριση της συντανίας (synteny) μέσω της στοίχισης ίδιων γονιδίων από το στέλεχος Hil4 και του στελέχους με τη μεγαλύτερη ομοιότητα γονιδίων βάσει του ClusterBLAST, καθώς και το κοντινότερο σε ομολογία καταχωρημένο BGC στη βάση δεδομένων MIBiG βάσει του KnownClusterBLAST. Η ομοιότητα της οργάνωσης των γονιδίων (%) με το στέλεχος Hir139 φαίνεται στις παρενθέσεις. Βασικά βιοσυνθετικά γονίδια απεικονίζονται με καφέ χρώμα, επιπρόσθετα βιοσυνθετικά γονίδια με ροζ χρώμα, γονίδια σχετικά με μεταφορά με γαλάζιο χρώμα, ρυθμιστικά γονίδια με πράσινο χρώμα και άλλα γονίδια με γκρι χρώμα. Τα ονόματα βασικών βιοσυνθετικών γονιδίων παρουσιάζονται σε μαύρα ορθογώνια, ενώ η αμινοξική ακολουθία των κυκλικών λιποπεπτιδίων σε κίτρινα ορθογώνια μέσα στο αντίστοιχο γονίδιο συνθετάσης. Περισσότερες πληροφορίες για τις συστάδες και τους μεταβολίτες δίνονται στον Πίνακα 4.19.

4.4.2.3 Στέλεχος Tel34

Στο γονιδίωμα του στελέχους Tel34 ταυτοποιήθηκαν 10 περιοχές με συστάδες βιοσυνθετικών γονιδίων για δευτερογενείς μεταβολίτες, μέσα στις οποίες περιλαμβάνονταν συστάδες για 11 πιθανούς μεταβολίτες, καθώς σε μία περιοχή εντοπίστηκαν δύο διαφορετικές συστάδες γονιδίων (Πίνακας 4.20).

Πίνακας 4.20 Περιγραφή των των γενωμικών περιοχών με συστάδες βιοσυνθετικών γονιδίων δευτερογενών μεταβολιτών που εντοπίστηκαν στο γονιδίωμα του ενδοφυτικού βακτηριακού στελέχους Tel34 μέσω της ανάλυσης antiSMASH που χρησιμοποιεί τη βάση δεδομένων MIBiG. NRPS:Συνθετάση μη ριβοσωμικού πεπτιδίου (Non Ribosomal Peptide Synthetase), RiPP: Ριβοσωμικά συντιθέμενο και μετα-μεταφραστικά τροποποιημένο πεπτιδίο (Ribosomally synthesised and Post-translationally modified Peptide), RRE: Rev Response Element.

Περιοχή	Κωδικός αριθμός παρόμοιας συστάδας γονιδίων MIBiG (% ομοιότητα γονιδίων)	Εκτιμώμενο μέγεθος (bp)	Προβλεπόμενο προϊόν συστάδας	Μεταβολίτης
1	BGC0000381 (85%)	83713	NRPS	Surfactin
2	BGC0001185 (100%)	47149	NRPS	Bacillibactin
3	BGC0001184 (85%)	41422	other	Bacilysin
4	-	10327	RiPP like	Safencin
5	-	10399	RiPP like	Cyclic bacteriocin (uberolysin/carnocyclin family)
6	BGC0000645 (50%)	28370	Terpene	Carotenoid (squalene/phytoene)
	-		Siderophore	Siderophore (IucA/IucC family)
7	-	20906	RRE containing	Άγνωστος
8	-	30862	Betalactone	Άγνωστος
9	-	41101	T3PKS	Άγνωστος
10	-	21875	Terpene	Hopene

Μεταξύ των 11 πιθανών μεταβολιτών που ανιχνεύθηκαν περιλαμβάνονταν γνωστοί μεταβολίτες, όπως και νέοι μεταβολίτες ή μεταβολίτες μη καταχωρημένοι στη βάση δεδομένων που χρησιμοποιεί το πρόγραμμα (Πίνακας 4.19). Οι 4 συστάδες που είχαν αντιστοιχία με καταχωρημένη συστάδα MIBiG παρουσίασαν 50-85% ομολογία με τις συστάδες που είναι καταχωρημένες στη βάση δεδομένων MIBiG (Πίνακας 4.20), ενώ έδειξαν παρόμοια οργάνωση γονιδίων με άλλα στελέχη *B. safensis*, *B. pumilus* ή *B. altitudinis* (Εικόνα 4.40). Ανιχνεύθηκε μία συστάδα γονιδίων που είχε 85% ομοιότητα γονιδίων με την καταχωρημένη συστάδα της ένωσης Lichenysin, μέλος της οικογένειας των Surfactins, ενώ έδειξε 94% ομολογία γονιδίων με άλλα στελέχη των κοντινά φυλογενετικά ειδών *B. safensis*, *B. pumilus* και *B. altitudinis*. Η παρουσία δύο επιπλέον βιοσυνθετικών γονιδίων σε σχέση με τις συστάδες που αφορούν τη βιοσύνθεση των ενώσεων Surfactin και Lichenysin σε συνδυασμό με την προβλεπόμενη αμινοξική αλληλουχία κατέδειξαν πως αυτή η ένωση αντιστοιχεί στην Pumilacidin που απαντάται σε στελέχη *B. safensis* και *B. pumilus* (Naruse et al., 1990; Peyroux et al., 1999; Xiu et al., 2017), η οποία δεν είναι καταχωρημένη στη βάση δεδομένων MIBiG, ενώ τα βασικά βιοσυνθετικά γονίδια ονομάζονται ως *pmlAA*, *pmlAB*, *pmlAC*, *pmlAD* στην παρούσα μελέτη. Σε σύγκριση με τις συστάδες γονιδίων που αφορούν τη βιοσύνθεση των ενώσεων Surfactin και Lichenysin οι οποίες περιέχουν τα γονίδια που κωδικοποιούν τις υπομονάδες της συνθετάσης, η συστάδα της Pumilacidin έχει δύο επιπλέον μη χαρακτηρισμένα γονίδια, που ονομάστηκαν από άλλες μελέτες ως *orfX* και *orfY* (Domingos et al., 2015; Saggese et al., 2018) (Εικόνα 4.40). Αρκετά στελέχη *B. safensis* και κάποια *B. pumilus* εμφανίζουν μία πρόσθετη περιοχή με γονίδια μεταξύ του γονιδίου *pmlAD* και *ycxC* (Saggese et al., 2018), το οποίο δεν παρατηρείται στο στέλεχος Tel34 (Εικόνα 4.40). Επιπλέον, έχουν παρατηρηθεί στελέχη *B. safensis* που διαθέτουν πρωτεϊνική επικράτεια επιμερισμού αντί για

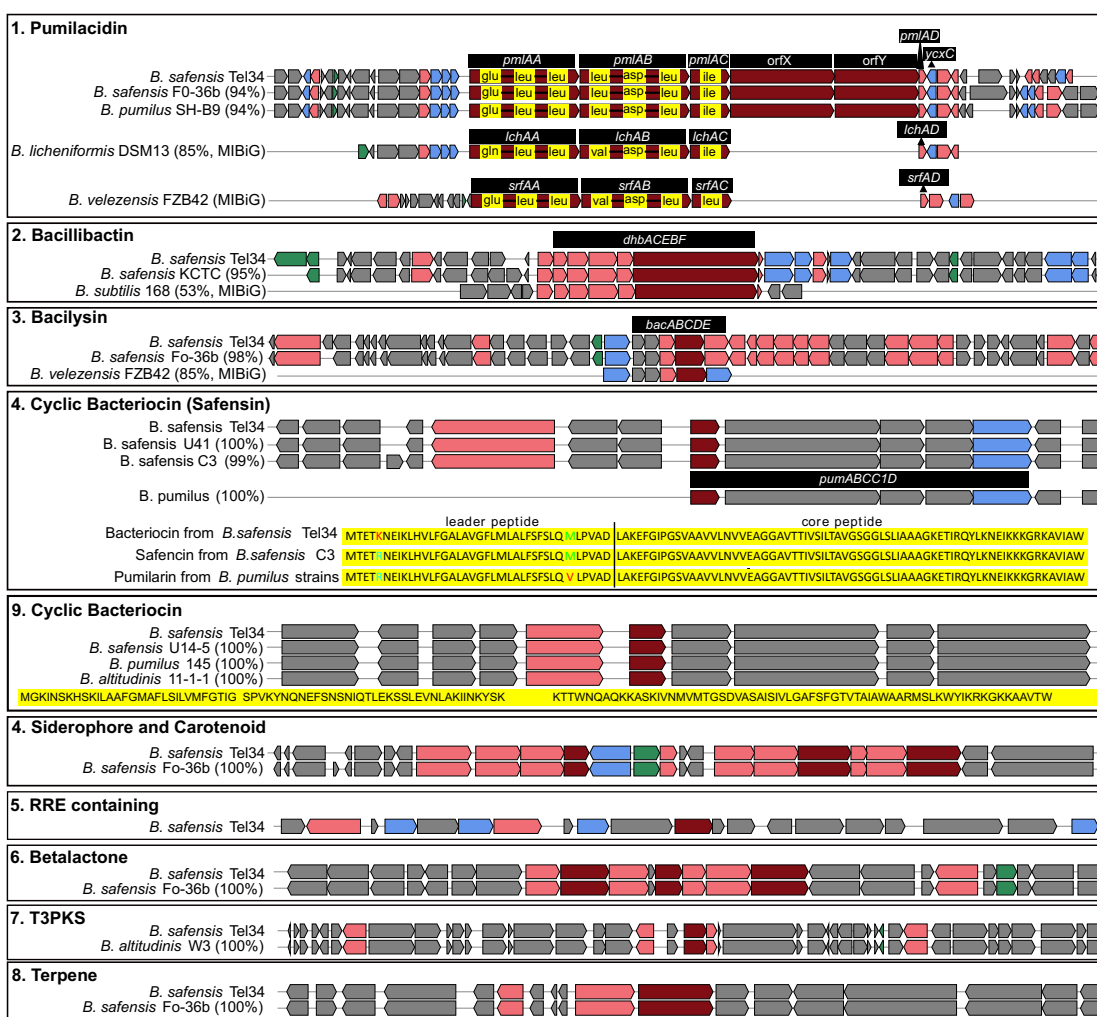
συμπύκνωσης στην έβδομη επικράτεια της συστάδας (Saggese et al., 2018), κάτι που επίσης δεν παρατηρήθηκε στο συγκεκριμένο στέλεχος.

Η συστάδα γονιδίων βιοσύνθεσης του μη ριβοσωμικού πεπτιδίου Bacilibactin, που λειτουργεί ως σιδηροφόρος ένωση, έδειξε ομολογία γονιδίων 53% με τη συστάδα που είναι καταχωρημένη στη βάση δεδομένων, αλλά 100% ομοιότητα με τα βασικά βιοσυνθετικά γονίδια, ενώ έδειξε 92-95% ομολογία γονιδίων με άλλα στελέχη του είδους *B. safensis*. Τέλος, ανιχνεύθηκε μία συστάδα γονιδίων που εμπλέκεται στη βιοσύνθεση του μη ριβοσωμικά συντιθέμενου αντιβιοτικού Bacilysin, η οποία έδειξε ομολογία γονιδίων 85% με τη συστάδα που είναι καταχωρημένη στη βάση δεδομένων, ενώ έδειξε 100% ομολογία γονιδίων με άλλα στελέχη του είδους *B. safensis*. Παρ'όλο που η ομολογία με τις καταχωρημένες συστάδες στη MIBiG φαίνεται μικρή για τις δύο τελευταίες συστάδες, τα βασικά βιοσυνθετικά γονίδια των συστάδων που παρουσιάζονται είναι παρόντα. Αντίθετα, ένα αποτέλεσμα του antiSMASH για παρουσία της συστάδας βιοσύνθεσης της Fengycin κρίθηκε άκυρο, καθώς η ομολογία των γονιδίων ήταν στο άκρο της περιοχής και τα βασικά βιοσυνθετικά γονίδια δεν υπήρχαν.

Ακόμη, ανιχνεύθηκαν δύο συστάδες βιοσυνθετικών γονιδίων ριβοσωμικά συντιθέμενων αντιβιοτικών πεπτιδίων που ονομάζονται Circular Bacteriocins, οι οποίες παρουσίασαν 100% ομολογία οργάνωσης γονιδίων με αντίστοιχες συστάδες γονιδίων στελεχών *B. safensis*. Μετά από BLASTp ανάλυση του κύριου βιοσυνθετικού γονιδίου της βακτηριοσίνης από την περιοχή 4 (**Πίνακας 4.20**) βρέθηκε πως το πρωτεϊνικό προϊόν είναι σχεδόν όμοιο (1 αμινοξύ διαφορά) με το προϊόν του αντίστοιχου γονιδίου της συστάδας για την ένωση Safencin (**Εικόνα 4.40**), μία καινούργια βακτηριοσίνη που ανιχνεύθηκε στο στέλεχος *B. safensis* C3 και έχει αμινοξική και δομική ομοιότητα με τη γνωστή Enterocin AS-48 από το είδος *Enterococcus faecalis* (Fields et al., 2018; Romero-Severson et al., 2021). Η Safencin είναι ίδια με την ένωση Pumilarin του είδους *B. pumilus* με τη διαφορά τους να έγκειται σε ένα αμινοξύ (van Heel et al., 2017; Romero-Severson et al., 2021) (**Εικόνα 4.40**). Όσον αφορά την δεύτερη προβλεπόμενη κυκλική βακτηριοσίνη της οποίας η συστάδα βιοσυνθετικών γονιδίων ανιχνεύθηκε στην περιοχή 5 (**Πίνακας 4.20**), 2 ακόμα στελέχη *B. safensis* έχουν την ίδια αμινοξική αλληλουχία (TS3, B4107), 6 στελέχη *B. safensis* βρέθηκαν με διαφορά σε 1 αμινοξύ και 2 στελέχη *B. safensis* βρέθηκαν με διαφορά σε 2 αμινοξέα, ενώ η επόμενη διαφορά σε 7 αμινοξέα σηματοδοτεί την αλλαγή του είδους σε *B. stratosphericus*, σύμφωνα με την ανάλυση BLASTp. Ανάλυση BLASTn στη νουκλεοτιδική αλληλουχία αποκάλυψε ομοιότητα 99.75% και 98.25% με γονίδια των *B. safensis* U14-5 και IDN1, αντίστοιχα, ενώ ομοιότητα 97.99% ανιχνεύθηκε με το *B. pumilus* EB130.

Η επόμενη περιοχή περιέχει δύο συστάδες γονιδίων, μία που περιέχει δύο συνθάσες σιδηροφόρου ένωσης και δεν έχει κάποια αντιστοίχιση σε γνωστό μεταβολίτη στη βάση MIBiG, και μία που περιέχει τη συνθάση του τερπενίου σκουαλενίου/φυτοενίου, η οποία έχει αντιστοίχιση στη βάση δεδομένων. Αυτή η περιοχή υπάρχει σε άλλα στελέχη *B. safensis* με ομοιότητα γονιδίων 100%. Οι ακόλουθες 4 συστάδες βιοσυνθετικών γονιδίων δεν είχαν κάποια αντιστοιχία γνωστής συστάδας στη βάση δεδομένων MIBiG. Εντοπίστηκε μια συστάδα γονιδίων που περιέχει ένα από τα γονίδια που

εμπλέκεται στη βιοσύνθεση της αντιοξειδωτικής ένωσης πυρρολοκινολίνη κινόνη (pyrroloquinoline quinone, PQQ). Η συγκεκριμένη περιοχή (Περιοχή 7) εμφάνισε 16-18% ομοιότητα γονιδίων με στελέχη του είδους *B. cereus*, η οποία αντιστοιχεί στην αρχή της περιοχής και όχι στο βιοσυνθετικό γονίδιο της ένωσης PQQ. Ακόμη, ανιχνεύθηκε και μια συστάδα γονιδίων που περιέχει τη συνθάση του α-ακετολακτικού οξέος (α-acetolactate) (Περιοχή 8), το οποίο ένζυμο συμμετέχει στη βιοσύνθεση των διακλαδισμένων αμινοξέων, αλλά και στο βιοσυνθετικό μονοπάτι της ένωσης Acetoin, ρυθμιστή της φυτικής ανάπτυξης. Η συστάδα αυτή εμφάνισε 87-96% ομοιότητα με τις αντίστοιχες συστάδες γονιδίων στελεχών *B. safensis* και *B. pumilus*. Τέλος, μία συστάδα γονιδίων που φαίνεται να εμπλέκεται πιθανώς στη βιοσύνθεση του τερπενίου Hopene και μία συστάδα γονιδίων που περιέχει μια συνθάση πολυκετιδίων τύπου III (T3PKS) βρέθηκαν σε άλλα στελέχη *B. altitudinis* και *B. safensis*, αντίστοιχα, με 100% ομοιότητα γονιδίων, βάσει της ανάλυσης ClusterBlast.



Εικόνα 4.40 Αποτελέσματα από την ανάλυση του γονιδιώματος του στελέχους Tel34 στην πλατφόρμα antiSMASH για γενομικές περιοχές που περιλαμβάνουν συστάδες βιοσυνθετικών γονιδίων δευτερογενών μεταβολιτών (BGCs) χρησιμοποιώντας τα εργαλεία ClusterBLAST και KnownClusterBLAST. Σχηματική αναπαράσταση των γενομικών περιοχών που εντοπίστηκαν και σύγκριση της συντανίας (synteny) μέσω της στοίχισης ίδιων γονιδίων από το στέλεχος Hil4 και του στελέχους με τη μεγαλύτερη ομοιότητα γονιδίων βάσει του ClusterBLAST, καθώς και το κοντινότερο σε ομολογία καταχωρημένο BGC στη βάση δεδομένων MIBiG βάσει του KnownClusterBLAST. Η ομοιότητα της οργάνωσης των γονιδίων (%) με το στέλεχος Tel34 φαίνεται στις παρενθέσεις. Βασικά βιοσυνθετικά γονίδια απεικονίζονται με καφέ χρώμα, επιπρόσθετα βιοσυνθετικά γονίδια με ροζ χρώμα, γονίδια σχετικά με μεταφορά με γαλάζιο χρώμα, ρυθμιστικά γονίδια με πράσινο χρώμα και άλλα γονίδια με γκρι χρώμα. Τα ονόματα βασικών βιοσυνθετικών γονιδίων παρουσιάζονται σε μαύρα ορθογώνια και η αμινοξική αλληλουχία προϊόντων Bacteriocins σε κίτρινο ορθογώνιο. Περισσότερες πληροφορίες για τις συστάδες και τους μεταβολίτες δίνονται στον Πίνακα 4.20.

4.4.2.4 Στέλεχος Tel52

Στο γονιδίωμα του στελέχους Tel52 ταυτοποιήθηκαν 13 περιοχές με συστάδες γονιδίων που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση δευτερογενών μεταβολιτών. Σε δύο από τις περιοχές αυτές (περιοχή 2 και 3) εντοπίστηκαν δύο διαφορετικές BGCs, κι έτσι οι συνολικές BGCs που ανιχνεύθηκαν ήταν 15 συνολικά (Πίνακας 4.21).

Πίνακας 4.21 Περιγραφή των των γενωμικών περιοχών με συστάδες βιοσυνθετικών γονιδίων δευτερογενών μεταβολιτών που εντοπίστηκαν στο γονιδίωμα του ενδοφυτικού βακτηριακού στελέχους Tel52 μέσω της ανάλυσης antiSMASH που χρησιμοποιεί τη βάση δεδομένων MIBiG. PKS:Συνθάση πολυκετιδίου (Polyketide Synthase), NRPS:Συνθέταση μη ριβοσωμικού πεπτιδίου (Non Ribosomal Peptide Synthetase), RiPP: Ριβοσωμικά συντιθέμενο και μετα-μεταφραστικά τροποποιημένο πεπτίδιο (Ribosomally synthesised and Post-translationally modified Peptide).

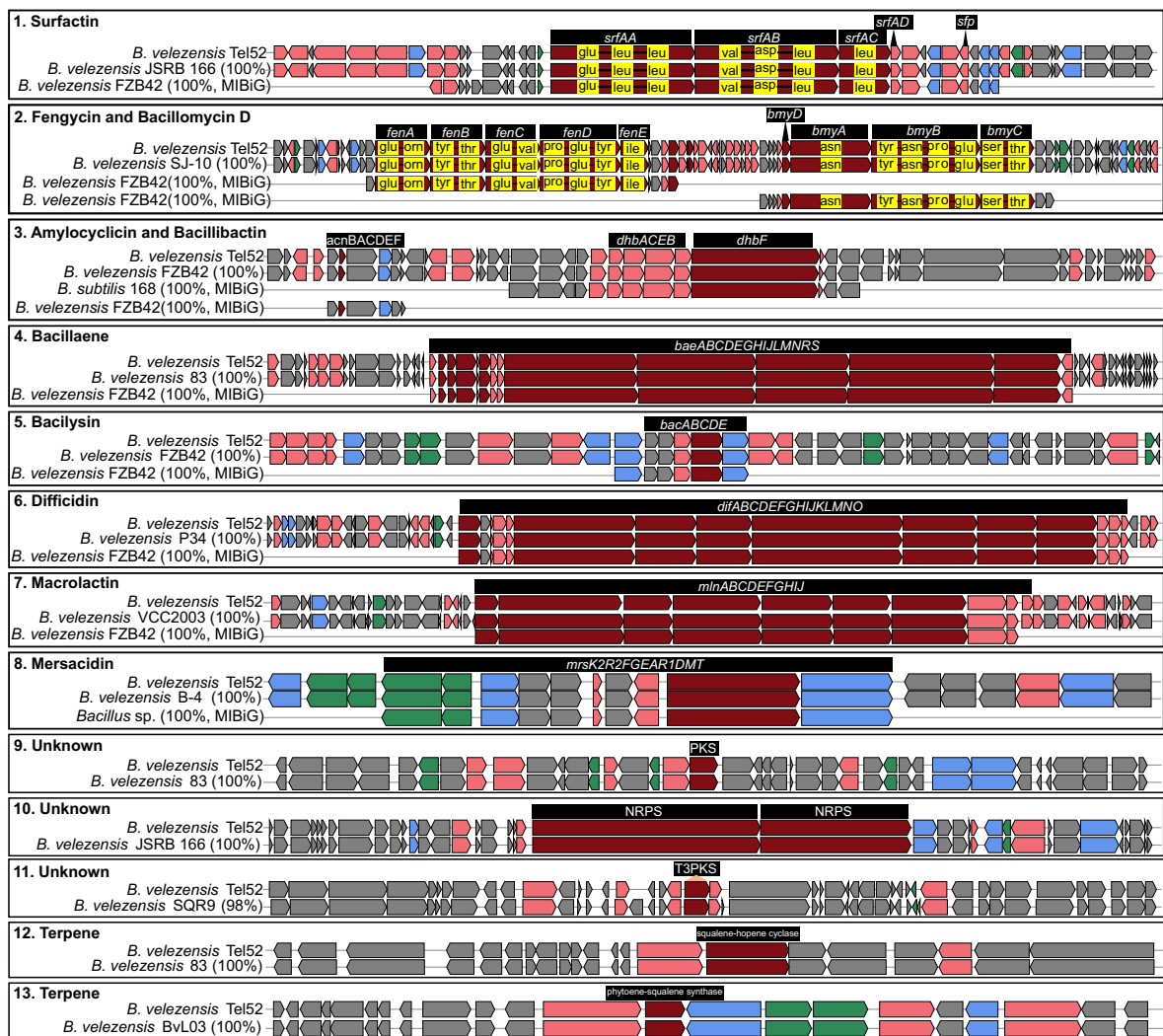
Περιοχή	Κωδικός αριθμός παρόμοιας συστάδας γονιδίων MIBiG (% ομοιότητα γονιδίων)	Εκτιμώμενο μέγεθος (bp)	Προβλεπόμενο προϊόν συστάδας	Μεταβολίτης
1	BGC0000433 (100%)	65.408	NRPS	Surfactin
2	BGC0001095 (100%)	137.510	NRPS	Fengycin
	BGC0001090 (100%)		NRPS, TransAT-PKS	Bacillomycin D
3	BGC0000309 (100%)	50.498	NRPS	Bacillibactin
	BGC0000616 (100%)		RiPP-like	Amylocyclicin
4	BGC0001089 (100%)	100.286	NRPS, TransAT-PKS	Bacillaene
5	BGC0001184 (100%)	41.419	other	Bacilysin
6	BGC0000181 (100%)	88.231	transAT-PKS	Macrolactin H
7	BGC0000176 (100%)	93.790	transAT-PKS	Difficidin
8	BGC0000527 (100%)	23.189	Lanthipeptide Class II	Mersacidin
9	BGC0000693 (7%)	41,245	PKS-like	Άγνωστος
10	-	68.421	NRPS	-
11	-	41.101	T3PKS	-
12	-	21.884	terpene	Hopene
13	-	17.758	terpene	Terpene (Squalene/Phytoene)

Μεταξύ των 15 πιθανών μεταβολιτών που ανιχνεύθηκαν περιλαμβάνονταν γνωστοί μεταβολίτες, όπως και μεταβολίτες νέοι ή μεταβολίτες μη καταχωρημένοι στη βάση δεδομένων που χρησιμοποιεί το πρόγραμμα.

Οι 10 συστάδες γνωστών μεταβολιτών παρουσίασαν 100% ομολογία με τις συστάδες που είναι καταχωρημένες στη βάση δεδομένων MIBiG (Πίνακας 4.21), εκτός από τη συστάδα βιοσυνθετικών γονιδίων της ένωσης Surfactin (91% ομολογία), ενώ έδειξαν παρόμοια οργάνωση γονιδίων με άλλα στελέχη *B. velezensis* (Εικόνα 4.41). Οι συστάδες αυτές αφορούν γονίδια που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση μη ριβοσωμικών πεπτιδίων, συγκεκριμένα των κυκλικών λιποπεπτιδίων Surfactin και Fengycin, καθώς και της σιδηροφόρου ένωσης Bacillibactin. Άλλες συστάδες εμπλέκονται στη βιοσύνθεση υβριδικών πεπτιδίων που προέρχονται από συνθετάσες μη ριβοσωμικών πεπτιδίων και συνθάσες πολυκετιδίων, συγκεκριμένα του κυκλικού λιποπεπτιδίου Bacillomycin D και του πεπτιδίου Bacillaene. Στην περιοχή που ανιχνεύθηκε η συστάδα της σιδηροφόρου ένωσης Bacillibactin, ανιχνεύθηκε και άλλη μία συστάδα, η οποία εμπλέκεται στη βιοσύνθεση της ένωσης Amylocyclicin. Αυτή η ένωση ανήκει στη γενικότερη κατηγορία των ριβοσωμικά συντιθέμενων και μετα-μεταφραστικά τροποποιημένων πεπτιδίων και συγκεκριμένα στην οικογένεια των Circular

Bacteriocins. Επίσης, ανιχνεύθηκαν BGCs πολυκετιδίων, και συγκεκριμένα των μεταβολιτών Difficidin και Macrolactin. Τέλος, ανιχνεύθηκαν συστάδες γονιδίων που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση του μη ριβοσωμικά συντιθέμενου αντιβιοτικού Bacilysin, αλλά και της ένωσης Mersacidin, που κατατάσσεται στη γενική κατηγορία των ριβοσωμικά συντιθέμενων και μετα-μεταφραστικά τροποποιημένων πεπτιδίων και συγκεκριμένα στην κατηγορία των Lanthipeptides (Class II) της οικογένειας Bacteriocins (Class I).

Ακόμη, ανιχνεύθηκαν BGCs που δεν αντιστοιχούσαν σε κάποιο γνωστό μεταβολίτη. Μία συστάδα γονιδίων που περιέχει μια συνθάση πολυκετιδίων τύπου III και μία συστάδα γονιδίων που περιέχει μία συνθέταση μη ριβοσωμικού πεπτιδίου βρέθηκαν και σε άλλα στελέχη *B. velezensis* με 88-100% ομοιότητα γονιδίων, βάσει της ανάλυσης ClusterBlast, αντιπροσωπεύοντας ίσως ενώσεις που δεν έχουν ανακαλυφθεί και χαρακτηριστεί ακόμη. Μία άλλη συστάδα γονιδίων εμφάνισε 7% ομοιότητα γονιδίων με τη συστάδα βιοσυνθετικών γονιδίων του αμινογλυκοσιδικού αντιβιοτικού Butirosin που είναι καταχωρημένη στη βάση δεδομένων MIBiG (**Πίνακας 4.21**), με όμοια να είναι μόνο δύο γονίδια που αφορούσαν πρωτεΐνες-μεταφορείς στο ένα άκρο της συστάδας (**Εικόνα 4.41**). Αυτή η συστάδα εντοπίστηκε και σε άλλα στελέχη *B. velezensis* με 100% ομολογία γονιδίων μεταξύ των στελεχών, ενώ αναζήτηση BLASTp και BLASTn, καθώς και ανάλυση με τα εργαλεία αμινοξικής και νουκλεοτιδικής στοίχισης, αποκάλυψε αμινοξική και νουκλεοτική ομοιότητα 98-100% μεταξύ των στελεχών *B. velezensis* και *B. amyloliquefaciens* για όλη τη συστάδα. Ακόμη, περιέχει ένα γονίδιο που κωδικοποιεί για συνθάση πολυκετιδίου, οπότε ίσως αφορά κάποιο μεταβολίτη που δεν έχει χαρακτηριστεί ακόμα. Τέλος, ανιχνεύθηκαν δύο συστάδες γονιδίων που φαίνεται να εμπλέκονται στη βιοσύνθεση τερπενίων (**Πίνακας 4.21**).



Εικόνα 4.41 Αποτελέσματα από την ανάλυση του γονιδιώματος του στελέχους Tel52 στην πλατφόρμα antiSMASH για γενομικές περιοχές που περιλαμβάνουν συστάδες βιοσυνθετικών γονιδίων δευτερογενών μεταβολιτών (BGCs) χρησιμοποιώντας τα εργαλεία ClusterBLAST και KnownClusterBLAST. Σχηματική αναπαράσταση των γενομικών περιοχών που εντοπίστηκαν και σύγκριση της συντανίας (synteny) μέσω της στοίχισης ίδιων γονιδίων από το στέλεχος Hil4 και του στελέχους με τη μεγαλύτερη ομοιότητα γονιδίων βάσει του ClusterBLAST, καθώς και το κοντινότερο σε ομολογία καταχωρημένο BGC στη βάση δεδομένων MIBiG βάσει του KnownClusterBLAST. Η ομοιότητα της οργάνωσης των γονιδίων (%) με το στέλεχος Tel52 φαίνεται στις παρενθέσεις. Βασικά βιοσυνθετικά γονίδια απεικονίζονται με καφέ χρώμα, επιπρόσθετα βιοσυνθετικά γονίδια με ροζ χρώμα, γονίδια σχετικά με μεταφορά με γαλάζιο χρώμα, ρυθμιστικά γονίδια με πράσινο χρώμα και άλλα γονίδια με γκρι χρώμα. Τα ονόματα βασικών βιοσυνθετικών γονιδίων παρουσιάζονται σε μαύρα ορθογώνια, ενώ η αμινοξική ακολουθία των κυκλικών λιποπεπτιδίων σε κίτρινα ορθογώνια μέσα στο αντίστοιχο γονίδιο συνθετάσης. Περισσότερες πληροφορίες για τις συστάδες και τους μεταβολίτες δίνονται στον Πίνακα 4.21.

4.4.2.5 Στέλεχος Ter90

Στο γονιδίωμα του στελέχους Ter90 ταυτοποιήθηκαν 10 περιοχές με συστάδες βιοσυνθετικών γονιδίων για δευτερογενείς μεταβολίτες, μέσα στις οποίες περιλαμβάνονταν συστάδες για 10 πιθανούς μεταβολίτες (Πίνακας 4.22).

Πίνακας 4.22 Περιγραφή των των γενωμικών περιοχών με συστάδες βιοσυνθετικών γονιδίων δευτερογενών μεταβολιτών που εντοπίστηκαν στο γονιδίωμα του ενδοφυτικού βακτηριακού στελέχους Ter90 μέσω της ανάλυσης antiSMASH που χρησιμοποιεί τη βάση δεδομένων MIBiG. PKS:Συνθάση πολυκετιδίου (Polyketide Synthase), NRPS:Συνθέταση μη ριβοσωμικού πεπτιδίου (Non Ribosomal Peptide Synthetase), RiPP: Ριβοσωμικά συντιθέμενο και μετα-μεταφραστικά τροποποιημένο πεπτιδίο (Ribosomally synthesised and Post-translationally modified Peptide).

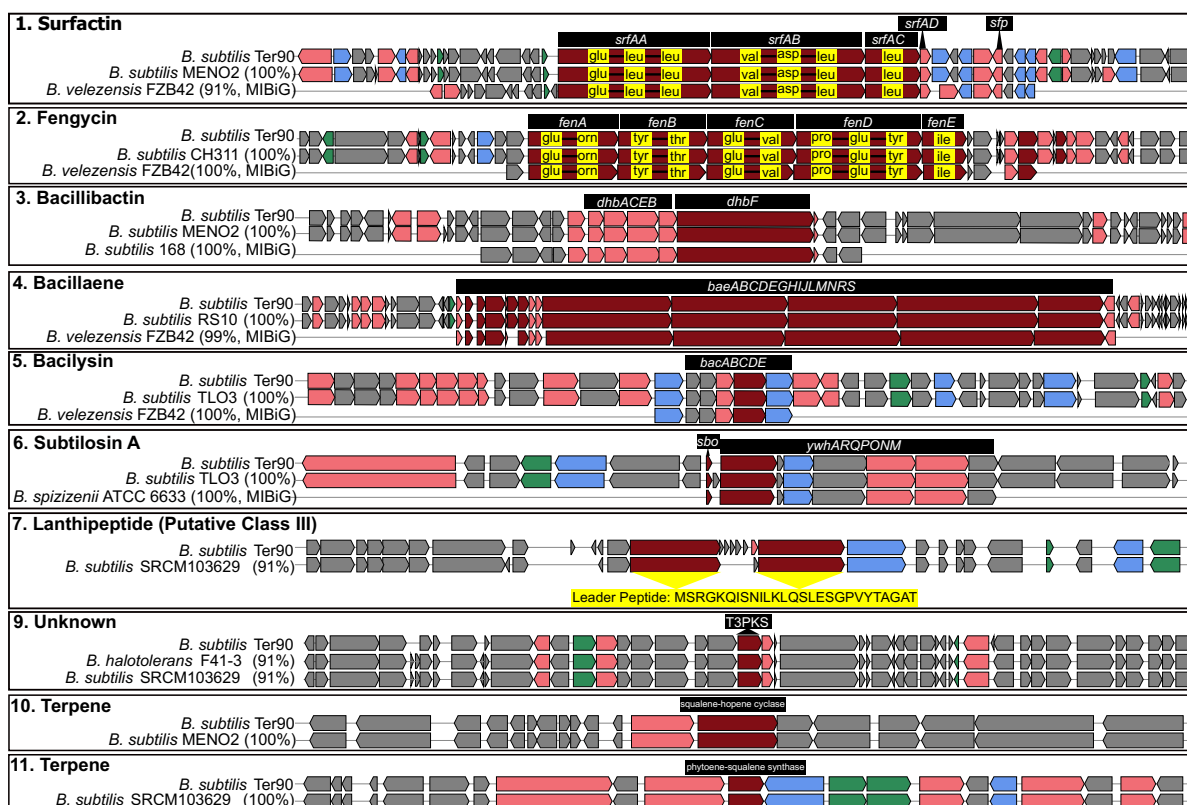
Περιοχή	Κωδικός αριθμός παρόμοιας συστάδας γονιδίων MIBiG (% ομοιότητα γονιδίων)	Εκτιμώμενο μέγεθος (bp)	Προβλεπόμενο προϊόν συστάδας	Μεταβολίτης
1	BGC0000433 (91%)	64188	NRPS	Surfactin
2	BGC0001095 (100%)	27759	NRPS	Fengycin
3	BGC0000309 (100%)	47137	NRPS	Bacillibactin
4	BGC0001089 (100%)	105278	NRPS, TransAT-PKS	Bacillaene
5	BGC0001184 (100%)	41419	other	Bacilysin
6	BGC0000602 (100%)	21612	Sactipeptide	Subtilosin A
7	-	26384	RiPP	Lanthipeptide
8	-	41098	T3PKS	-
9	-	20807	Terpene	Terpene (Squalene/Phytoene)
10	-	21899	Terpene	Hopene

Μεταξύ των 10 πιθανών μεταβολιτών που ανιχνεύθηκαν περιλαμβάνονταν γνωστοί μεταβολίτες, όπως και μεταβολίτες νέοι ή μεταβολίτες μη καταχωρημένοι στη βάση δεδομένων που χρησιμοποιεί το πρόγραμμα. Ανιχνεύθηκε η συστάδα βιοσυνθετικών γονιδίων του κυκλικού λιποπεπτιδίου Surfactin με 91% ομολογία με την καταχωρημένη συστάδα της MIBiG καθώς και η συστάδα βιοσυνθετικών γονιδίων του κυκλικού λιποπεπτιδίου Fengycin που παρουσίασε 100% ομολογία γονιδιακής οργάνωσης με την κατατεθειμένη συστάδα της MIBiG. Ακόμη, ανιχνεύθηκαν συστάδες γονιδίων, οι οποίες εμφανίζουν 100% ομολογία γονιδίων με τις αντίστοιχες συστάδες που είναι καταχωρημένες στη βάση δεδομένων MIBiG, και εμπλέκονται στη βιοσύνθεση του μη ριβοσωμικά συντιθέμενου αντιβιοτικού Bacilysin, αλλά και της ένωσης Subtilosin που συντίθεται ριβοσωμικά και ανήκει στην ομάδα των Sactibiotics της οικογένειας Bacteriocins. Επιπλέον, η συστάδα βιοσυνθετικών γονιδίων της ένωσης Subtilosin εμφάνισε 100% ομολογία γονιδίων με άλλα στελέχη *B. subtilis*, ενώ η συστάδα βιοσυνθετικών γονιδίων της ένωσης Bacilysin εμφάνισε 100% ομολογία γονιδίων με άλλα στελέχη *B. subtilis*. Άλλες συστάδες που ανιχνεύθηκαν με 100% ομολογία γονιδιακής οργάνωσης με τις κατατεθειμένες συστάδες στη MIBiG εμπλέκονται στη βιοσύνθεση των ενώσεων Bacillaene και Bacillibactin, με 100% ομολογία γονιδίων με άλλα στελέχη *B. subtilis*, αντίστοιχα.

Μια άλλη συστάδα γονιδίων δεν είχε αντιστοιχία με συστάδα καταχωρημένη στη βάση δεδομένων MIBiG, και πιθανώς εμπλέκεται στη βιοσύνθεση ενός ριβοσωμικά συντιθέμενου και μετα-μεταφραστικά τροποποιημένου πεπτιδίου που ανήκει στην οικογένεια Bacteriocins και συγκεκριμένα στην ομάδα των Lanthipeptides (Class III).

Μία συστάδα γονιδίων που περιέχει μια συνθάση πολυκετιδίων τύπου III δεν αντιστοιχούσε σε κάποιο γνωστό μεταβολίτη της βάσης δεδομένων MIBiG (Πίνακας 4.22), αλλά βρέθηκε σε άλλα στελέχη *B. subtilis* με ομοιότητα γονιδίων 91-93%, βάσει της ανάλυσης ClusterBlast. Τέλος, δύο συστάδες γονιδίων που φαίνεται να εμπλέκονται στη βιοσύνθεση τερπενίων δεν αντιστοιχούσαν σε

κάποιο γνωστό μεταβολίτη της βάσης δεδομένων MIBiG, αλλά βρέθηκαν σε άλλα στελέχη *B. subtilis* με γονιδιακή ομολογία 100%.



Εικόνα 4.42 Αποτελέσματα από την ανάλυση του γονιδιώματος του στελέχους Ter90 στην πλατφόρμα antiSMASH για γενομικές περιοχές που περιλαμβάνουν συστάδες βιοσυνθετικών γονιδίων δευτερογενών μεταβολιτών (BGCs) χρησιμοποιώντας τα εργαλεία ClusterBLAST και KnownClusterBLAST. Σχηματική αναπαράσταση των γενομικών περιοχών που εντοπίστηκαν και σύγκριση της συντανίας (synteny) μέσω της στοίχισης ίδιων γονιδίων από το στέλεχος Hil4 και του στελέχους με τη μεγαλύτερη ομοιότητα γονιδίων βάσει του ClusterBLAST, καθώς και το κοντινότερο σε ομολογία καταχωρημένο BGC στη βάση δεδομένων MIBiG βάσει του KnownClusterBLAST. Η ομοιότητα της οργάνωσης των γονιδίων (%) με το στέλεχος Ter90 φαίνεται στις παρενθέσεις. Βασικά βιοσυνθετικά γονίδια απεικονίζονται με καφέ χρώμα, επιπρόσθετα βιοσυνθετικά γονίδια με ροζ χρώμα, γονίδια σχετικά με μεταφορά με γαλάζιο χρώμα, ρυθμιστικά γονίδια με πράσινο χρώμα και άλλα γονίδια με γκρι χρώμα. Τα ονόματα βασικών βιοσυνθετικών γονιδίων παρουσιάζονται σε μαύρα ορθογώνια, η αμινοξική ακολουθία των κυκλικών λιποπεπτιδίων σε κίτρινα ορθογώνια μέσα στο αντίστοιχο γονίδιο συνθέτασης και η αμινοξική αλληλουχία προϊόντων Bacteriocins σε κίτρινο ορθογώνιο. Περισσότερες πληροφορίες για τις συστάδες και τους μεταβολίτες δίνονται στον Πίνακα 4.22.

4.4.2.6 Συγκεντρωτικός πίνακας

Με βάση τον παρακάτω συγκεντρωτικό πίνακα (Πίνακας 4.23), τα γενώματα των στελεχών περιέχουν κάποιες συστάδες γονιδίων που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση δευτερογενών μεταβολιτών, οι οποίες υπάρχουν σε όλα τα στελέχη, ενώ κάποιες φαίνεται να είναι εξειδικευμένες στο είδος ή και το στέλεχος.

Πίνακας 4.23 Συγκεντρωτικός πίνακας όπου συνοψίζονται τα αποτελέσματα της γονιδιωματικής ανάλυσης με τη χρήση του προγράμματος antiSMASH και του εργαλείου BLASTn για κάθε στέλεχος σε σύγκριση με τα υπόλοιπα στελέχη για τις ενώσεις που παρουσιάζουν αντιμικροβιακή δράση. Η ανίχνευση των αντίστοιχων BGCs σημειώνεται με «+» και το κελί χρωματίζεται με διαφορετικό χρώμα για κάθε στέλεχος.

	Κατηγορία	Τύπος	Μεταβολίτης	Βακτηριακά στελέχη					
				Hil4	Hir139	Tel34	Tel52	Ter90	
Γνωστοί	Cyclic Lipopeptides	Surfactins	NRP	Surfactin	+	+	-	+	+
				Pumilacidin	-	-	+	-	-
		Iturins	NRP-PK	Mojavensin	+	-	-	-	-
				Bacillomycin D	-	+	-	+	-
	Fengycins	NRP	Fengycin	+	+	-	+	+	
	Polyketides	NRP-PK	Bacillaene	+	+	-	+	+	
	Σιδηροφόρα μόρια	NRP	Bacillibactin	+	+	+	+	+	
	Dipeptide	-	Bacilysin	+	+	+	+	+	
	RiPPs	Class I Bacteriocins	Sactipeptide	Subtilosin A	+	-	-	-	+
			Circular	Safensin	-	-	+	-	-
			LAP/TOMM microcin	Plantazolicin	-	+	-	-	-
			Lanthipeptide Class II	Mersacidin	-	-	-	+	-
			Circular	Amylocyclicin	-	+	-	+	-
	Polyketides	PK	Difficidin	-	+	-	+	-	
Macrolactin H			-	+	-	+	-		
Άγνωστοι ή Υποτιθέμενοι	Polyketides	FA-PK	Bacillunoic acids	+	-	-	-	-	
	Polyketides	PK	Άγνωστος	+	+	+	+	+	
	RiPPs	Class I Bacteriocins	Lanthipeptide Class III	Άγνωστος	-	-	-	+	
	Polyketides	PK-like	Άγνωστος	-	+	-	+	-	
	Non ribosomal peptide	NRP	Άγνωστος	-	+	-	+	-	

4.4.3 Γονίδια που εμπλέκονται στην προώθηση της ανάπτυξης των φυτών και στη βιοσύνθεση δευτερογενών μεταβολιτών

Περαιτέρω ανάλυση του γονιδιώματος αποκάλυψε γονίδια που εμπλέκονται στην προώθηση της φυτικής ανάπτυξης, στον αποικισμό και στη βιολογική αντιμετώπιση φυτοπαθογόνων μικροοργανισμών. Εντοπίστηκαν γονίδια που κωδικοποιούν για ένζυμα που εμπλέκονται στην κινητοποίηση θρεπτικών τα οποία είναι αδιάλυτα ή συμπλοκοποιημένα καθιστώντας τα βιοδιαθέσιμα για το φυτό, όπως είναι οι φωσφατάσες, η φυτάση, οι σιδηφορόρες ενώσεις και η ουρεάση (**Πίνακας 4.24**). Επίσης, βρέθηκαν γονίδια που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση ρυθμιστών της φυτικής ανάπτυξης, όπως είναι η φυτική ορμόνη ινδολοξικό οξύ, η ένωση ακετοΐνη και 2,3-βουτανεδιόλη, νιτρικό οξύ και σπερμιδίνη (**Πίνακας 4.25**). Ακόμη, εξετάστηκε η παρουσία του γονιδίου που κωδικοποιεί για το ένζυμο ACC deaminase, το οποίο εμπλέκεται στην μείωση της φυτικής καταπόνησης, ωστόσο, φάνηκε πως δεν είναι παρόν σε κανένα από τα επιλεγμένα αυτά στελέχη (**Πίνακας 4.25**). Επιπλέον, η ανάλυση ανέδειξε γονίδια που εμπλέκονται στην προσέγγιση και αποικισμό της ρίζας, δηλαδή γονίδια που σχετίζονται με την κινητικότητα του βακτηριακού κυττάρου και την ικανότητα ομαδικής κίνησης σε επιφάνειες, καθώς και κολυμβητικής κίνησης (**Πίνακας 4.26**). Πραγματοποιήθηκε και εντοπισμός γονιδίων που σχετίζονται με το σχηματισμό βιοϋμενίου, απαραίτητης ικανότητας για την προσκόλληση των βακτηριακών κυττάρων στη ριζική επιφάνεια (**Πίνακας 4.26**). Τέλος, εξετάστηκε η παρουσία άλλων γονιδίων που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση δευτερογενών μεταβολιτών έναντι παθογόνων ή στον ανταγωνισμό μεταξύ των βακτηρίων (**Πίνακας 4.27**).

Πίνακας 4.24 Αποτελέσματα αναζήτησης γονιδίων που εμπλέκονται στην ανοργανοποίηση θρεπτικών ή κινητοποίηση συμπλοκοποιημένων ανόργανων θρεπτικών του εδάφους στο γονιδίωμα των ενδοφυτικών βακτηριακών στελεχών Hil4, Hir139, Tel34, Tel52, Ter90.

Όνομα γονιδίου	Λειτουργία γονιδίου	Δράση	Στελέχη					
			Hil4	Hir139	Tel34	Tel52	Ter90	
<i>phy</i>	3-Phytase	Διάσπαση φυτικού οξέος	+	+	+	+	+	
<i>pqqD</i>	Coenzyme PQQ synthesis protein E		-	-	+	-	-	
<i>gntZ</i>	6-phosphogluconate dehydrogenase		+	-	-	-	+	
<i>gntT</i>	High-affinity gluconate transporter		+	-	-	-	+	
<i>gndA</i>	6-phosphogluconate dehydrogenase		+	+	+	+	+	
<i>phoB</i>	alkaline phosphatase B		+	-	-	-	+	
<i>phoR</i>	Alkaline phosphatase synthesis sensor protein	Ανοργανοποίηση φωσφόρου	+	+	+	+	+	
<i>phoP</i>	Alkaline phosphatase synthesis transcriptional regulator		+	+	+	+	+	
<i>phoA</i>	alkaline phosphatase A		+	+	+	+	+	
<i>phoD</i>	alkaline phosphatase D		+	+	-	+	+	
<i>ppaC</i>	manganese-dependent inorganic pyrophosphatase		+	+	+	+	+	
<i>ppaX</i>	Pyrophosphatase		+	+	+	+	+	
<i>cheC</i>	CheY-P phosphatase		+	+	+	+	+	
<i>ureA</i>	Urease subunit gamma		Διάσπαση ουρίας	+	+	-	+	+
<i>ureB</i>	Urease subunit beta		Διάσπαση ουρίας	+	+	-	+	+
<i>ureC</i>	Urease subunit alpha		Διάσπαση ουρίας	+	+	-	+	+
<i>dhb</i>	Siderophore	Αποσυμπλοκοποίηση σιδήρου	+	+	+	+	+	

Πίνακας 4.25 Αποτελέσματα αναζήτησης γονιδίων που εμπλέκονται στην παραγωγή ρυθμιστών της φυτικής ανάπτυξης στο γονιδίωμα των ενδοφυτικών βακτηριακών στελεχών Hil4, Hir139, Tel34, Tel52, Ter90. IPyA=indole-3-pyruvic acid, IAM=indole-3-acetamide, IAN=indole-3-acetonitrile

Όνομα γονιδίου	Προϊόν γονιδίου	Δράση	Στελέχη					
			Hil4	Hir139	Tel34	Tel52	Ter90	
<i>Aldh</i>	4,4'-diaponeurosporen-aldehyde dehydrogenase		+	+	+	+	+	
<i>aldA</i>	aldehyde dehydrogenase [EC:1.2.1.-]	Βιοσύνθεση ινδολοξικού οξέος (IPyA μονοπάτι)	-	-	-	-	-	
<i>aldB</i>	glycolaldehyde dehydrogenase		-	-	-	-	-	
<i>dhaS</i>	Indol 3-acet-aldehyde dehydrogenase		-	-	-	-	-	
<i>iaaM</i>	tryptophan-2-monooxygenase	Βιοσύνθεση ινδολοξικού οξέος (IAM μονοπάτι)	-	-	-	-	-	
<i>iaaH</i>	IAM hydrolase		-	-	-	-	-	
<i>yhcX</i>	Nitrilase	Βιοσύνθεση ινδολοξικού οξέος (IAN μονοπάτι)	-	-	-	-	-	
<i>ysnE</i>	N-Acetyltransferase	Βιοσύνθεση ινδολοξικού οξέος (μη χαρακτηρισμένο)	+	+	+	+	+	
<i>alsS</i>	Acetolactate synthase		+	+	+	+	+	
<i>alsD</i>	Acetolactate decarboxylase		+	+	+	+	+	
<i>ilvB</i>	Acetolactate synthase large subunit		+	+	+	+	+	
<i>ilvH</i>	Acetolactate synthase small subunit		+	+	+	+	+	
<i>bdhA</i>	D-beta-hydroxybutyrate dehydrogenase		Βιοσύνθεση 2,3-βουτανεδιόλης/ακετοΐνης	+	+	+	+	+
<i>budC</i>	Diacetyl reductase [(S)-acetoin forming]			+	-	+	-	+
<i>acuA</i>	Acetoin utilization protein AcuA			+	+	+	+	+
<i>acuC</i>	Acetoin utilization protein AcuC			+	+	+	+	+
<i>acoA</i>	Acetoin:2,6-dichlorophenolindophenol			+	-	+	-	+
<i>acoR</i>	Acetoin dehydrogenase operon transcriptional activator			+	+	+	+	+
<i>speE</i>	Polyamine aminopropyltransferase			+	+	+	+	+
<i>speA</i>	Arginine decarboxylase			+	+	+	+	+
<i>speH</i>	S-adenosylmethionine decarboxylase proenzyme			+	+	+	+	+
<i>speB</i>	Agmatinase			Βιοσύνθεση/Μεταφορά σπερμιδίνης	+	+	+	+
<i>potA</i>	Spermidine import ATP-binding protein		-		-	+	-	-
<i>mdtJ</i>	Spermidine export protein		-		-	-	-	-
<i>bltD</i>	Spermine/spermidine acetyltransferase	+	+		+	+	+	
<i>paiA</i>	Spermidine/spermine N(1)-acetyltransferase	+	+		-	+	-	
<i>treA</i>	Trehalose-6-phosphate hydrolase	Βιοσύνθεση τρεχαλόζης	+	+	+	+	+	
<i>treP</i>	PTS system trehalose-specific EIIBC component		+	+	+	+	+	
<i>treR</i>	transcriptional regulator		+	+	+	+	+	
<i>nos</i>	Nitric oxide synthase oxygenase	Βιοσύνθεση νιτρικού οξέος	+	+	+	+	+	
<i>noR</i>	Anaerobic nitric oxide reductase transcription regulator		+	+	+	+	+	
<i>yxaL</i>	-	Προώθηση ανάπτυξης της ρίζας	+	+	-	+	+	
<i>acdS</i>	ACC deaminase	Μείωση καταπόνησης	-	-	-	-	-	

Πίνακας 4.26 Αποτελέσματα αναζήτησης γονιδίων που εμπλέκονται στην κινητικότητα και το σχηματισμό βιοϋμενίου στο γονιδίωμα των ενδοφυτικών βακτηριακών στελεχών H14, Hir139, Tel34, Tel52, Ter90.

Όνομα γονιδίου	Λειτουργία γονιδίου	Δράση	Στελέχη					
			H14	Hir139	Tel34	Tel52	Ter90	
<i>pgsA</i>	poly-glutamic acid (γ-PGA)	Σχηματισμός βιοϋμενίου	+	+	+	+	+	
<i>bslA</i>	Biofilm-surface layer protein A		+	+	-	+	+	
<i>sipW</i>	Signal peptidase		+	+	+	+	+	
<i>tasA</i>	Major biofilm matrix component		+	+	+	+	+	
<i>sinR</i>	Transcriptional regulator		+	+	+	+	+	
<i>sinI</i>	Protein		+	+	-	+	+	
<i>swrC</i>	Swarming motility protein	Κίνηση swarming	+	+	+	+	+	
<i>flgB</i>	Flagellar basal body rod protein		+	+	+	+	+	
<i>flgC</i>	Flagellar basal-body rod protein		+	+	+	+	+	
<i>flgK</i>	Flagellar hook-associated protein 1		+	-	+	-	+	
<i>flhA</i>	Flagellar biosynthesis protein		+	+	+	+	+	
<i>fliD</i>	Flagellar hook-associated protein 2		+	+	+	+	+	
<i>fliE</i>	Flagellar hook-basal body complex protein		+	+	+	+	+	
<i>fliG</i>	Flagellar motor switch protein		+	+	+	+	+	
<i>fliJ</i>	Flagellar FliJ protein		+	+	+	+	+	
<i>fliM</i>	Flagellar motor switch protein		+	+	+	+	+	
<i>fliP</i>	Flagellar biosynthetic protein		Συναρμολόγηση μαστιγίου	+	+	+	+	+
<i>fliQ</i>	Flagellar biosynthetic protein			+	+	+	+	+
<i>fliR</i>	Flagellar biosynthetic protein			+	+	+	+	+
<i>fliS</i>	Flagellar secretion chaperone			+	+	+	+	+
<i>motB</i>	motility protein B			+	+	+	+	+
<i>pomA</i>	Chemotaxis protein PomA			+	+	+	+	+
<i>flaB2</i>	Flagellar filament core protein			+	+	-	+	+
<i>fliW</i>	Flagellar assembly factor	+		+	+	+	+	
<i>fliT</i>	Flagellar protein	+		+	-	+	+	
<i>flgB</i>	Flagellar basal body rod protein	+		+	+	+	+	
<i>flgC</i>	Flagellar basal-body rod protein	+	+	+	+	+		
<i>flhF</i>	Flagellar biosynthesis protein	+	+	+	+	+		
<i>cheA</i>	chemotaxis protein	Χημειοτακτισμός	+	+	+	+	+	
<i>cheB</i>	Protein-glutamate methyltransferase		+	+	+	+	+	
<i>cheD</i>	Chemoreceptor glutamine deamidase		+	+	+	+	+	
<i>cheR</i>	chemotaxis protein methyltransferase		+	+	+	+	+	
<i>cheY</i>	chemotaxis protein		+	+	+	+	+	
<i>cheW</i>	Chemotaxis protein		+	+	+	+	+	

Πίνακας 4.27 Αποτελέσματα αναζήτησης γονιδίων που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση δευτερογενών μεταβολιτών με άμεση ή έμμεση αντιμικροβιακή δράση στο γονιδίωμα των ενδοφυτικών βακτηριακών στελεχών Hil4, Hir139, Tel34, Tel52, Ter90.

Όνομα γονιδίου	Λειτουργία γονιδίου	Δράση	Στελέχη				
			Hil4	Hir139	Tel34	Tel52	Ter90
<i>oxdC</i>	Oxalate decarboxylase	Διάσπαση του οξαλικού οξέος	+	+	+	+	+
<i>dhbE</i>	2,3-dihydroxybenzoate-AMP ligase	Σύνθεση βενζοϊκού οξέος	+	+	+	+	+
<i>dhbA</i>	2,3-dihydro-2,3-dihydroxybenzoate dehydrogenase		+	+	+	+	+
<i>hcnA</i>	Hydrogen cyanide synthase subunit A	Σύνθεση υδροκυανίου	-	-	-	-	-
<i>hcnB</i>	Hydrogen cyanide synthase subunit B		-	-	-	-	-
<i>hcnC</i>	Hydrogen cyanide synthase subunit C		-	-	-	-	-
<i>YtnP</i>	Lactonase	Quorum quenching	+	+	+	+	+
<i>wapA</i>	tRNA3(Ser)-specific nuclease	Kin Discrimination	+	-	-	+	+

4.4.4 Ένζυμα που συνθέτουν ή καταβολίζουν υδατάνθρακες (Carbohydrate-active enzymes, CAZymes)

Μία ακόμα ανάλυση που πραγματοποιήθηκε στο γονιδίωμα κάθε στελέχους ήταν η αναζήτηση γονιδίων που κωδικοποιούν για ένζυμα τα οποία συνθέτουν ή καταβολίζουν υδατάνθρακες, με τη βοήθεια της βάσης δεδομένων CAZy (<http://www.cazy.org/>) και του διακομιστή dbCAN2 (<https://bcb.unl.edu/dbCAN2/>). Ο αλγόριθμος ανιχνεύει γονίδια των ενζυμικών οικογενειών των γλυκοσιδασών (glucoside hydrolases), γλυκοτρανσφερασών (glucotransferases), πολυσακχαριδικών λυασών (polysaccharide lyases), εστερασών πολυσακχαριτών (carbohydrate esterases), καθώς και βοηθητικών λειτουργιών (auxiliary activities). Ακόμη, μπορεί να ανιχνευθεί ο αριθμός λειτουργικών περιοχών πρόσδεσης υδατανθράκων (carbohydrate-binding modules, CBMs), ενώ γίνεται και πρόβλεψη των ενζύμων που διαθέτουν αμινοτελικό σηματοδοτικό πεπτίδιο και δύναται να εξέλθουν από την κυτταροπλασματική μεμβράνη, υποδεικνύοντας εξωκυττάρια έκκριση.

Στο στέλεχος *B. halotolerans* Hil4 βρέθηκαν συνολικά 112 γονίδια που κωδικοποιούν για τα συγκεκριμένα ένζυμα, μεταξύ των οποίων 51 ανήκουν στην οικογένεια των γλυκοσιδασών, 41 ανήκουν στην οικογένεια των γλυκοτρανσφερασών, 7 ανήκουν στην οικογένεια των πολυσακχαριδικών λυασών, 12 στην οικογένεια των εστερασών υδατανθράκων και 1 στα ένζυμα με βοηθητικές λειτουργίες, ενώ προβλέφθηκαν 14 λειτουργικές περιοχές πρόσδεσης υδατανθράκων και 30 ένζυμα με σηματοδοτικό πεπτίδιο έκκρισης (**Πίνακας 4.28**).

Το γονιδίωμα του στελέχους *B. velezensis* Hir139 προβλέφθηκε ότι περιέχει 91 τέτοια γονίδια, 40 από τα οποία ανήκουν στην οικογένεια των γλυκοσιδασών, 36 στην οικογένεια των γλυκοτρανσφερασών, 3 στην οικογένεια των πολυσακχαριδικών λυασών, 11 στην οικογένεια των εστερασών υδατανθράκων και 1 στα ένζυμα με βοηθητικές λειτουργίες, ενώ προβλέφθηκαν 8 λειτουργικές περιοχές πρόσδεσης υδατανθράκων και 28 ένζυμα με σηματοδοτικό πεπτίδιο έκκρισης (**Πίνακας 4.28**).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του dbCAN, το γονιδίωμα του στελέχους *B. safensis* Tel34 περιέχει συνολικά 83 ένζυμα που έχουν ως υπόστρωμα υδατάνθρακες, από τα οποία 35 ανήκουν στην οικογένεια των γλυκοσιδασών, 31 στην οικογένεια των γλυκοτρανσφερασών, 2 στην οικογένεια των πολυσακχαριδικών λυασών, 15 στην οικογένεια των εστερασών υδατανθράκων, ενώ δεν ανιχνεύθηκαν άλλα ένζυμα με βοηθητικές λειτουργίες (**Πίνακας 4.28**). Ακόμη, προβλέφθηκαν 8 λειτουργικές περιοχές πρόσδεσης υδατανθράκων και 22 ένζυμα με σηματοδοτικό πεπτίδιο έκκρισης.

Το στέλεχος *B. velezensis* Tel52 φάνηκε πως διαθέτει συνολικά 86 γονίδια που κωδικοποιούν ένζυμα με ενεργότητα σε υδατάνθρακες, και συγκεκριμένα 40 που ανήκουν στην οικογένεια των γλυκοσιδασών, 33 που ανήκουν στην οικογένεια των γλυκοτρανσφερασών, 3 που ανήκουν στην οικογένεια των πολυσακχαριδικών λυασών, 10 στην οικογένεια των εστερασών υδατανθράκων, ενώ δεν ανιχνεύθηκαν ένζυμα με βοηθητικές λειτουργίες (**Πίνακας 4.28**). Επίσης, προβλέφθηκαν 5 λειτουργικές περιοχές πρόσδεσης υδατανθράκων και 27 ένζυμα με σηματοδοτικό πεπτίδιο έκκρισης

Τέλος, κατά την ανάλυση του γονιδιώματος του στελέχους *B. subtilis* Ter90 εντοπίστηκαν συνολικά 112 γονίδια που κωδικοποιούν ένζυμα με ενεργότητα σε υδατάνθρακες, από τα οποία 53 ανήκουν στην οικογένεια των γλυκοσιδασών, 38 στην οικογένεια των γλυκοτρανσφερασών, 7 στην οικογένεια των πολυσακχαριδικών λυασών, 14 στην οικογένεια των εστερασών υδατανθράκων, ενώ δεν ανιχνεύθηκαν άλλα ένζυμα με βοηθητικές λειτουργίες (Πίνακας 4.28). Ακόμη, προβλέφθηκαν 9 λειτουργικές περιοχές πρόσδεσης υδατανθράκων και 33 ένζυμα με σηματοδοτικό πεπτιδίο έκκρισης.

Κατά τη σύγκριση του αριθμού των ενζύμων αυτών μεταξύ των 5 επιλεγμένων στελεχών παρατηρείται πως μεγαλύτερο αριθμό διαθέτουν τα στελέχη Hil4 και Ter90, κυρίως λόγω του μεγαλύτερου αριθμού γλυκοσιδασών.

Πίνακας 4.28 Τύποι και αριθμός ενζύμων που συνθέτουν ή καταβολίζουν υδατάνθρακες (carbohydrate-active enzymes, CAZy) των οποίων τα γονίδια ανιχνεύθηκαν στα γονιδιώματα των ενδοφυτικών βακτηριακών στελεχών Hil4, Hir139, Tel34, Tel52, Ter90. Η ανάλυση των γονιδιωμάτων πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του διακομιστή dbCAN2 (<https://ccb.unl.edu/dbCAN2/>) και της βάσης δεδομένων CAZy (<http://www.cazy.org/>).

Τύπος ενζύμου	Αριθμός				
	Hil4	Hir139	Tel34	Tel52	Ter90
Glycoside hydrolases (GH)	51	40	35	40	53
Glycotransferases (GT)	41	36	31	33	38
Polysaccharide lyases (PL)	7	3	2	3	7
Carbohydrate esterases (CE)	12	11	15	10	14
Auxilliary activities (AA)	1	1	0	0	0
Συνολικά	112	91	83	86	112
Carbohydrate-binding modules (CBM)	14	8	8	5	9
Εκκρινόμενα ένζυμα	30	28	22	27	33

Μεταξύ των ενζύμων CAZy που ανιχνεύθηκαν ως πιθανά προϊόντα γονιδίων στο DNA των βακτηριακών στελεχών εντοπίστηκαν ένζυμα που στοχεύουν το κυτταρικό τοίχωμα μυκήτων, όπως είναι η χιτινάση, χιτοζανάση και γλουκανάση. Επίσης, εντοπίστηκαν ένζυμα που στοχεύουν το κυτταρικό τοίχωμα φυτικών κυττάρων, όπως είναι η β-γλυκοσιδάση, λυάση πηκτίνης, ακετυλεστεράση της πηκτίνης, αλλά και το ένζυμο α-αμυλάση το οποίο διασπά το άμυλο (Πίνακας 4.29). Τα γονίδια αυτά ήταν παρόντα σε όλα τα στελέχη, εκτός από το γονίδιο που κωδικοποιεί για το ένζυμο χιτοζανάση στο γονιδίωμα του στελέχους Tel34.

Πίνακας 4.29 Παρουσία γονιδίων που κωδικοποιούν για ένζυμα τα οποία καταβολίζουν υδατάνθρακες του κυτταρικού τοιχώματος φυτών ή μυκήτων στα γονιδιώματα των ενδοφυτικών βακτηριακών στελεχών Hil4, Hir139, Tel34, Tel52, Ter90. Η ανάλυση των γονιδιωμάτων πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του διακομιστή dbCAN2 (<https://ccb.unl.edu/dbCAN2/>) και της βάσης δεδομένων CAZy (<http://www.cazy.org/>).

Ένζυμα	Τύπος κυτταρικού τοιχώματος/Ενωση	Παρουσία στο γένωμα				
		Hil4	Hir139	Tel34	Tel52	Ter90
Χιτινάση (GH18)	Μυκητιακό	+	+	+	+	+
Χιτοζανάση (GH46)	Μυκητιακό	+	+	-	+	+
Γλουκανάση (GH51, GH16)	Μυκητιακό	+	+	+	+	+
β-γλυκοσιδάση (GH1)	Φυτικό	+	+	+	+	+
Λυάση πηκτίνης (PL9, PL3)	Φυτικό	+	+/-	+/-	+/-	+
Ακετυλεστεράση πηκτίνης (CE12)	Φυτικό	+	+	+	+	+
Κυτταρινάση (GH5, GH48)	Φυτικό	+	+/-	+	+/-	-/+
α-αμυλάση (GH13)	Άμυλο	+	+	+	+	+

4.5 Επιλογή των συνδυασμών βακτηριακών στελεχών για δημιουργία μιγμάτων που αποτελούνται από ζεύγη

Μετά την ανάλυση του τρόπου δράσης και των ιδιοτήτων των επιλεγμένων στελεχών, ακολούθησε η επιλογή των ζευγών στελεχών που θα εξεταστούν ως μίγματα. Τα κριτήρια επιλογής ήταν ο βαθμός συμβατότητάς τους βάσει *in vitro* τεχνικών και η διαφορετικότητα των στελεχών ως προς τις ιδιότητες και τον τρόπο δράσης τους.

4.5.1 Αλληλεπίδραση επιλεγμένων στελεχών με τη μέθοδο της υπερκείμενης έγχυσης ημιστερεού θρεπτικού υλικού (soft overlay agar)

Η πρώτη μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για την εξέταση της συμβατότητας *in vitro* ήταν η υπερκείμενη έγχυση ημιστερεού θρεπτικού υλικού. Σε αυτή τη μέθοδο εναιώρημα κυττάρων του στέλεχους-δέκτη ενσωματώνεται σε λεπτή στρώση στερεού θρεπτικού και τα επιτιθέμενα στελέχη εμβολιάζονται σε πηγαδάκια που έχουν σχηματιστεί στο συγκεκριμένο θρεπτικό. Αυτή η μέθοδος χρησιμοποιείται σε δοκιμές ικανότητας αντιμετώπισης βακτηριακών παθογόνων, και πλέον χρησιμοποιείται και σε δοκιμές συμβατότητας βακτηρίων. Στη συγκεκριμένη διατριβή είχε χρησιμοποιηθεί ως μέθοδος ομαδοποίησης των στελεχών που είναι κοντινά σε λειτουργικό επίπεδο (Κεφ. 4.1.2.1). Από τα αποτελέσματα (Πίνακας 4.3) είχε φανεί πως οι αλληλεπιδράσεις των στελεχών Hir139-Hil4, Tel52-Hil4, Hil4-Hir139, Tel52-Tel34, Hir139-Tel34, Hir139-Tel52, Tel52-Ter90 δεν είχαν την ίδια έκβαση σε όλες τις ανεξάρτητες επαναλήψεις.

Έτσι, το πείραμα επαναλήφθηκε με 5 συνολικά ανεξάρτητες επαναλήψεις, ενώ επιπρόσθετα της δοκιμής επίδρασης του εναιωρήματος κυττάρων των επιτιθέμενων στελεχών, όπου δεν υπήρχε το υπερκείμενο της καλλιέργειας, εξετάστηκε και ολόκληρη η καλλιέργεια (παρουσία υπερκείμενου καλλιέργειας), καθώς στο υπερκείμενο συνήθως εκκρίνονται αντιμικροβιακές ενώσεις (Πίνακας 4.30). Φαίνεται πως και πάλι οι ανεξάρτητες επαναλήψεις δεν είχαν την ίδια έκβαση σε μερικές αλληλεπιδράσεις, υποδεικνύοντας πιθανώς το ρόλο που διαδραματίζουν οι μικροδιαφορές στη συγκέντρωση του στέλεχους-δέκτη για την ανθεκτικότητά του.

Παρατηρείται πως το Hil4 ανταγωνίζεται το Hir139 στις 2 από τις 5 επαναλήψεις, με πιο έντονο τον ανταγωνισμό παρουσία του υπερκείμενου του Hil4. Ακριβώς τα ίδια αποτελέσματα παρατηρούνται όταν το Hir139 είναι το επιτιθέμενο στέλεχος προς το Hil4. Έτσι, διακρίνεται μια χαμηλή ανταγωνιστικότητα μεταξύ των στελεχών Hil4 και Hir139, η οποία είναι αμοιβαία. Το στέλεχος Hil4 ανταγωνίζεται το Tel34, σχηματίζοντας μέτρια ζώνη παρεμπόδισης σε όλες τις επαναλήψεις, υποδεικνύοντας ότι το Hil4 είναι ισχυρά ανταγωνιστικό ως προς το Tel34, ενώ το Tel34 δεν είναι ανταγωνιστικό ως προς το Hil4. Ακόμη, το Hil4 είναι ανταγωνιστικό ως προς το Tel52, μόνο όταν το υπερκείμενο είναι παρόν στο εμβόλιο που τοποθετήθηκε στο πηγαδάκι και μόνο στις 2 από τις 5 επαναλήψεις. Το Tel52 επίσης είναι ανταγωνιστικό στις 2 από τις 5 επαναλήψεις ως προς το Hil4, με την ίδια έκβαση παρουσία και απουσία υπερκείμενου. Φαίνεται, λοιπόν, πως και τα 2 στελέχη

ανταγωνίζονται μεταξύ τους αλλά με μέτρια ζώνη παρεμπόδισης και όχι σε όλες τις επαναλήψεις, υποδεικνύοντας χαμηλή ανταγωνιστικότητα. Επιπλέον, το Hil4 ανταγωνίζεται έντονα το Ter90, ενώ το Ter90 δεν ανταγωνίζεται το Hil4. Το στέλεχος Hir139 ανταγωνίζεται το στέλεχος Tel34 σε 3 από τις 5 επαναλήψεις, ενώ φαίνεται πως η παρουσία του υπερκειμένου εντείνει τον ανταγωνισμό, ενώ το Tel34 δεν ανταγωνίζεται το Hir139. Το στέλεχος Hir139 προκαλεί μικρή παρεμπόδιση στην ανάπτυξη του Tel52, με μείωση πυκνότητας ή μικρή ζώνη παρεμπόδισης, σε 2 από τις 5 επαναλήψεις. Ωστόσο, το στέλεχος Tel52 φάνηκε να είναι αρκετά ανταγωνιστικό ως προς το στέλεχος Hir139 προκαλώντας την εμφάνιση μέτριας ζώνης παρεμπόδισης σε 4 από τις 5 επαναλήψεις. Επίσης, το στέλεχος Hir139 ανταγωνίζεται έντονα το στέλεχος Ter90, ενώ το αντίστροφο δε συμβαίνει. Όσον αφορά το στέλεχος Tel34 σε σχέση με το Tel52, μόνο το τελευταίο φαίνεται να ανταγωνίζεται το πρώτο προκαλώντας μικρή ή μέτρια ζώνη παρεμπόδισης στις 3 από τις 5 επαναλήψεις. Το στέλεχος Tel52 ανταγωνίζεται το Ter90 με σχηματισμό μικρής ή μέτριας ζώνης στις 4 από τις 5 επαναλήψεις, ενώ το Ter90 δεν ανταγωνίζεται το Tel52. Παρατηρείται πως τα στελέχη Tel34 και Ter90 είναι τα στελέχη που δεν ανταγωνίζονται κανένα άλλο στέλεχος, όπως δεν είναι ανταγωνιστικά και μεταξύ τους.

Συνοψίζοντας, οι συνδυασμοί με τις πιο ανταγωνιστικές αλληλεπιδράσεις ήταν το επιτιθέμενο στέλεχος Hil4 προς το Ter90 και το επιτιθέμενο στέλεχος Hir139 προς το Ter90, ακολουθούμενες από το επιτιθέμενο στέλεχος Hil4 προς το Tel34 και το επιτιθέμενο στέλεχος Tel52 προς το Hir139.

Πίνακας 4.30 Αποτελέσματα της αλληλεπίδρασης των επιλεγμένων βακτηριακών στελεχών Hil4, Hir139, Tel34, Tel52 και Ter90 με τη μέθοδο υπερκείμενης έγχυσης άγαρ (soft agar overlay method) μετά από κατηγοριοποίηση των φαινοτύπων που παρατηρήθηκαν στο στερεοσκόπιο. Στα πηγαδάκια εμβολιάστηκε κυτταρικό εναίωρημα (απουσία υπερκείμενου) ή βακτηριακή καλλιέργεια (παρουσία υπερκείμενου). Ως Επιτιθέμενα Στελέχη ορίζονται τα στελέχη που εμβολιάστηκαν στα πηγαδάκια (wells), ενώ ως Στελέχη-Δέκτες ορίζονται τα στελέχη που περιέχονταν ομοιόμορφα στην πάνω στρώση του στερεού θρεπτικού μέσου (top agar). Η κατηγοριοποίηση πραγματοποιήθηκε με βάση την ύπαρξη ζώνης παρεμπόδισης γύρω από το πηγαδάκι ως καμμία επίδραση (-), μείωση κυτταρικής πυκνότητας (+), εμφάνιση μικρής ζώνης (++) , εμφάνιση μέτριας ζώνης (+++), Εμφάνιση μεγάλης ζώνης (++++). Πραγματοποιήθηκαν 5 επαναλήψεις.

		Στελέχη-Δέκτες (top agar)																									
		Hil4					Hir139					Tel34					Tel52					Ter90					
Επιτιθέμενα Στελέχη (wells)	Hil4	Απουσία Υπερ.	-	-	-	-	-	-	-	-	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-	-	++++	++++	++++	++++	++++
		Παρουσία Υπερ.	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	-	++	++	++++	++++	++++	++++	++++
	Hir139	Απουσία Υπερ.	-	-	-	++	++	-	-	-	-	-	++	++	+++	-	-	-	-	-	+	++	++++	++++	++++	++++	++++
		Παρουσία Υπερ.	-	-	-	+++	+++	-	-	-	-	-	+++	+++	+++	-	-	-	-	-	++	++	++++	++++	++++	++++	++++
	Tel34	Απουσία Υπερ.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Παρουσία Υπερ.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Tel52	Απουσία Υπερ.	-	-	-	++	++	+++	+++	+++	+++	-	++	++	+++	-	-	-	-	-	-	-	++	++	++	++	-
		Παρουσία Υπερ.	-	-	-	++	++	+++	+++	+++	-	-	++	++	+++	-	-	-	-	-	-	-	++	++	+++	+++	-
	Ter90	Απουσία Υπερ.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Παρουσία Υπερ.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

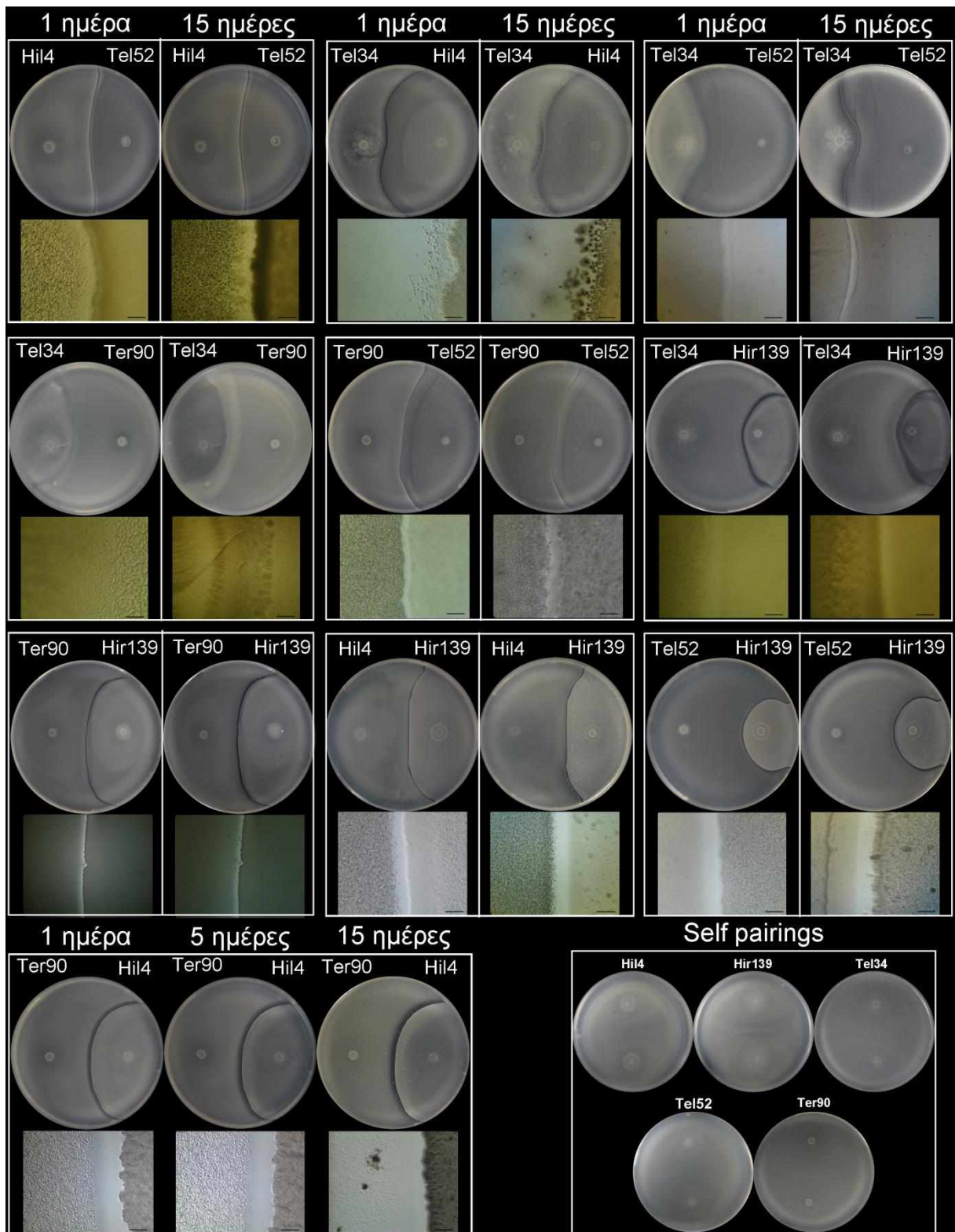
4.5.2 Αλληλεπίδραση επιλεγμένων στελεχών με τη δοκιμή σχηματισμού γραμμής οριοθέτησης κατά την ομαδική κίνηση σε επιφάνειες (swarm boundary assay)

Ακολούθησε η δοκιμή swarm boundary assay, η οποία είχε επίσης χρησιμοποιηθεί για την ομαδοποίηση των στελεχών σε προηγούμενο κεφάλαιο (Κεφ. 4.1.2.2). Στη συγκεκριμένη μέθοδο, εναιωρήματα κυττάρων των στελεχών εμβολιάζονται ανά ζεύγη με τη μορφή κηλίδας σε ημιστερεό θρεπτικό μέσο που ευνοεί την ομαδική κίνηση σε επιφάνειες (swarming motility). Οι δύο κύριοι φαινότυποι που αναφέρονται στη βιβλιογραφία είναι η παρουσία ή η απουσία μιας διαφανούς γραμμής οριοθέτησης (demarcation line, DL) στο σημείο συνάντησης των κινούμενων μετώπων, η οποία χρησιμοποιείται κυρίως για το διαχωρισμό βακτηριακών στελεχών σε kin ή non kin. Αυτή η τεχνική είχε ήδη πραγματοποιηθεί σε προηγούμενη στάδιο της έρευνας (Κεφάλαιο 4.1.2.2), με σκοπό την ομαδοποίηση των λειτουργικά όμοιων στελεχών, ωστόσο σε αυτό το σημείο το ενδιαφέρον επικεντρώθηκε στις εκβάσεις των αλληλεπιδράσεων των 5 επιλεγμένων στελεχών.

Οι φαινότυποι κατηγοριοποιήθηκαν σε α) συγχώνευση, όπου τα δύο κινούμενα βακτηριακά μέτωπα αναμιγνύονται πλήρως, β) επαφή, όπου τα δύο κινούμενα βακτηριακά μέτωπα έρχονται σε επαφή αλλά είναι ξεκάθαρος ο διαχωρισμός τους, γ) σχηματισμός πολύ μικρής ζώνης στο σημείο συνάντησης, δ) σχηματισμός μικρής ζώνης στο σημείο συνάντησης, ε) σχηματισμός μέτριας ζώνης στο σημείο συνάντησης, στ) σχηματισμός μεγάλης ζώνης στο σημείο συνάντησης. Στις αλληλεπιδράσεις όπου το ζεύγος αποτελούταν από το ίδιο στέλεχος (self-pairing) παρατηρήθηκε ο φαινότυπος συγχώνευση, όπου τα κινούμενα μέτωπα ενώνονται χωρίς να ξεχωρίζουν λόγω αναγνώρισης του εαυτού τους (self-recognition).

Ο πιο έντονος ανταγωνισμός παρατηρήθηκε ανάμεσα στα στελέχη Hil4 και Ter90, όπου η DL φαίνεται να μεγαλώνει κατά τη διάρκεια της επώασης κατά τη μακροσκοπική παρατήρηση των τρυβλίων και πιθανώς αυτό οφείλεται στη λύση των κυττάρων του Ter90 που βρίσκονται κοντά στη γραμμή, όπως φαίνεται κατά τη στερεοσκοπική παρατήρηση, αφήνοντας την περιοχή διαφανή. Παρόμοιο φαινόμενο παρατηρήθηκε και κατά την αλληλεπίδραση του στελέχους Hir139 με το Ter90. Το αντίθετο φαινόμενο παρατηρήθηκε με τα στελέχη Tel34-Hir139, όπου η DL δεν ήταν ξεκάθαρα διαφανής κατά τη στερεοσκοπική παρατήρηση και φάνηκε να καλύπτεται περισσότερο στην πάροδο των ημερών λόγω ανάπτυξης ενός ή και των 2 βακτηρίων επάνω στο ημιδιαφανές μέτωπο.

Ακόμη, κατά την αλληλεπίδραση των στελεχών Tel52-Hir139, η DL φάνηκε να αυξάνεται σε μέγεθος με την πάροδο του χρόνου, ωστόσο αυτό πιθανώς οφείλεται στην αύξηση της έντασης της διαφάνειας της DL. Μείωση της DL παρατηρήθηκε και κατά την αλληλεπίδραση των στελεχών Tel34 και Hil4, καθώς στην πάροδο του χρόνου και τα δύο στελέχη φάνηκε να αναπτύσσονται πάνω στη γραμμή. Μικρού μεγέθους DL παρατηρήθηκαν κατά την αλληλεπίδραση των στελεχών Hil4-Tel52, Tel34-Tel52 και Tel52-Ter90. Τέλος, επαφή παρατηρήθηκε μεταξύ των στελεχών Tel34-Ter90, το οποίο υποδηλώνει απουσία ανταγωνισμού.



Εικόνα 4.43 Αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες από την αλληλεπίδραση των επιλεγμένων στελεχών Hil4, Hir139, Tel34, Tel52, Hir139 σε όλους τους πιθανούς συνδυασμούς με τη δοκιμή σχηματισμού γραμμής οριοθέτησης κατά την ομαδική κίνηση σε επιφάνειες (swarm boundary assay). Κηλίδες (spots) ποσότητας 4 μl από εναϊόρημα κυττάρων δύο στελεχών τοποθετήθηκαν αντιδιαμετρικά σε απόσταση 2 cm σε ημιστερεό θρεπτικό μέσο NA, πραγματοποιήθηκε επώαση στους 30°C για 15 ημέρες και παρατήρηση μακροσκοπικά και στερεοσκοπικά.

4.5.3 Επιλογή τελικών μιγμάτων βακτηριακών στελεχών προς περαιτέρω εξέταση

Τα 5 επιλεγμένα στελέχη θα μπορούσαν να σχηματίσουν ζεύγη με πολλούς διαφορετικούς συνδυασμούς εξετάζοντας διάφορες προσεγγίσεις. Όπως προαναφέρθηκε, τα κριτήρια επιλογής των ζευγών στελεχών που θα αποτελούν ένα μίγμα ήταν ο βαθμός συμβατότητάς τους βάσει των *in vitro* τεχνικών που χρησιμοποιήθηκαν και η διαφορετικότητα των στελεχών ως προς τις ιδιότητες και τον τρόπο δράσης τους βάσει των *in vitro* δοκιμών. Επιλέχθηκαν ζεύγη συμβατών, αλλά και μη συμβατών στελεχών, με σκοπό να διερευνηθεί κατά πόσο η συμβατότητα *in vitro* συνάδει με τη συμβατότητα *in planta* καθώς και τη σχέση τους με το τελικό επιθυμητό αποτέλεσμα. Ακόμη, η προσέγγιση που ακολουθήθηκε ήταν πως τα ζεύγη θα έπρεπε να αποτελούνται από στελέχη που εμφανίζουν διαφορετικές ιδιότητες ως προς την προώθηση της ανάπτυξης των φυτών και την αντιμετώπιση παθογόνων μυκήτων με βάση τις *in vitro* δοκιμές έως τώρα, ώστε να διερευνηθεί εάν θα μπορούσε να δημιουργηθεί ένα μίγμα που να είναι αποτελεσματικό και στα δύο ζητούμενα, και ίσως πιο αποτελεσματικό από τα μεμονωμένα στελέχη.

Από τα προηγούμενα κεφάλαια, το στέλεχος Tel34 φάνηκε να έχει πολύ καλή ικανότητα για προώθηση της ανάπτυξης των φυτών, ειδικά στο φυτό *A. thaliana* Col-0, όπου στη δοκιμή με την υψηλή συγκέντρωση του βακτηρίου είχε την πιο έντονη θετική επίδραση στο φαινότυπο του φυτού. Ωστόσο, διαθέτει περιορισμένη ικανότητα βιολογική σε σχέση με τα υπόλοιπα στελέχη, *in vitro* αλλά και στους καρπούς ελιάς, ενώ δε φαίνεται να έχει τη δυνατότητα παραγωγής γνωστών αντιμυκητιακών μεταβολιτών. Γενικά, το στέλεχος Tel34 ήταν αρκετά διαφορετικό στέλεχος από τα υπόλοιπα βάσει του γονιδιωματικού του προφίλ στους δευτερογενείς μεταβολίτες. Το στέλεχος Hil4 φαίνεται να έχει πολύ καλή ικανότητα για προώθηση της ανάπτυξης των φυτών, ειδικά στο φυτό τομάτας, ενώ επέδειξε και καλή παρεμπόδιση φυτοπαθογόνων μυκήτων *in vitro*, ωστόσο πέτυχε περιορισμένη παρεμπόδιση του *C. acutatum* στους καρπούς ελιάς, παρουσιάζοντας τιμές παρόμοιες με το στέλεχος Tel34. Συνυπολογίζοντας τις ομοιότητες των δύο αυτών στελεχών στην ομαδική κίνηση σε επιφάνειες και το σχηματισμό βιοϋμενίου, κρίθηκε πως δεν πληρούσαν τα κριτήρια δημιουργίας μίγματος που είχαν τεθεί. Άλλα αρκετά όμοια στελέχη ως προς τις ιδιότητές τους ήταν τα Tel52 και Hir139, τα οποία είναι πολύ κοντά φυλογενετικά και με σχεδόν όμοιο δυναμικό στην παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών, οπότε δε δημιουργήθηκε μίγμα ούτε με τα συγκεκριμένα στελέχη.

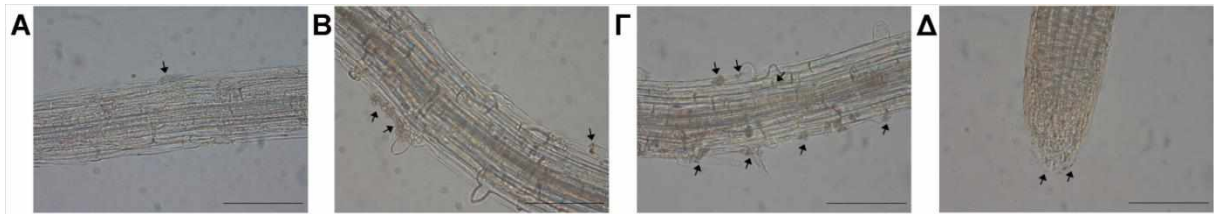
Το στέλεχος Ter90 είχε ομοιότητες στην προώθηση της φυτικής ανάπτυξης με τα στελέχη Tel52 και Hir139, είχε ομοιότητες με το στέλεχος Hil4 όσον αφορά την αντιμετώπιση φυτοπαθογόνων μυκήτων *in vitro* και τη δραστηριότητα των εκχυλισμάτων που περιείχαν τους εκκρινόμενους διαχεόμενους μεταβολίτες σε στερεή καλλιέργεια, ενώ επέδειξε ανταγωνιστικές ικανότητες έναντι του *C. acutatum* στις ελιές. Τα τρία αυτά στελέχη ανταγωνίστηκαν έντονα το στέλεχος Ter90 στις *in vitro* δοκιμές συμβατότητας, ενώ δεν υπήρξε ανταγωνιστικότητα μεταξύ των στελεχών Tel34 και Ter90. Λόγω του γεγονότος αυτού, σε συνδυασμό με τη διαφορετικότητα των ιδιοτήτων των δύο στελεχών, επιλέχθηκαν ως ζεύγος για δημιουργία μίγματος.

Τα επόμενα μίγματα θα έπρεπε να περιέχουν ένα από τα στελέχη Tel52 και Hir139, ως ισχυρούς παράγοντες βιολογικού αντιμετώπισης μυκήτων, και ένα από τα στελέχη Hil4 και Tel34, τα οποία είχαν δείξει ισχυρότερη προώθηση της ανάπτυξης των φυτών. Στις *in vitro* δοκιμές συμβατότητας των συνδυασμών Tel34-Tel52 και Tel34-Hir139, το Tel34 ήταν το αδύναμο στέλεχος, ενώ οι συνδυασμοί Hil4-Tel52 και Hil4-Hir139 έδειξαν αμοιβαία χαμηλή ανταγωνιστικότητα. Για να συμπεριληφθούν και τα δύο είδη *in vitro* ανταγωνισμού στις περαιτέρω μελέτες, επιλέχθηκαν δύο ζευγάρια για να δοκιμαστούν ως μίγματα. Καθώς το στέλεχος Hir139 φάνηκε να είναι περισσότερο ικανός παράγοντας αντιμετώπισης φυτοπαθογόνων μυκήτων από το Tel52 κατά τη δοκιμή στις ελιές, επιλέχθηκε να συνδυαστεί με το στέλεχος Tel34 το οποίο έχει πολύ περιορισμένη ικανότητα αντιμετώπισης φυτοπαθογόνων μυκήτων, ενώ το στέλεχος Tel52 επιλέχθηκε να συνδυαστεί με το στέλεχος Hil4.

Συνοψίζοντας, τα ζεύγη στελεχών για τη δημιουργία μιγμάτων ήταν τα: Hil4-Tel52, Tel34-Ter90 και Tel34-Hir139. Το ζεύγος Hil4-Tel52 αποτελείται από ένα στέλεχος ισχυρό στην προώθηση της φυτικής ανάπτυξης που έχει ικανότητα αντιμετώπισης φυτοπαθογόνων μυκήτων (Hil4) και από ένα στέλεχος αρκετά καλό στην αντιμετώπιση φυτοπαθογόνων μυκήτων και την προώθηση της φυτικής ανάπτυξης (Tel52), τα οποία είχαν αμοιβαία χαμηλή ανταγωνιστικότητα στις *in vitro* δοκιμές. Το ζεύγος Tel34-Ter90 αποτελείται από ένα στέλεχος ισχυρό στην προώθηση της φυτικής ανάπτυξης που δεν έχει ιδιαίτερες ικανότητες αντιμετώπισης φυτοπαθογόνων μυκήτων (Tel34) και από ένα στέλεχος αρκετά καλό στην αντιμετώπιση φυτοπαθογόνων μυκήτων, αλλά και την προώθηση της φυτικής ανάπτυξης (Ter90), μεταξύ των οποίων δεν παρατηρήθηκε ανταγωνισμός στις *in vitro* δοκιμές. Τέλος, το ζεύγος Tel34-Hir139 αποτελείται από ένα στέλεχος ισχυρό στην προώθηση της φυτικής ανάπτυξης (Tel34) και από ένα στέλεχος ισχυρό στην αντιμετώπιση φυτοπαθογόνων μυκήτων (Hir139) και αρκετά καλό στην προώθηση της φυτικής ανάπτυξης, με το τελευταίο να επιδεικνύει μονόπλευρη ανταγωνιστικότητα έναντι του Tel34 στις *in vitro* δοκιμές.

4.6 Αποικισμός και επίδραση των μεμονωμένων και μιγμάτων βακτηριακών στελεχών σε φυτά *Arabidopsis thaliana* Col-0 *in vitro*

Τα επιλεγμένα βακτήρια εξετάστηκαν ως προς την ικανότητά τους να αποικίζουν τη ρίζα του φυτού *A. thaliana* Col-0 υπό *in vitro* συνθήκες όταν εμβολιάζονται μόνα τους ή σε συνδυασμό με άλλο βακτήριο σε μίγμα ώστε να εξεταστεί και η συμβατότητα των επιλεγμένων μιγμάτων. Αρχικά, επιβεβαιώθηκε ότι τα βακτηριακά κύτταρα κάθε στελέχους μπορούν να αποικίσουν τη ρίζα και να προσκολληθούν στην επιφάνειά της, μετά από επώαση βακτηριακού εναιωρήματος και φυταρίου αραβίδωσης, έκπλυση της ρίζας και μικροσκοπική παρατήρηση (Εικόνα 4.44).

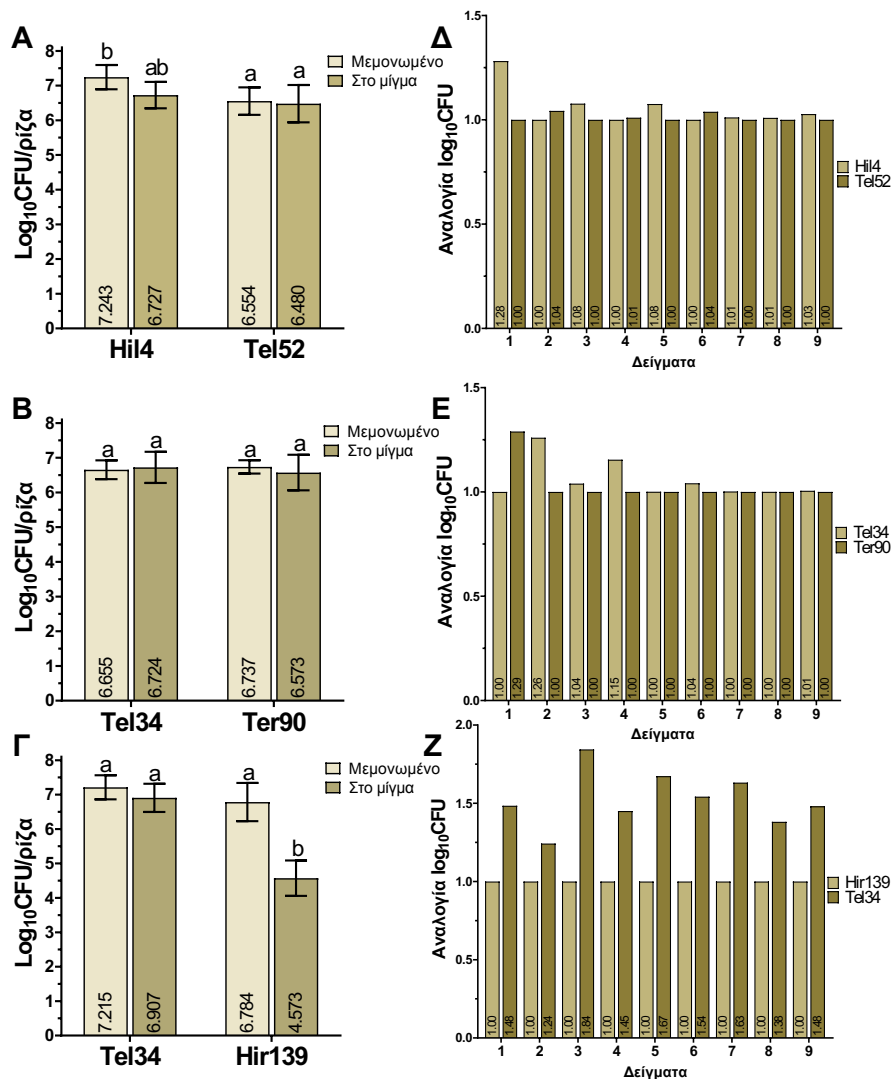


Εικόνα 4.44 Αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες μικροσκοπικών παρατηρήσεων ριζών από φυτά *Arabidopsis thaliana* Col-0 μετά από επώαση σε βακτηριακό εναιώρημα για 18 ώρες και προσεκτικό ξέπλυμα. (Α), (Β), (Γ) Φωτογραφίες σε διάφορα σημεία της ρίζας, (Δ) Φωτογραφία ακρορριζίου. Τα βέλη υποδεικνύουν θέσεις βακτηριακού αποικισμού. (κλίμακα=200 μm)

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε επώαση των βακτηριακών στελεχών με ρίζες φυταρίων αραβίδωσης, ως μεμονωμένα στελέχη ή ως μίγματα στελεχών ανθεκτικά σε διαφορετικά αντιβιοτικά. Μετά το πέρας της επώασης, ακολούθησαν ξεπλύματα της ρίζας για να αποκολληθούν τα χαλαρά προσκολλημένα βακτηριακά κύτταρα, ενώ διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις του τελευταίου ξεπλύματος επιστρώθηκαν σε στερεό θρεπτικό μέσο που περιείχε το κατάλληλο αντιβιοτικό για να υπολογιστούν οι μονάδες σχηματισμού αποικιών (CFU).

Φαίνεται πως η συγκέντρωση των στελεχών Hil4 και Tel52 δεν έχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ του μονού και του διπλού εμβολιασμού τους, ωστόσο φαίνεται πως το στέλεχος Hil4 είναι λίγο πιο ικανό στον αποικισμό από το Tel52 (**Εικόνα 4.45Α**). Ακόμη, παρατηρήθηκε πως η αναλογία των CFU των δύο στελεχών είναι περίπου 1:1 στα 5 από τα 9 δείγματα, ενώ είναι 1:2 (Hil4:Tel52) στο δείγμα 2, 3:1 (Hil4:Tel52) στα δείγματα 3 και 5 και **28:1** (Hil4:Tel52) στο δείγμα 1 (**Εικόνα 4.45Β**).

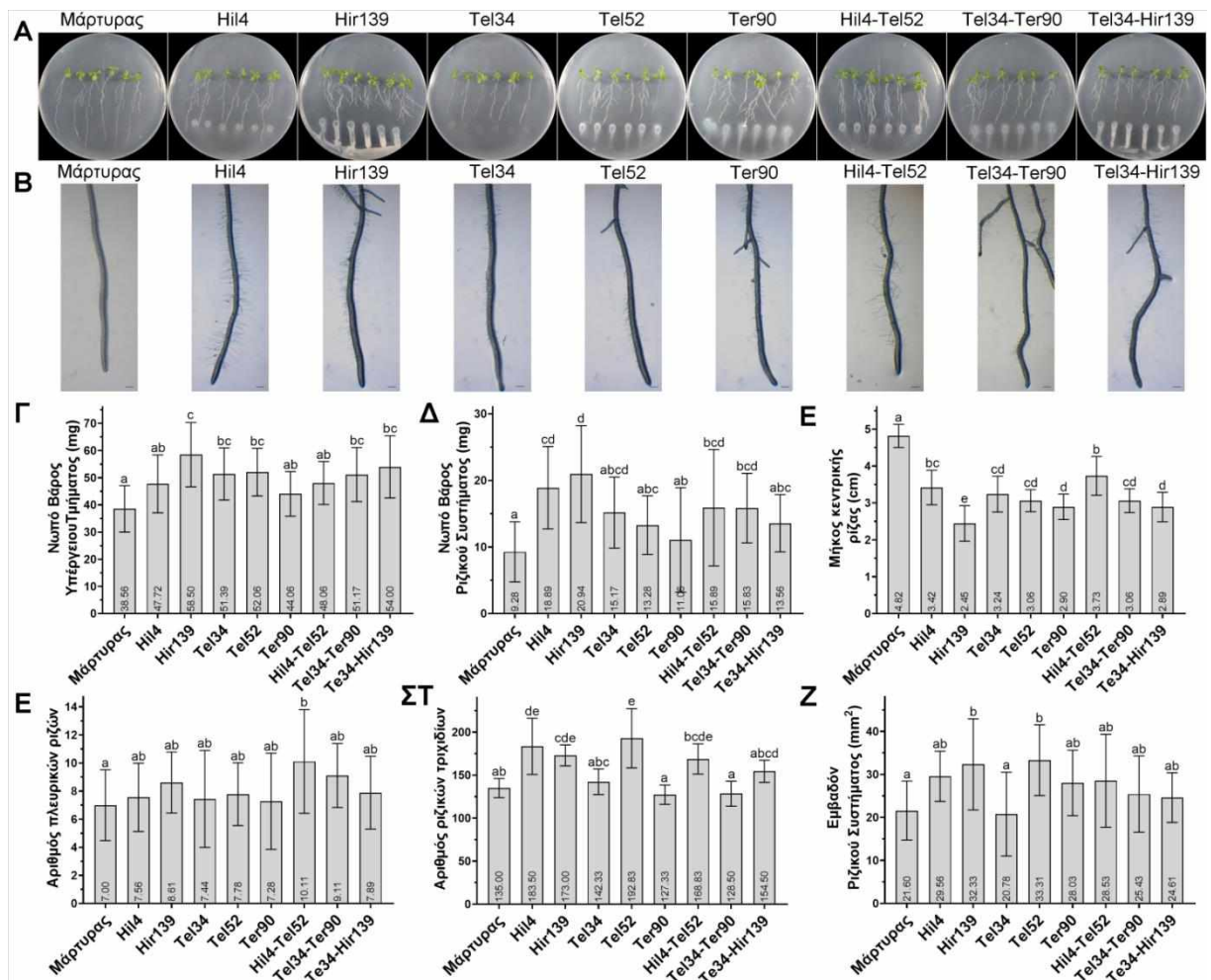
Όσον αφορά το μίγμα Tel34-Ter90, οι συγκεντρώσεις τους δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά, είτε το στέλεχος είναι μεμονωμένο είτε είναι σε μίγμα, ενώ και η ικανότητα αποικισμού τους ως μονά στελέχη είναι παρόμοια (**Εικόνα 4.45Γ**). Επίσης, η αναλογία των CFU διατηρείται περίπου 1:1 στα περισσότερα δείγματα που εξετάστηκαν, εκτός από το δείγμα 1 όπου η αναλογία είναι 1:43 (Tel34:Ter90), το δείγμα 2 όπου η αναλογία είναι 32:1 (Tel34:Ter90) και το δείγμα 4 όπου η αναλογία είναι 8:1 (Tel34:Ter90) (**Εικόνα 4.45Δ**). Τέλος, στο μίγμα Tel34-Hir139 παρατηρείται μία έντονη μείωση του πληθυσμού του Hir139 όταν εμβολιάστηκε ως μίγμα με το Tel34, κατά 100 φορές περίπου, ενώ τα μεμονωμένα στελέχη έδειξαν παρόμοια ικανότητα αποικισμού της ρίζας (**Εικόνα 4.45Ε**). Η μείωση αυτή παρατηρήθηκε σε όλα τα δείγματα, με έντονες αυξομειώσεις ωστόσο στις αναλογίες κάθε μίγματος (**Εικόνα 4.45Ζ**). Η αναλογία CFU των δύο στελεχών είχε ένα εύρος από 19:1 (Tel34:Hir139) στο δείγμα 2, 200:1 (Tel34:Hir139) στο δείγμα 1 έως 1661:1 (Tel34:Hir139) στο δείγμα 3.



Εικόνα 4.45 Αποικισμός βακτηριακών στελεχών σε ρίζες *Arabidopsis thaliana* Col-0 μετά τον εμβολιασμό μεμονωμένου ή μίγματος στελεχών. Ρίζες φυταρίων 7 ημερών εμβαπτίστηκαν σε υγρό θρεπτικό μέσο ½ MS που περιείχε εναιώρημα κυττάρων από ένα ή δύο στελέχη ανθεκτικά σε αντιβιοτικά, ακολούθησε επώαση υπό ήπια ανάδευση στους 28 °C για 18 ώρες και ξέπλυμα της ρίζας από τα χαλαρά προσκολλημένα κύτταρα, ενώ το τελευταίο ξέπλυμα έγινε με χρήση vortex για την αποκόλληση των ισχυρά προσκολλημένων κυττάρων. Αραιώσεις του διαλύματος αυτού επιστρώθηκαν σε τρυβλία NA με τα κατάλληλα αντιβιοτικά και καταμετρήθηκαν τα CFU. Αποικισμός (Log₁₀CFU) των βακτηρίων ως μεμονωμένα και ως μίγμα για τα μίγματα Hil4-Tel52 (A), Tel34-Ter90 (B), Tel34-Hir139 (Γ). Μεταχειρίσεις με το ίδιο γράμμα δεν έχουν στατιστικά σημαντική διαφορά (p<0.05) σύμφωνα με την post hoc ανάλυση Tukey's HSD που ακολούθησε την One-way ANOVA για τους μέσους όρους. Οι ράβδοι αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο των συνδυασμένων δεδομένων από 3 ανεξάρτητα πειράματα με 3 φυτά το καθένα (n=9), ο οποίος αναγράφεται μέσα σε κάθε ράβδο, ενώ οι κάθετες μπάρες υποδεικνύουν την τυπική απόκλιση του μέσου όρου. Αναλογία log₁₀CFU των στελεχών από τις μεταχειρίσεις των μιγμάτων επάνω στη ρίζα των φυταρίων για τα μίγματα Hil4-Tel52 (Δ), Tel34-Ter90 (Ε), Tel34-Hir139 (Ζ).

Ακολούθησε η πρώτη αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας των μιγμάτων σε σχέση με τα μεμονωμένα στελέχη στο φυτό-μοντέλο *A. thaliana* σε *in vitro* συνθήκες, όπου εναιωρήματα κυττάρων των στελεχών αποτέλεσαν μεμονωμένο εμβόλιο ή αναμίχθηκαν και εμβολιάστηκαν ως μίγμα σε απόσταση από τις ρίζες. Το κάθε στέλεχος και μίγμα επηρέασαν διαφορετικά το φαινότυπο των φυταρίων (Εικόνα 4.46A), αλλά και τα ριζικά τριχίδια της κεντρικής ρίζας (Εικόνα 4.46B). Αύξηση του νωπού βάρους του υπέργειου τμήματος με στατιστικά σημαντική διαφορά από το μάρτυρα προκλήθηκε από τα στελέχη Hir139, Tel34, Tel52 και τα μίγματα Tel34-Ter90, Tel34-

Hir139. Τα μίγματα δεν είχαν στατιστικά σημαντική διαφορά από τα μεμονωμένα στελέχη που τα αποτελούσαν. Όσον αφορά το νωπό βάρος του ριζικού συστήματος (**Εικόνα 4.46Γ**), στατιστικά σημαντική διαφορά από το μάρτυρα παρουσίασαν τα στελέχη Hil4, Hir139 και τα μίγματα Hil4-Tel52, Tel34-Hir139. Μεγαλύτερη αύξηση προκάλεσε το στέλεχος Hir139, ακολουθούμενο από το στέλεχος Hil4. Τα μίγματα Hil4-Te52 και Tel34-Ter90 δεν έδειξαν στατιστικά σημαντική διαφορά από τα μεμονωμένα στελέχη, σε αντίθεση με το μίγμα Tel34-Hir139, το οποίο έχει στατιστικά σημαντική διαφορά από το στέλεχος Hir139, ομοιάζοντας περισσότερο στις τιμές του Tel34. Η μεταχείριση του μάρτυρα παρουσίασε το πιο μεγάλο μήκος κεντρικής ρίζας (**Εικόνα 4.46Δ**), έχοντας στατιστικά σημαντική διαφορά από όλες τις μεταχειρίσεις. Κοντότερη ρίζα προκάλεσε το στέλεχος Hir139 με στατιστικά σημαντική διαφορά από όλες τις μεταχειρίσεις, ακολουθούμενο από το στέλεχος Ter90 και το μίγμα Tel34-Hir139. Τα μίγματα Tel34-Ter90 και Tel34-Hir139 δεν είχαν στατιστικά σημαντική διαφορά από τα μεμονωμένα στελέχη, ωστόσο το μίγμα Hil4-Tel52 έδειξε στατιστικά σημαντική διαφορά μόνο από το στέλεχος Tel52, ενώ προκάλεσε μεγαλύτερο μήκος από τα δύο μεμονωμένα στελέχη. Αυξημένο αριθμό πλευρικών ριζών (**Εικόνα 4.46Ε**) με στατιστικά σημαντική διαφορά από το μάρτυρα προκάλεσε μόνο το μίγμα Hil4-Tel52, το οποίο δεν είχε στατιστικά σημαντική διαφορά από τις υπόλοιπες μεταχειρίσεις. Τα ριζικά τριχίδια του ακρορριζίου (**Εικόνα 4.46Ζ**) αυξήθηκαν με στατιστικά σημαντική διαφορά από το μάρτυρα με τον εμβολιασμό των στελεχών Hil4, Hir139, Tel52 και το μίγμα Hil4-Tel52, με μεγαλύτερη τιμή να παρατηρείται από το στέλεχος Tel52, ακολουθούμενο από το Hil4. Κανένα μίγμα δεν είχε στατιστικά σημαντική διαφορά από τα μεμονωμένα στελέχη του. Ωστόσο, παρατηρήθηκε πως η μεταχείριση του μίγματος Hil4-Tel52 είχε λιγότερα ριζικά τριχίδια και από τα δύο στελέχη, η μεταχείριση του μίγματος Tel34-Ter90 φάνηκε να είναι περισσότερο όμοιο με το Ter90 παρουσιάζοντας μικρότερο αριθμό τριχιδίων από το Tel34, ενώ η μεταχείριση του μίγματος Tel34-Hir139 είχε παρόμοιο αριθμό τριχιδίων με το Tel34, δηλαδή λιγότερα από το Hir139. Τέλος, το εμβαδόν του ριζικού συστήματος (**Εικόνα 4.46Η**) αυξήθηκε στατιστικά σημαντικά σε σχέση με το μάρτυρα μόνο στις περιπτώσεις εμβολιασμού των στελεχών Tel52 και Hir139, με μεγαλύτερες τιμές αυτές του Tel52. Οι τιμές των μεταχειρίσεων των μιγμάτων και πάλι δεν είχαν στατιστικά σημαντική διαφορά από τις μεταχειρίσεις των μεμονωμένων στελεχών. Το μίγμα Hil4-Tel52 έδειξε τιμές κοντινότερες στις τιμές του Hil4, μικρότερες του Tel52. Το μίγμα Tel34-Ter90 παρουσίασε τιμές ενδιάμεσες των δύο μεμονωμένων στελεχών του. Το μίγμα Tel34-Hir139 εμφάνισε τιμές κοντινότερες στις τιμές του στελεχούς Tel34, δηλαδή μικρότερες από του στελεχούς Hir139.



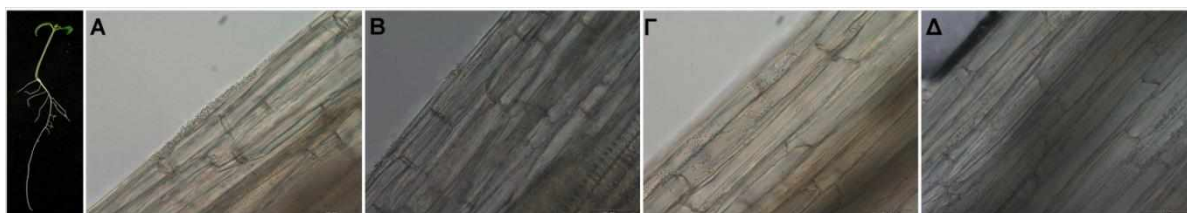
Εικόνα 4.46 Επίδραση μεμονωμένων και μιγμάτων βακτηρίων στην ανάπτυξη του φυτού *A. thaliana* Col-0 12 ημέρες μετά τον εμβολιασμό σε απόσταση από το ακρορρίζιο. Φυτάρια *A. thaliana* 4 ημερών μεταφυτεύτηκαν σε στερεό θρεπτικό μέσο ½ MS με 0.5% (w/v) σουκρόζη και ακολούθησε εμβολιασμός με 10 μl βακτηριακού εμβολίου (εναίωρημα κυττάρων) σε απόσταση 3 cm. Τα τρυβλία επωάστηκαν σε θάλαμο ανάπτυξης (16:8 φωτοπερίοδος, 22±1 °C, 50-60% σχετική υγρασία) για άλλες 12 ημέρες. (A) Αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες φαινοτύπων για την κάθε μεταχείριση (B) Αντιπροσωπευτικές στερεοσκοπικές φωτογραφίες του ακρορρίζιου για την κάθε μεταχείριση (scale bar=500 nm), (Γ) Νωπό Βάρος υπέργειου τμήματος (mg), (Δ) Νωπό Βάρος ριζικού συστήματος (mg), (E) Αριθμός πλευρικών ριζών, (ΣΤ) Αριθμός ριζικών τριγυδίων, (Z) Εμβαδόν Ριζικού Συστήματος (mm²). Μεταχειρίσεις με το ίδιο γράμμα δεν έχουν στατιστικά σημαντική διαφορά (p<0.05) σύμφωνα με την post hoc ανάλυση Tukey's HSD που ακολούθησε την One-way ANOVA για τους μέσους όρους. Οι ράβδοι αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο του συνόλου των φυτών που αναλύθηκαν για κάθε μεταχείριση (n=18 φυτά), ο οποίος αναγράφεται μέσα σε κάθε ράβδο, ενώ οι κάθετες μπάρες υποδεικνύουν την τυπική απόκλιση του μέσου όρου.

4.7 Επίδραση μεμονωμένων και μιγμάτων βακτηριακών στελεχών στην ανάπτυξη του φυτού *Solanum lycopersicum* var. Chondrokatsari Messinias σε συνθήκες θερμοκηπίου

Για να μελετηθεί η επίδραση των μεμονωμένων στελεχών και των επιλεγμένων μιγμάτων στελεχών σε φυτά τομάτας υπό συνθήκες θερμοκηπίου, έπρεπε να διερευνηθεί η ικανότητά τους να αποικίζουν τη ρίζα του φυτού *Solanum lycopersicum* var. Chondrokatsari Messinias, αλλά και της ριζόσφαιρας του.

Αρχικά, εξετάστηκε ο αποικισμός των μεμονωμένων στελεχών στη ρίζα των φυταρίων τομάτας μετά από βιοδιέγερση του σπόρου και ανάπτυξη του φυταρίου για 8 ημέρες σε *in vitro* ασηπτικές

συνθήκες. Ακολούθησε ξέπλυμα των ριζών και μικροσκοπική παρατήρησή τους. Όλα τα στελέχη είχαν την ικανότητα να αποικίσουν τη ρίζα και να προσκολληθούν στην επιφάνειά της, είτε ως συσσωματώματα κυττάρων (**Εικόνα 4.47A, B**), είτε ως μεμονωμένα κύτταρα (**Εικόνα 4.47Γ, Δ**), υποδεικνύοντας την ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου.

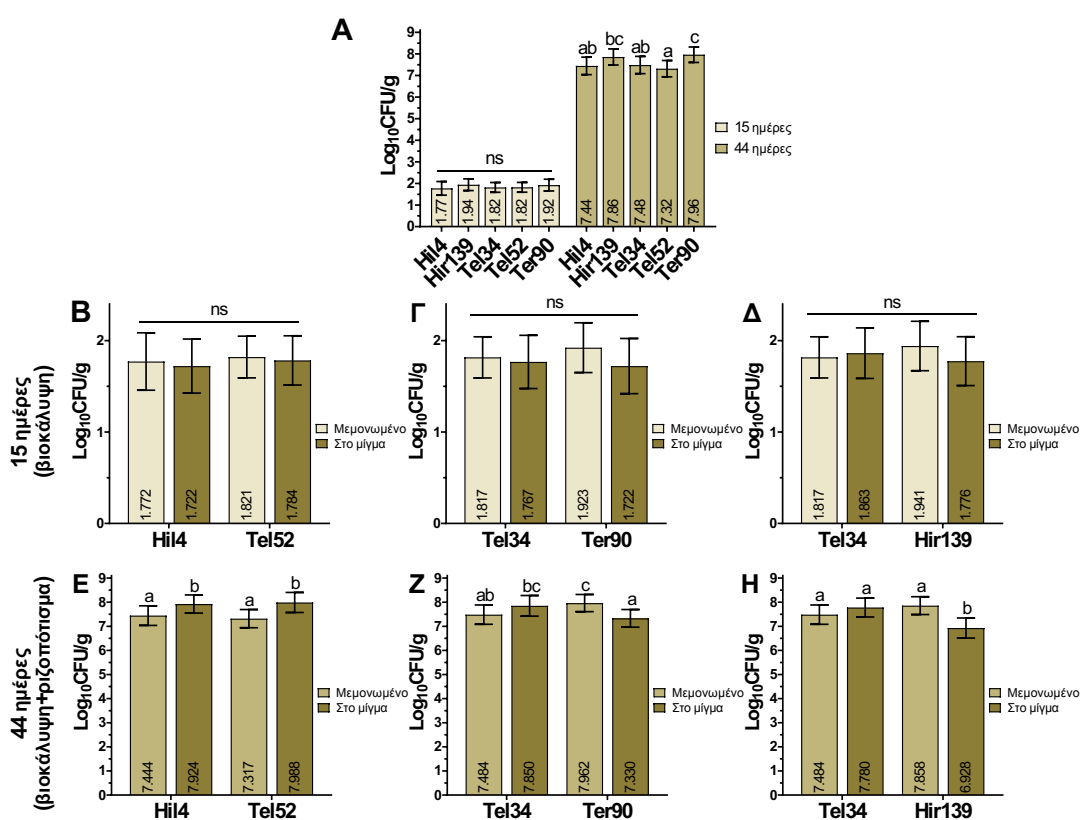


Εικόνα 4.47 Αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες μικροσκοπικής παρατήρησης φυτών τομάτας (*Solanum lycopersicum* var. Chondrokatsari Messinias) μετά από βιοδιέγερση των σπόρων και επώαση για 8 ημέρες. Σπόροι τομάτας μετά τη βιοδιέγερση με εναιωρήματα βακτηριακών στελεχών (10^8 CFU/ml) με τη βοήθεια του συγκολλητικού παράγοντα CMC (1%), τοποθετήθηκαν σε τρυβλία που περιείχαν θρεπτικό υλικό $\frac{1}{2}$ MS και 0.8% (w/v) αγαρ, επώαστηκαν 3 ημέρες στο σκοτάδι και άλλες 5 ημέρες σε θάλαμο ανάπτυξης φυτών στους 25 °C. Οι ρίζες ξεπλύθηκαν για να απομακρυνθούν τα χαλαρά προσκολλημένα κύτταρα και παρατηρήθηκαν στο μικροσκόπιο.

Στη συνέχεια, εξετάστηκε η ικανότητα αποικισμού των μεμονωμένων αλλά και μιγμάτων στελεχών στη ριζόσφαιρα φυτών τομάτας σε συνθήκες θερμοκηπίου. Ο πειραματικός σχεδιασμός ήταν ίδιος με αυτόν για τη διερεύνηση της επίδρασης των στελεχών στην ανάπτυξη του φυτού και οι δύο δοκιμές εκτελέστηκαν παράλληλα, ωστόσο στη δοκιμή αποικισμού χρησιμοποιήθηκαν στελέχη ανθεκτικά σε αντιβιοτικά. Πραγματοποιήθηκε βιοδιέγερση των σπόρων είτε με εναιώρημα κυττάρων μεμονωμένων στελεχών είτε με μίγμα εναιωρημάτων στελεχών σε αναλογία 1:1 με τη βοήθεια του συγκολλητικού παράγοντα CMC (1%) και αυτοί φυτεύτηκαν σε υπόστρωμα τύρφης-περλίτη. Στις 15 ημέρες και τις 30 ημέρες μετά τη φύτευση πραγματοποιήθηκε ριζοπότισμα με βακτηριακή καλλιέργεια μεμονωμένων στελεχών ή μίγμα βακτηριακών καλλιεργειών, ενώ στις 44 ημέρες έληξε το πείραμα και πραγματοποιήθηκαν οι μετρήσεις των χαρακτηριστικών των φυτών. Για τον προσδιορισμό της ικανότητας αποικισμού, ριζοσφαιρικό έδαφος συλλέχθηκε πριν το πρώτο ριζοπότισμα (15 ημέρες) και στη λήξη του πειράματος (44 ημέρες).

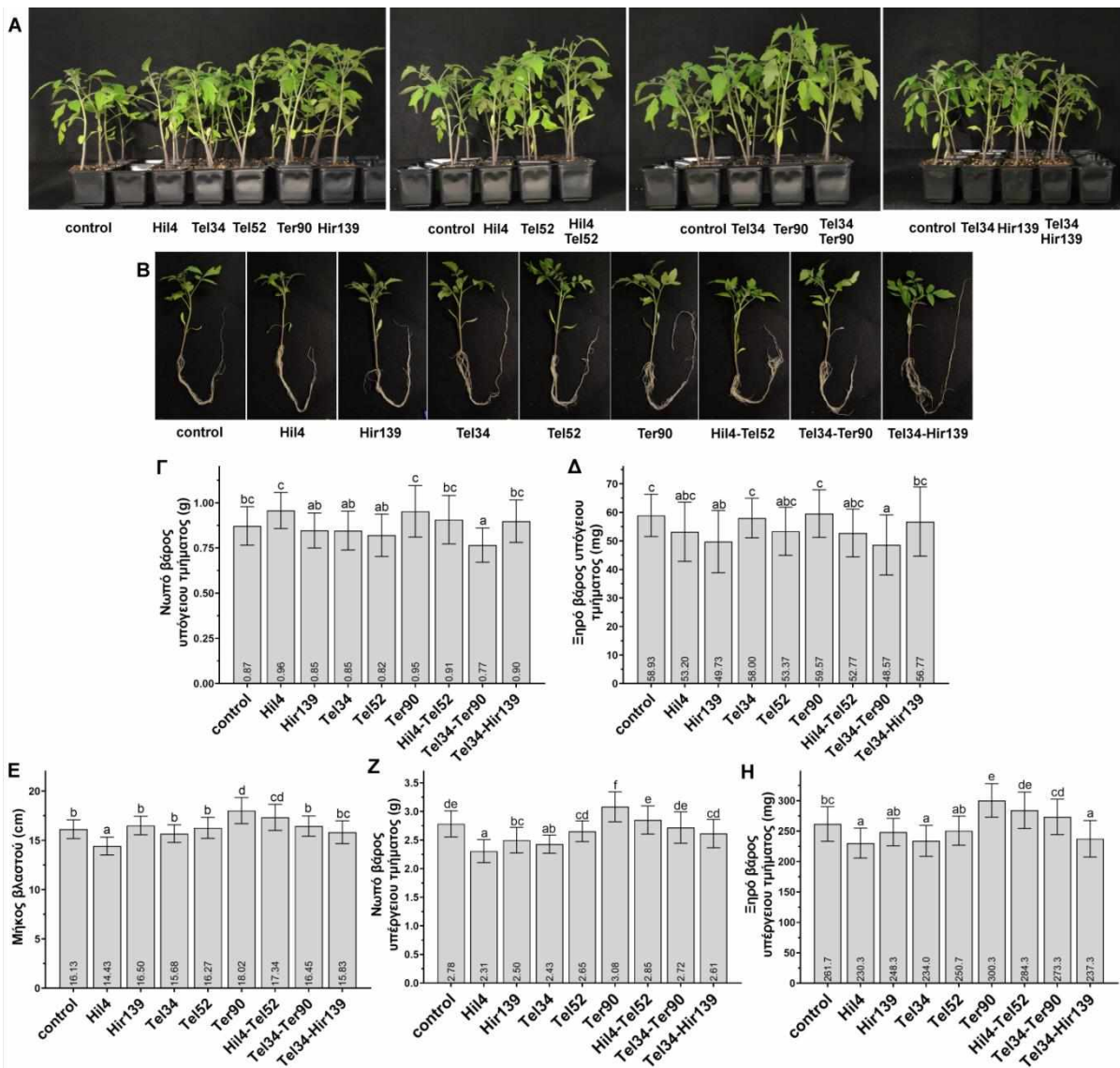
Όσον αφορά τον αποικισμό, αρχικά συγκρίθηκαν τα στελέχη που εμβολιάστηκαν μεμονωμένα για κάθε δειγματοληψία. Ο αποικισμός στις 15 ημέρες μετά το biopriming ήταν ίδιος για όλα τα στελέχη και κυμάνθηκε περίπου στις τιμές 50-100 CFU/ml (**Εικόνα 4.48A**). Στις 44 ημέρες μετά τη βιοδιέγερση, όπου παρεμβλήθηκαν δύο ριζοποτίσματα, η συγκέντρωση των κυττάρων κυμάνθηκε στο εύρος 10^8 CFU/ml, με καλύτερο αποικισμό να παρουσιάζει το στέλεχος Ter90 ακολουθούμενο από το Hil139. Συγκρίνοντας τον αποικισμό των στελεχών όταν εμβολιάστηκαν μεμονωμένα ή σε μίγμα στις 15 ημέρες μετά τη βιοδιέγερση, παρατηρείται πως τα στελέχη δεν είχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές, υποδεικνύοντας ότι δεν επηρεάστηκαν από την παρουσία του άλλου βακτηρίου στο μίγμα (**Εικόνα 4.48B,Γ,Δ**). Στις 44 ημέρες, εξετάζοντας το μίγμα Hil4-Tel52, παρατηρήθηκε πως το στέλεχος Hil4 είχε κατά 4.5 φορές μεγαλύτερες τιμές CFU/g από το στέλεχος Tel52 όταν αυτά εμβολιάστηκαν μεμονωμένα, χωρίς να υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά (**Εικόνα 4.48E**). Όταν εμβολιάστηκαν ως μίγμα, ο πληθυσμός των στελεχών Hil4 και Tel52 αυξήθηκε κατά 3.3 φορές και 4.7 φορές αντίστοιχα με στατιστικά σημαντικό τρόπο με αποτέλεσμα τα δύο στελέχη να βρίσκονται

σε αναλογία 1:1 (Εικόνα 4.48E). Όσον αφορά το μίγμα Tel34-Ter90, το στέλεχος Ter90 φάνηκε να έχει καλύτερο αποικισμό από το στέλεχος Tel34 με στατιστικά σημαντική διαφορά κατά το μονό εμβολιασμό και τιμές CFU/g 3 φορές μεγαλύτερες, ωστόσο η συγκέντρωση των κυττάρων του μειώθηκε στατιστικά σημαντικά όταν εμβολιάστηκε ως μίγμα κατά 5 φορές σε σχέση με το μονό του εμβολιασμό (Εικόνα 4.48Z). Το στέλεχος Tel34 δεν είχε στατιστικά σημαντική διαφορά όταν εμβολιάστηκε ως μίγμα σε σύγκριση με το μονό εμβολιασμό, με 3 φορές αύξηση της τιμής CFU/g (Εικόνα 4.48Z). Τα στελέχη Tel34 και Hir139 δεν είχαν στατιστικά σημαντική διαφορά όταν εμβολιάστηκαν μεμονωμένα, με το Hir139 να έχει διπλάσια μέση τιμή CFU/g, ενώ κατά τον εμβολιασμό ως μίγμα οι τιμές του Hir139 μειώθηκαν στατιστικά σημαντικά κατά 6 φορές σε σχέση με το μονό εμβολιασμό, ενώ του Tel34 διπλασιάστηκαν, χωρίς στατιστικά σημαντική διαφορά (Εικόνα 4.48H).



Εικόνα 4.48 Αποικισμός βακτηριακών στελεχών ως μεμονωμένα ή μίγματα στη ριζόσφαιρα τομάτας (*Solanum lycopersicum* var. Chondrokatsari Messinias) σε συνθήκες θερμοκηπίου. Σπόροι τομάτας μετά τη βιοδιέγερση με μεμονωμένα στελέχη (10^8 /ml) ή μίγμα στελεχών (1:1) ανθεκτικών σε αντιβιοτικά φυτεύτηκαν σε υπόστρωμα τύρφης-περλίτη, στις 15 και 30 ημέρες μετά τη φύτευση πραγματοποιήθηκε ριζοπότισμα με βακτηριακές καλλιέργειες μεμονωμένων στελεχών ή μίγματα καλλιεργειών και στις 44 ημέρες συλλέχθηκε έδαφος από τη ριζόσφαιρα. (A) Αποικισμός (\log_{10} CFU) μεμονωμένων στελεχών στις 15 ημέρες (πριν το πρώτο ριζοπότισμα) και στις 44 ημέρες. Μεταχειρίσεις με το ίδιο γράμμα στην κάθε ομάδα δεν έχουν στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0.05$) σύμφωνα με την post hoc ανάλυση Tukey's HSD που ακολούθησε την One-way ANOVA για τους μέσους όρους. Αποικισμός (\log_{10} CFU) των στελεχών ως μεμονωμένο εμβόλιο και στα μίγματα Hil4-Tel52, Tel34-Ter90 και Tel34-Hir139 στις 15 (B, Γ, Δ) και 44 (E, Z, H) ημέρες, αντίστοιχα. Μεταχειρίσεις με το ίδιο γράμμα δεν έχουν στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0.05$) σύμφωνα με την post hoc ανάλυση Tukey's HSD που ακολούθησε την One-way ANOVA για τους μέσους όρους. Οι ράβδοι αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο 3 ανεξάρτητων επαναλήψεων με 4 καρπούς το καθένα ($n=12$), ο οποίος αναγράφεται μέσα σε κάθε ράβδο, ενώ οι κάθετες μπάρες υποδεικνύουν την τοπική απόκλιση του μέσου όρου.

Τα βακτηριακά στελέχη και τα μίγματα βακτηριακών στελεχών εξετάστηκαν και ως προς την επίδρασή τους στην ανάπτυξη των φυτών τομάτας υπό συνθήκες θερμοκηπίου (**Εικόνα 4.49**). Η θετική επίδραση κάποιων βακτηριακών στελεχών ή μιγμάτων στο υπέργειο (**Εικόνα 4.49Α**) ή υπόγειο τμήμα (**Εικόνα 4.49Β**) συγκριτικά με τη μεταχείριση του μάρτυρα είναι εμφανής. Όσον αφορά το νωπό βάρος της ρίζας (**Εικόνα 4.49Γ**), μεγαλύτερες τιμές είχε η μεταχείριση Ter90, ακολουθούμενη από τη μεταχείριση Hil4, αν και όχι με στατιστικά σημαντική διαφορά. Οι μεταχειρίσεις των μιγμάτων Hil4-Tel52 και Tel34-Hir139 δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με τις μεταχειρίσεις των αντίστοιχων μεμονωμένων στελεχών, ενώ η μεταχείριση του μίγματος Tel34-Ter90 έδειξε παρόμοια συμπεριφορά με τη μεταχείριση Tel34, με μικρότερο νωπό βάρος από την Ter90. Στις μετρήσεις του ξηρού βάρους ρίζας (**Εικόνα 4.49Δ**), η μεταχείριση του μάρτυρα και οι περισσότερες μεταχειρίσεις είχαν παρόμοια υψηλές τιμές, ενώ χαμηλότερες τιμές με στατιστικά σημαντική διαφορά από το μάρτυρα είχαν οι μεταχειρίσεις Hir139 και Tel34-Ter90. Οι μεταχειρίσεις των μιγμάτων Hil4-Tel52 και Tel34-Hir139 δεν εμφάνισαν στατιστικά σημαντική διαφορά από τα αντίστοιχα μεμονωμένα στελέχη, ενώ η μεταχείριση του μίγματος Tel34-Ter90 εμφάνισε χαμηλότερες τιμές με στατιστικά σημαντική διαφορά από τις Tel34 και Ter90. Όσον αφορά το μήκος του κεντρικού στελέχους (**Εικόνα 4.49Ε**), οι μεταχειρίσεις με μικρότερο μήκος από το μάρτυρα ήταν οι Hil4 (στατιστικά σημαντική διαφορά) και Tel34 (μη στατιστικά σημαντική διαφορά). Οι μεταχειρίσεις με το μεγαλύτερο μήκος και στατιστικά σημαντική διαφορά από τη μεταχείριση του μάρτυρα ήταν η Ter90 και, ακολούθως, η Hil4-Tel52. Η μεταχείριση του μίγματος Tel34-Hir139 δεν είχε στατιστικά σημαντική διαφορά από τις μεταχειρίσεις των μεμονωμένων της στελεχών, ενώ η μεταχείριση του μίγματος Tel34-Ter90 ομοιάζει με τη μεταχείριση Tel34, παρουσιάζοντας πιο χαμηλό μήκος από τη μεταχείριση Ter90. Ωστόσο, η μεταχείριση του μίγματος Hil4-Tel52 παρουσίασε μήκος κεντρικής ρίζας μεγαλύτερο με στατιστικά σημαντική διαφορά από τις μεταχειρίσεις των μεμονωμένων στελεχών. Για το νωπό βάρος του υπέργειου τμήματος (**Εικόνα 4.49Ζ**) παρατηρήθηκε πως η μεταχείριση του μάρτυρα είχε υψηλές τιμές, με τη μόνη μεταχείριση να τις ξεπερνάει με στατιστικά σημαντική διαφορά να είναι η Ter90, ενώ η μεταχείριση Hil4 είχε μικρότερο βάρος από το μάρτυρα. Η μεταχείριση Tel34-Ter90 εμφάνισε τιμές μεγαλύτερες από τη μεταχείριση Tel34, αλλά μικρότερες από την Ter90 με στατιστικά σημαντική διαφορά. Η μεταχείριση Tel34-Hir139 εμφάνισε τιμές μεγαλύτερες από τη μεταχείριση Tel34 με στατιστικά σημαντική διαφορά και όμοιες με τη Hir139. Η μεταχείριση του μίγματος Hil4-Tel52 παρουσίασε τιμές μεγαλύτερες και από τις 2 μεταχειρίσεις των στελεχών που το απαρτίζουν, με στατιστικά σημαντική διαφορά. Τέλος, όσον αφορά το ξηρό βάρος του υπέργειου τμήματος (**Εικόνα 4.49Η**), τιμές μεγαλύτερες από τη μεταχείριση του μάρτυρα παρουσίασαν οι μεταχειρίσεις Ter90 και Hil4-Tel52. Η μεταχείριση του μίγματος Tel34-Ter90 εμφάνισε ενδιάμεσες τιμές από τις Tel34 και Ter90, ενώ η μεταχείριση του μίγματος Tel34-Hir139 δεν είχε στατιστικά σημαντική διαφορά από τις μεταχειρίσεις των αντίστοιχα μεμονωμένων στελεχών. Η μεταχείριση του μίγματος Hil4-Tel52 είχε στατιστικά σημαντικά υψηλότερο βάρος σε σχέση με τις μεταχειρίσεις των μεμονωμένων στελεχών που το απαρτίζουν.



Εικόνα 4.49 Η επίδραση μεμονωμένων και μιγμάτων βακτηριακών στελεχών σε φυτά *Solanum lycopersicum* ποικ. Chondrokatsari Messinias υπό συνθήκες θερμοκηπίου μετά από 44 ημέρες ανάπτυξης. Σπόροι τομάτας μετά τη βιοδιέγερση με μεμονωμένα στελέχη ή μίγμα στελεχών (1:1) φυτεύτηκαν σε υπόστρωμα τύρφης-περλίτη, ενώ στις 15 και 30 ημέρες μετά τη φύτευση πραγματοποιήθηκε εμβολιασμός με βακτηριακές καλλιέργειες μεμονωμένων στελεχών ή μίγματα καλλιέργειών (1:1). (Α) Αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες φυτών σε γλάστρες από τις διάφορες βακτηριακές μεταχειρίσεις, (Β) Αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες φυτών από τις διάφορες βακτηριακές μεταχειρίσεις μετά την απομάκρυνση από τη γλάστρα και τον καθαρισμό τους, (Γ) Νωπό βάρος υπόγειου τμήματος (g), (Δ) Ξηρό βάρος υπόγειου τμήματος (mg), (Ε) Μήκος βλαστού (cm), (Ζ) Νωπό βάρος υπέργειου εμήματος (g), (Η) Ξηρό βάρος υπέργειου τμήματος (mg). Μεταχειρίσεις με το ίδιο γράμμα δεν έχουν στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0.05$) σύμφωνα με την post hoc ανάλυση Tukey's HSD που ακολούθησε την One-way ANOVA για τους μέσους όρους. Οι ράβδοι αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο του συνόλου των φυτών που αναλύθηκαν για κάθε μεταχείριση ($n=30$), ο οποίος αναγράφεται μέσα σε κάθε ράβδο, ενώ οι κάθετες μπάρες υποδεικνύουν την τυπική απόκλιση του μέσου όρου.

Συνοψίζοντας, οι μεταχειρίσεις των στελεχών Hil4, Hir139, Tel34 και Tel52 εμφάνισαν χαμηλότερες ή παρόμοιες τιμές με το μάρτυρα σε όλες τις φυτικές παραμέτρους ανάπτυξης που εξετάστηκαν, με τις μεταχειρίσεις Hil4 και Tel34 να έχουν τις χαμηλότερες τιμές στις περισσότερες μετρήσεις. Το μεμονωμένο στέλεχος Ter90 εμφάνισε υψηλότερες τιμές από το μάρτυρα με στατιστικά σημαντική διαφορά σε όλες τις παραμέτρους εκτός από το ξηρό βάρος ρίζας, όπου ήταν παρόμοιο με το μάρτυρα και το νωπό βάρος ρίζας, όπου αν και υψηλότερη, δεν είχε στατιστικά σημαντική διαφορά. Όσον αφορά τα μίγματα, η μεταχείριση του μίγματος Hil4-Tel52 εμφάνισε τις υψηλότερες

τιμές από όλα τα μίγματα συγκριτικά με το μάρτυρα, αν και είχε μόνο αυξημένο ύψος και ξηρό βάρος υπέργειου με στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με το μάρτυρα.

Η μεταχείριση του μίγματος Hil4-Tel52 ήταν παρόμοια ή καλύτερη από τις μεταχειρίσεις των μεμονωμένων στελεχών, ενώ και στο πείραμα αποικισμού η συγκέντρωση και των δύο αυξήθηκε όταν βρέθηκαν σε μίγμα, διατηρώντας αναλογία περίπου 1:1. Η μεταχείριση του μίγματος Tel34-Ter90 είχε παρόμοιες ή υψηλότερες τιμές από τη μεταχείριση Tel34 και μικρότερες από τη μεταχείριση Ter90, ενώ στο πείραμα αποικισμού το Ter90 υπέστη μείωση του πληθυσμού του στο μίγμα. Η μεταχείριση του μίγματος Tel34-Hir139 δεν παρουσίασε στατιστικά σημαντικές διαφορές σε σχέση με τις μεταχειρίσεις των μεμονωμένων στελεχών σχεδόν σε όλες τις παραμέτρους, ενώ το στέλεχος Hir139 είχε μειωμένο πληθυσμό στο μίγμα.

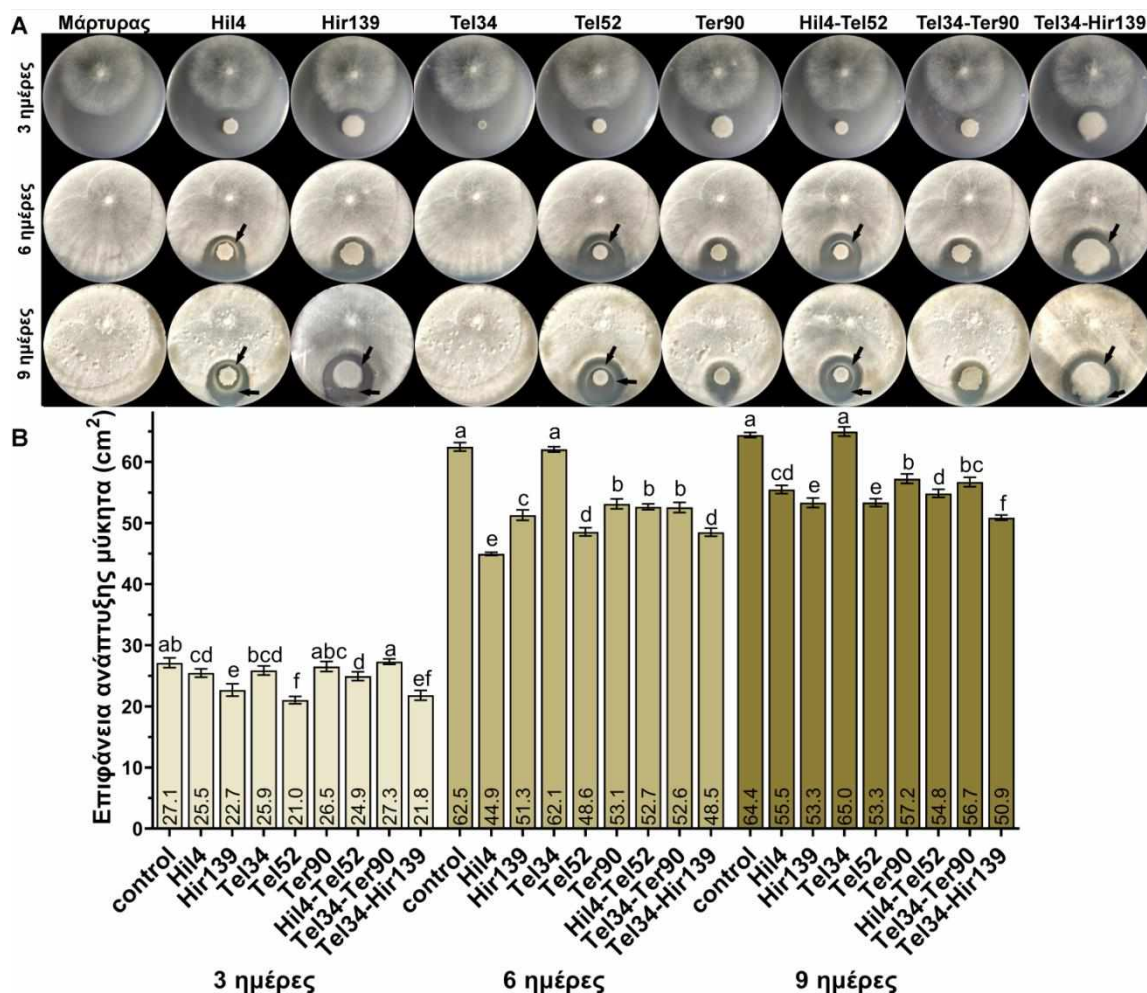
4.8 Δράση μεμονωμένων και μιγμάτων βακτηριακών στελεχών εναντίον του φυτοπαθογόνου μύκητα *Botrytis cinerea* σε αποκομμένους καρπούς (detached fruit)

Αφού μεμονωμένα και μίγματα βακτηρίων εξετάστηκαν ως προς την επίδραση στη φυτική ανάπτυξη, ακολούθησε η διερεύνηση της αποτελεσματικότητας των μιγμάτων εναντίον του φυτοπαθογόνου *B. cinerea* σε συνθήκες *in vitro* αλλά και *ex vivo*, με τη δοκιμή τους σε αποκομμένους καρπούς.

Αρχικά, τα μεμονωμένα στελέχη, καθώς και τα επιλεγμένα μίγματα εξετάστηκαν για την αποτελεσματικότητά τους έναντι του φυτοπαθογόνου με τη μέθοδο της διπλής καλλιέργειας σε θρεπτικό μέσο PDA, το οποίο ευνοεί την ανάπτυξη του μύκητα (**Εικόνα 4.50**). Κατά την εξέταση των φωτογραφιών της διπλής καλλιέργειας παρατηρήθηκε ο σχηματισμός υπόλευκου ιζήματος στη ζώνη παρεμπόδισης στην αλληλεπίδραση με κάποια βακτηριακά στελέχη, το οποίο είναι ξεκάθαρα ορατό σε θρεπτικό μέσο PDA, αλλά όχι σε NA. Όσον αφορά το στέλεχος Hil4, το ιζήμα εντοπίστηκε σε ποσότητα μεγαλύτερη από τα υπόλοιπα. Ακόμη, παρατηρείται στη μεταχείριση Tel52, όπως και στο μίγμα Hil4-Tel52, με αυτές τις δύο μεταχειρίσεις να παρουσιάζουν παρόμοια εικόνα, με μικρότερη ποσότητα ιζήματος από το Hil4. Επίσης, παρατηρήθηκε στο Hil139 αλλά σε μικρότερο βαθμό από τα προαναφερθέντα. Το μίγμα Tel34-Hir139 παρουσίασε την ίδια εικόνα με το Hir139, γεγονός αναμενόμενο αφού το Tel34 δεν εμφανίζει ανασταλτική δράση. Στην αλληλεπίδραση του μύκητα με το στέλεχος Ter90 δεν υπήρχε κάποιος εμφανής σχηματισμός ιζήματος, όπως και στο μίγμα Tel34-Ter90.

Με βάση το εμβαδόν ανάπτυξης του μύκητα κατά τη διάρκεια συγκαλλιέργειας με μεμονωμένα στελέχη ή μίγματα στελεχών ξεχώρισαν για την ικανότητα παρεμπόδισης τα στελέχη Tel52 και Hir139, καθώς και το μίγμα Tel34-Hir139 (**Εικόνα 4.50B**). Το στέλεχος Tel34 δεν επηρέασε το εμβαδόν ανάπτυξης του μύκητα με στατιστικά σημαντική διαφορά από το μάρτυρα. Το μίγμα Hil4-Tel52 φάνηκε να είναι περισσότερο όμοιο με το στέλεχος Hil4 στην ικανότητα παρεμπόδισης, έχοντας μικρότερη αποτελεσματικότητα από το στέλεχος Tel52. Οι τιμές του μίγματος Tel34-Ter90 ήταν

κοντινές με τις τιμές του στελέχους Ter90, δηλαδή καλύτερες από τις τιμές του στελέχους Tel34 αναφορικά με την παρεμπόδιση του μύκητα. Τέλος, το μίγμα Tel34-Hir139 φάνηκε να έχει παρόμοιες τιμές με το στέλεχος Hir139, με τις δύο μεταχειρίσεις να είναι καλύτερες στην παρεμπόδιση από τη μεταχείριση Tel34, ενώ την ένατη ημέρα ήταν η καλύτερη μεταχείριση με στατιστικά σημαντική διαφορά από τα μεμονωμένα στελέχη.



Εικόνα 4.50 *In vitro* παρεμπόδιση της ανάπτυξης του φυτοπαθογόνου *Botrytis cinerea* από επιλεγμένα μεμονωμένα βακτηριακά στελέχη και μίγματά τους κατά τη διάρκεια επώασης 9 ημερών. Ποσότητα 10μl (5 μl καλλιέργειας και 5 μl Nutrient Broth για τα μεμονωμένα και 5 μl από το κάθε βακτήριο για το μίγμα) από καλλιέργειες 24 ωρών εμβολιάστηκαν σε θρεπτικό μέσο PDA. Παράλληλα 10 μl εναιωρήματος σπορίων του μύκητα *Botrytis cinerea* (10⁵ σπόρια/ml) εμβολιάστηκαν σε απόσταση 3 cm. Ακολούθησε η επώαση στους 25 °C για 9 ημέρες στο σκοτάδι και τα τρυβλία παρακολουθούνταν καθημερινά. (A) Αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες της κάθε μεταχείρισης στις 3, 6 και 9 ημέρες επώασης, όπου με βέλη υποδεικνύεται ο σχηματισμός ιζήματος (B) Μετρήσεις επιφάνειας ανάπτυξης του μύκητα για κάθε μεταχείριση στις 3, 6 και 9 ημέρες επώασης. Μεταχειρίσεις με το ίδιο γράμμα στην κάθε ομάδα δεν έχουν στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0.05$) σύμφωνα με την post hoc ανάλυση Tukey's HSD που ακολούθησε την One-way ANOVA. Το πείραμα πραγματοποιήθηκε αναζήτητα 3 φορές. Οι ράβδοι αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο ± τυπική απόκλιση του μέσου όρου.

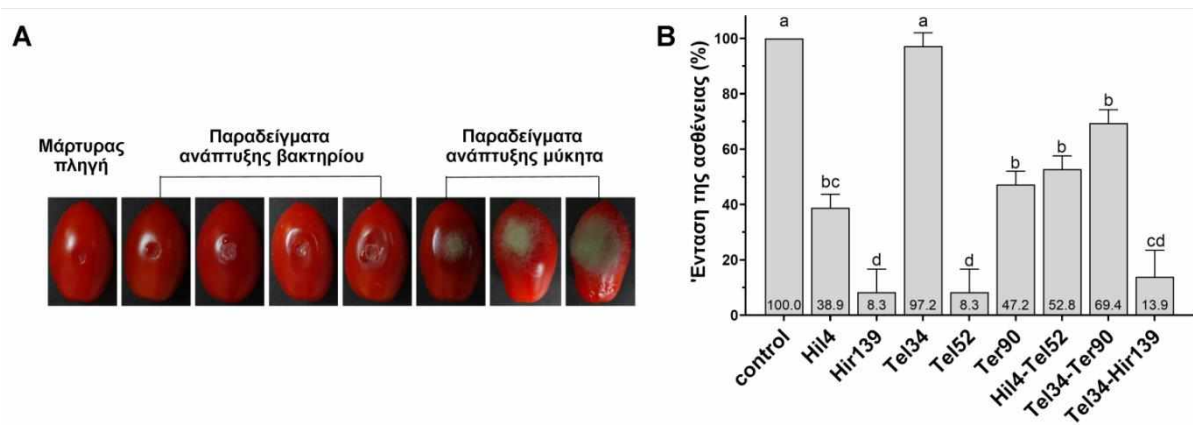
Με σκοπό να μελετηθεί περαιτέρω η δράση των μεμονωμένων βακτηρίων και των μιγμάτων τους ως παράγοντες βιολογικής αντιμετώπισης φυτοπαθογόνων μυκήτων, αυτά μελετήθηκαν εναντίον του μύκητα *B. cinerea* σε μικρόκαρπες τομάτες και επιτραπέζια ποικιλία σταφυλιών. Στην περίπτωση των καρπών τομάτας, ο εμβολιασμός των βακτηριακών μεταχειρίσεων πραγματοποιήθηκε 90 λεπτά πριν τον εμβολιασμό του παθογόνου μύκητα, ενώ στην περίπτωση των σταφυλιών αποτελεσματικότητα

έδειξε ο εμβολιασμός που έγινε 36 ώρες πριν τον εμβολιασμό του παθογόνου. Η δράση των βακτηριακών μεταχειρίσεων αξιολογήθηκε με βάση τη σοβαρότητα της ασθένειας χρησιμοποιώντας τις κατάλληλες κλίμακες διαβάθμισης για το ποσοστό της ασθενούς επιφάνειας του καρπού, την ένταση της ασθένειας, η οποία υπολογίστηκε ως το ποσοστό των μολυσμένων καρπών στην κάθε επανάληψη και τέλος τη μέτρηση της επιφάνειας εξάπλωσης της ασθένειας.

4.8.1 Μικρόκαρπες τομάτες (ποικιλία Lobello)

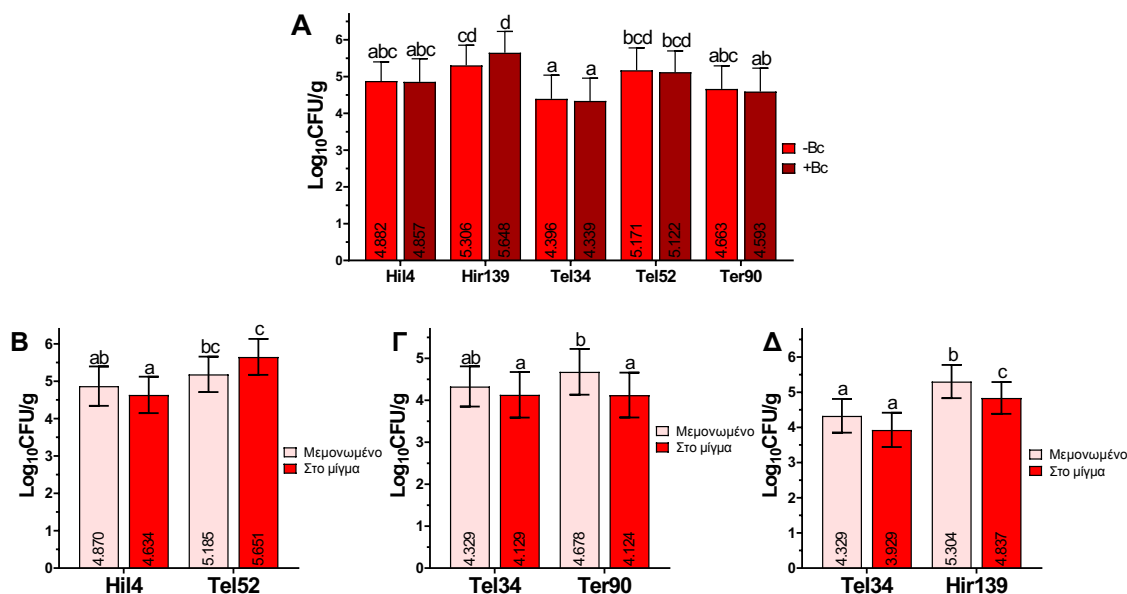
Ο εμβολιασμός των βακτηριακών στελεχών στην πληγή μικρόκαρπης τομάτας σε συγκέντρωση 10^8 CFU/ml, οδήγησε σε έντονη ανάπτυξη των βακτηρίων στην πληγή και το σχηματισμό προστατευτικών βιοϋμενίων στην πληγή του καρπού μετά από 3 ημέρες επώασης στις περισσότερες περιπτώσεις, με αποτέλεσμα την εμφάνιση ήπιων αλλοιώσεων στους ιστούς του καρπού γύρω από την πληγή (**Εικόνα 4.51A**). Εξάιρεση αποτέλεσε το στέλεχος Tel34, το οποίο δεν αποίκισε σε ορατό βαθμό την πληγή και δεν προκάλεσε τέτοιο φαινότυπο. Όπως έχει σημειωθεί σε προηγούμενα κεφάλαια (**Κεφ. 4.2.5, 4.3.2**) τα υπόλοιπα βακτηριακά στελέχη (Hil4, Hir139, Tel52, Ter90) είναι περισσότερο ανταγωνιστικά στις δοκιμές βιολογικής αντιμετώπισης φυτοπαθογόνων μυκήτων *in vitro*, εκκρίνοντας ουσίες στο μέσο, μεταξύ των οποίων είναι και οι επιφανειοδραστικές ενώσεις.

Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 4.51B** η ένταση της ασθένειας μεταξύ του μάρτυρα και του στελέχους Tel34 ήταν περίπου στο ίδιο επίπεδο, χωρίς στατιστικά σημαντική διαφορά. Τα υπόλοιπα στελέχη είχαν τιμές αρκετά χαμηλότερες και θεωρείται ότι έχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές από το μάρτυρα, οπότε ανταγωνίζονται επιτυχώς το παθογόνο. Οι μεταχειρίσεις με το χαμηλότερο ποσοστό εμφάνισης της ασθένειας και εντυπωσιακή διαφορά σε σχέση με το μάρτυρα (100%) ήταν οι Tel52 (8.3%) και Hir139 (8.3%), όπως και η Tel34-Hir139 (13.9%). Εμβολιασμός του μίγματος Hil4-Tel52 οδήγησε σε μεγαλύτερο ποσοστό έντασης της ασθένειας από τον εμβολιασμό των μεμονωμένων στελεχών Hil4 ή Tel52, ωστόσο δεν είχε στατιστικά σημαντικές διαφορές με το Hil4, γεγονός που υποδεικνύει ότι η προσθήκη του Hil4 είναι εκείνη που μειώνει την αποτελεσματικότητα του μίγματος. Εμβολιασμός του μίγματος Tel34-Ter90 οδήγησε σε ένταση της ασθένειας σημαντικά μικρότερη από το Tel34 και λίγο μεγαλύτερη από το Ter90 χωρίς στατιστικά σημαντική διαφορά, υποδεικνύοντας ότι το Ter90 είναι ικανό να μειώσει την εμφάνιση της ασθένειας ακόμα και σε μίγμα με ένα λιγότερο αποτελεσματικό βακτήριο. Το μίγμα Tel34-Hir139 μείωσε κατά μεγάλο ποσοστό την ένταση της ασθένειας, με στατιστικά σημαντική διαφορά από το στέλεχος Tel34, υποδεικνύοντας πως το Hir139 καταφέρνει να μειώσει την ασθένεια κοντά στα επίπεδα του μεμονωμένου στελέχους.



Εικόνα 4.51 Η δράση βακτηριακών καλλιεργειών εναντίον της ταφράς σήψης σε μικρόκαρπες τομάτες (βελανίδι, ποικ. Lobello). Πληγή που προκλήθηκε στους καρπούς εμβολιάστηκε με 10μL καλλιέργειας βακτηριακών στελεχών (10^8 CFU/ml) ή μίγματος καλλιεργειών (1:1), ακολούθησε επώαση για 1,5 ώρα στους 25°C και εμβολιασμός με 10 μL του φυτοπαθογόνου *Botrytis cinerea* (10^5 σπόρια/ml). Η ασθένεια αξιολογήθηκε 3 ημέρες μετά τον εμβολιασμό του παθογόνου. (A) Αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες καρπών, (B) Ένταση της ασθένειας (%) που υπολογίστηκε ως το ποσοστό μολυσμένων καρπών. Μεταχειρίσεις με το ίδιο γράμμα δεν έχουν στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0.05$) σύμφωνα με την post hoc ανάλυση Tukey's HSD που ακολούθησε την One-way ANOVA. Οι ράβδοι αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο 3 ανεξάρτητων επαναλήψεων με 12 καρπούς, ο οποίος αναγράφεται μέσα σε κάθε ράβδο, ενώ οι κάθετες μπάρες υποδεικνύουν την τυπική απόκλιση του μέσου όρου.

Λαμβάνοντας υπ' όψιν την υπέρμετρη βακτηριακή ανάπτυξη και την εξαιρετική ικανότητα παρεμπόδισης της ασθένειας λόγω αυτής, πραγματοποιήθηκε εμβολιασμός των βακτηρίων και σε μικρότερη συγκέντρωση (10^6 CFU/ml) ώστε να ελεγχθεί η ικανότητα αντιμετώπισης κατά τη φυσιολογική ανάπτυξη του βακτηρίου. Αρχικά, μελετήθηκε η ικανότητα αποικισμού της πληγής από τα μεμονωμένα στελέχη ώστε να επιβεβαιωθεί η ικανότητα αποικισμού τους (Εικόνα 4.52A). Η ικανότητα αποικισμού δε φάνηκε να επηρεάζεται από την παρουσία του φυτοπαθογόνου μύκητα, ενώ πιο αποτελεσματικά στον αποικισμό φάνηκε να είναι τα στελέχη Hir139 και Tel52. Στη συνέχεια, εξετάστηκε η ικανότητα αποικισμού των στελεχών που βρίσκονται σε μίγμα σε σύγκριση με τα μεμονωμένα στελέχη. Στο μίγμα Hil4-Tel52 (Εικόνα 4.52B) παρατηρήθηκε πως ως μεμονωμένα εμβόλια, τα δύο στελέχη εμφανίζουν σχετικά παρόμοια ικανότητα αποικισμού της πληγής με αναλογία CFU/g 1:2 (Hil4:Tel52), αλλά το στέλεχος Tel52 είχε στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερες τιμές συγκέντρωσης κυττάρων από το στέλεχος Hil4 όταν εμβολιάστηκαν ως μίγμα, με αναλογία CFU/g 1:8 (Hil4:Tel52), ενώ αυξήθηκε και σε σχέση με το μεμονωμένο εμβολιασμό. Όσον αφορά το μίγμα Tel34-Ter90 (Εικόνα 4.52Γ), παρατηρήθηκε πως η συγκέντρωση των κυττάρων του Ter90 μειώθηκε στατιστικά σημαντικά όταν αυτό εμβολιάστηκε ως μίγμα με το Tel34 σε σχέση με το μεμονωμένο εμβολιασμό του (περίπου 5 φορές μείωση) και ενώ έδειξε καλύτερο αποικισμό από το Tel34 στους μεμονωμένους εμβολιασμούς (περίπου 3.5 φορές), στο μίγμα έφτασε στα ίδια επίπεδα με το Tel34. Τέλος, στο μίγμα Tel34-Hir139 το στέλεχος Hir139 εμφάνισε στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερες τιμές συγκέντρωσης κυττάρων από το Tel34, και κατά τη σύγκριση των μεμονωμένων εμβολίων (περίπου 10 φορές) και κατά τη σύγκριση τους στο μίγμα (περίπου 8.5 φορές), ενώ φαίνεται να μειώθηκε στατιστικά σημαντικά ο πληθυσμός του στο μίγμα.



Εικόνα 4.52 Αποικισμός βακτηριακών στελεχών σε μικρόκαρπες τομάτες (βελανίδι, ποικ. Lobello). (Α) Αποικισμός (\log_{10} CFU) μεμονωμένων στελεχών παρουσία ή απουσία του φυτοπαθογόνου μύκητα *Botrytis cinerea*. Πληγή που προκλήθηκε στους καρπούς εμβολιάστηκε με 10 μ L βακτηριακής καλλιέργειας (10^6 CFU/ml) ή μίγματος καλλιεργειών (1:1) στελεχών ανθεκτικών σε διαφορετικά αντιβιοτικά, ακολούθησε επώαση για 1,5 ώρα στους 25°C και εμβολιασμός με 10 μ L του φυτοπαθογόνου *Botrytis cinerea* (10^5 σπόρια/ml) (+Bc) ή νερού (-Bc). Αποικισμός (\log_{10} CFU) στελεχών όταν εμβολιάζονται μεμονωμένα ή σε μίγμα για τα μίγματα Hi14-Tel52 (B), Tel34-Ter90 (Γ) και Tel34-Hir139 (Δ). Πληγή που προκλήθηκε στους καρπούς εμβολιάστηκε με 10 μ L βακτηριακής καλλιέργειας (10^6 CFU/ml) ή μίγματος καλλιεργειών (1:1) στελεχών ανθεκτικών σε διαφορετικά αντιβιοτικά και ακολούθησε επώαση για 3 ημέρες στους 25°C. Κομμάτι ιστού γύρω από την πληγή αφαιρέθηκε, ζυγίστηκε, ομογενοποιήθηκε σε NB και αραιώσεις επιστρώθηκαν σε τρυβλία που περιείχαν τα κατάλληλα αντιβιοτικά ώστε να προσδιοριστούν τα CFU. Μεταχειρίσεις με το ίδιο γράμμα δεν έχουν στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0.05$) σύμφωνα με την *post hoc* ανάλυση Tukey's HSD που ακολούθησε την One-way ANOVA για τους μέσους όρους. Οι ράβδοι αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο 3 ανεξάρτητων επαναλήψεων με 5 καρπούς το καθένα ($n=15$), ο οποίος αναγράφεται μέσα σε κάθε ράβδο, ενώ οι κάθετες μπάρες υποδεικνύουν την τυπική απόκλιση του μέσου όρου.

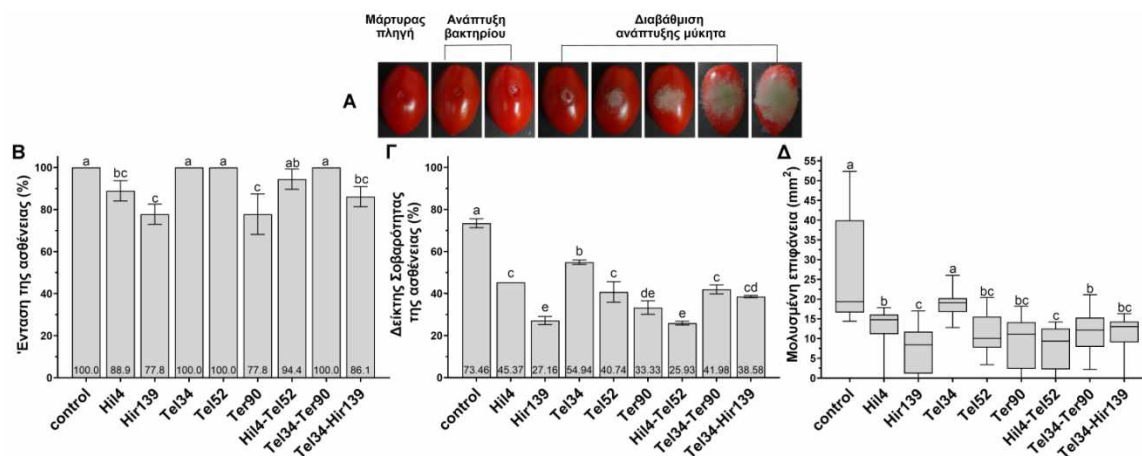
Αφού επιβεβαιώθηκε η ικανότητα αποικισμού των στελεχών όταν η συγκέντρωση ζωντανών κυττάρων του βακτηριακού εμβολίου είναι 10^6 CFU/ml, εξετάστηκε η ικανότητα περιορισμού της τεφράς σήψης (Εικόνα 4.53). Όπως φαίνεται στην Εικόνα 4.53A τα βακτηριακά στελέχη δεν είχαν υπέρμετρη ανάπτυξη. Σύμφωνα με την εικόνα Εικόνα 4.53B οι μεταχειρίσεις με τη μεγαλύτερη ένταση της ασθένειας (disease incidence) και συγκεκριμένα με τιμή 100% ήταν οι μάρτυρας, Tel34, Tel52, Tel34-Ter90, ενώ ακολουθούν οι Hi14-Tel52 και Tel34-Hir139 ($\geq 86\%$). Οι καλύτερες μεταχειρίσεις ήταν οι Ter90 και Hir139 με 77,7% ένταση της ασθένειας, το οποίο είναι αρκετά μεγάλο ποσοστό. Ο δείκτης σοβαρότητας της ασθένειας υπολογίστηκε με βάση το ποσοστό κάλυψης του καρπού από τις υφές του μύκητα (Εικόνα 4.53A, Γ) μετά από 3 ημέρες επώασης χρησιμοποιώντας την κλίμακα διαβάθμισης όπου 0 υποδεικνύει 0% κάλυψη, 1 υποδεικνύει 0⁺-10% κάλυψη, 2 υποδεικνύει 10⁺-25% κάλυψη, 3 υποδεικνύει 25⁺-50% κάλυψη, 4 υποδεικνύει 50⁺-75% κάλυψη και 5 υποδεικνύει 75⁺-100% κάλυψη (Vieira et al., 2010). Όλες οι μεταχειρίσεις μείωσαν στατιστικά σημαντικά το δείκτη σοβαρότητας της ασθένειας. Μετά το μάρτυρα, που έδειξε το μεγαλύτερο ποσοστό σοβαρότητας της ασθένειας (73.46%), κατατάσσεται η μεταχείριση Tel34 (54.94%) που φάνηκε να έχει στατιστικά σημαντική διαφορά με το μάρτυρα. Οι καλύτερες μεταχειρίσεις ήταν οι Hi14-Tel52 (25.93%), Hir139 (27.16%) και Ter90 (33.33%) που δεν είχαν στατιστικά σημαντική

διαφορά μεταξύ τους. Το μίγμα Hil4-Tel52 έδειξε καλύτερα αποτελέσματα από τα μεμονωμένα βακτήρια Hil4 και Tel52, με στατιστικά σημαντική διαφορά. Τα μίγματα Tel34-Ter90 και Tel34-Hir139 παρουσίασαν ενδιάμεση αποτελεσματικότητα σε σχέση με τα μεμονωμένα βακτήρια και στατιστικά σημαντική διαφορά με αυτά, υποδεικνύοντας πως τα ισχυρά στελέχη Ter90 και Hir139 δεν κατάφεραν να μειώσουν τη σοβαρότητα όταν βρέθηκαν σε μίγμα με ένα πιο αδύναμο βακτήριο.

Κατά τη μέτρηση του εμβαδού μολυσμένης επιφάνειας (**Εικόνα 4.53Α**) φαίνεται πως ο μάρτυρας και η μεταχείριση Tel34 κατείχαν τις υψηλότερες τιμές χωρίς στατιστικά σημαντική διαφορά. Οι μεταχειρίσεις με την καλύτερη αντιμετώπιση εξάπλωσης του παθογόνου ήταν οι Hir139 και Hil4-Tel52, ωστόσο δεν έχουν στατιστικά σημαντική διαφορά με τις Tel52, Ter90 και Tel34-Hir139.

Συνοψίζοντας, παρατηρείται πως οι μεταχειρίσεις Hir139 και Ter90 είχαν τα μικρότερα ποσοστά έντασης της ασθένειας σε σύγκριση με τις υπόλοιπες, αν και όχι με ικανοποιητική διαφορά, και τα μικρότερα ποσοστά σοβαρότητας της ασθένειας με σημαντική μείωση της. Το μίγμα Hil4-Tel52 δε μείωσε την εμφάνιση των ασθενών καρπών αλλά περιορίσε πολύ σημαντικά τη σοβαρότητα της ασθένειας, ενώ ήταν το καλύτερο από τα τρία μίγματα που δοκιμάστηκαν.

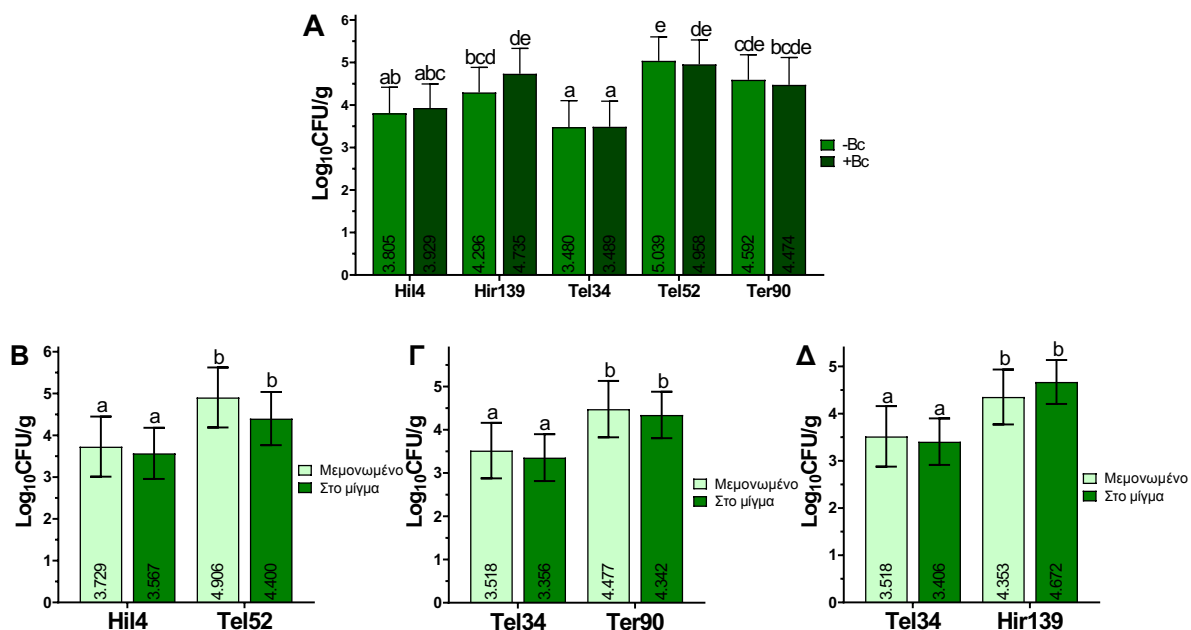
Αν συγκριθούν οι αποδόσεις των μεταχειρίσεων στις εφαρμογές των δύο συγκεντρώσεων βακτηριακών κυττάρων, παρατηρείται πως το στέλεχος Hir139 ήταν το πιο αποτελεσματικό σε σύγκριση με τα υπόλοιπα, όσον αφορά την ένταση της ασθένειας, ενώ το Tel34-Hir139 ήταν το αμέσως επόμενο που δεν είχε στατιστικά σημαντική διαφορά. Το στέλεχος Tel52 είχε ίδια συμπεριφορά με το Hir139 στη μεγαλύτερη συγκέντρωση (10^8 CFU/ml) ενώ δεν έχει διαφορά από το μάρτυρα στη μικρότερη συγκέντρωση (10^6 CFU/ml).



Εικόνα 4.53 Η δράση βακτηριακών καλλιεργειών εναντίον της τερφάς σήψης σε μικρόκαρπες τομάτες (βελανίδι, ποικ. Lobello). Πληγή που προκλήθηκε στους καρπούς εμβολιάστηκε με 10μL καλλιέργειας βακτηριακών στελεχών (10^6 CFU/ml) ή μίγματος καλλιεργειών (1:1), ακολούθησε επώαση για 1,5 ώρα στους 25°C και εμβολιασμός με 10 μL του φυτοπαθογόνου *B. cinerea* (10^5 σπόρια/ml). Η ασθένεια αξιολογήθηκε 3 ημέρες μετά τον εμβολιασμό του παθογόνου. (Α) Αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες καρπών, (Β) Δείκτης Σοβαρότητας της ασθένειας (%) που υπολογίστηκε με τη χρήση κλίμακας διαβάθμισης (0-5), (Γ) Ένταση της ασθένειας (%) που υπολογίστηκε ως το ποσοστό μολυσμένων καρπών, (Δ) Εμβαδόν μολυσμένης επιφάνειας που υπολογίστηκε ως το εμβαδόν εξάπλωσης του μυκηλίου (mm^2) σε box-whisker διάγραμμα. Μεταχειρίσεις με το ίδιο γράμμα δεν έχουν στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0.05$) σύμφωνα με την post hoc ανάλυση Tukey's HSD που ακολούθησε την One-way ANOVA για τους μέσους όρους των (Α) και (Β) ή σύμφωνα με τις πολλαπλές συγκρίσεις κατά ζεύγη Mann Whitney που πραγματοποιήθηκαν μετά τη μη παραμετρική ανάλυση Kruskal-Wallis για τους διάμεσους του (Γ). Για την Ένταση και το Δείκτη Σοβαρότητας της ασθένειας οι ράβδοι αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο 3 ανεξάρτητων επαναλήψεων με 12 καρπούς ($n=3$), ο οποίος αναγράφεται μέσα σε κάθε ράβδο, ενώ οι κάθετες μπάρες υποδεικνύουν την τυπική απόκλιση του μέσου όρου. Οι τιμές για το Εμβαδόν της ασθένειας αντιπροσωπεύουν το σύνολο των καρπών από τις 3 ανεξάρτητες επαναλήψεις ($n=36$).

4.8.2 Επιτραπέζια σταφύλια

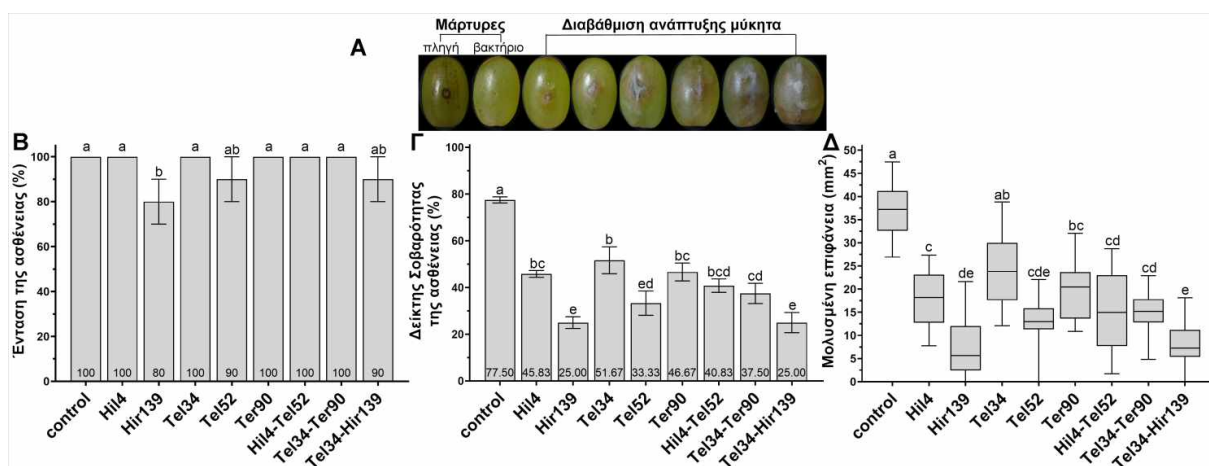
Τα στελέχη δοκιμάστηκαν και σε σταφύλια με εφαρμογή ως μεμονωμένα στελέχη ή μίγμα στελεχών. Αρχικά, μελετήθηκε η ικανότητα αποικισμού της πληγής από τα μεμονωμένα στελέχη ώστε να επιβεβαιωθεί η ικανότητα αποικισμού τους. Η ικανότητα αποικισμού δε φάνηκε να μεταβάλλεται με στατιστικά σημαντικό τρόπο παρουσία του φυτοπαθογόνου μύκητα, ενώ πιο αποτελεσματικά στον αποικισμό φάνηκε να είναι τα στελέχη Hir139, Tel52 και Ter90 (**Εικόνα 4.54Α**). Κατά τη σύγκριση της ικανότητας αποικισμού των στελεχών Hil4 και Tel52 ως μεμονωμένα εμβόλια και ως μίγμα, παρατηρείται πως το στέλεχος Tel52 έχει στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερες τιμές CFU/g από το Hil4 και στις 2 μεταχειρίσεις, περίπου 10 και 5 φορές αντίστοιχα, ενώ μειώνεται σε σχέση με το μεμονωμένο εμβολιασμό (**Εικόνα 4.54Β**). Όσον αφορά το μίγμα Tel34-Ter90, το στέλεχος Ter90 παρουσίασε μεγαλύτερη ικανότητα αποικισμού από το Tel34 και κατά τη σύγκριση του εμβολιασμού ως μεμονωμένα στελέχη, με μεγαλύτερες τιμές CFU/g κατά 7 φορές, αλλά και κατά τη σύγκριση τους μέσα στο μίγμα, με μεγαλύτερες τιμές CFU/g κατά 8 φορές, χωρίς να επηρεάζονται οι πληθυσμοί τους στο μίγμα σε σύγκριση με το μεμονωμένο εμβολιασμό (**Εικόνα 4.54Γ**). Το ίδιο φαινόμενο παρατηρήθηκε και στο μίγμα Tel34-Hir139, με το Hir139 να εμφανίζει περίπου 4 φορές μεγαλύτερες τιμές CFU/g από το Tel34 όταν εμβολιάστηκαν μεμονωμένα και περίπου 20 φορές όταν εμβολιάστηκαν ως μίγμα, χωρίς να επηρεάζονται οι πληθυσμοί τους στο μίγμα σε σύγκριση με το μεμονωμένο εμβολιασμό (**Εικόνα 4.54Δ**).



Εικόνα 4.54 Αποικισμός βακτηριακών στελεχών σε επιτραπέζια σταφύλια (A) Αποικισμός (\log_{10} CFU) μεμονωμένων στελεχών παρουσία ή απουσία του φυτοπαθογόνου μύκητα *Botrytis cinerea*. Πληγή που προκλήθηκε στους καρπούς εμβολιάστηκε με 10 μ L βακτηριακής καλλιέργειας (10^6 CFU/ml) ή μίγματος καλλιεργιών (1:1) στελεχών ανθεκτικών σε διαφορετικά αντιβιοτικά, ακολούθησε επώαση για 1,5 ώρα στους 25°C και εμβολιασμός με 10 μ L του φυτοπαθογόνου *Botrytis cinerea* (105 σπόρια/ml) (+Bc) ή νερού (-Bc). Αποικισμός (\log_{10} CFU) στελεχών όταν εμβολιάζονται μεμονωμένα ή σε μίγμα για τα μίγματα Hil4-Tel52 (B), Tel34-Ter90 (Γ) και Tel34-Hir139 (Δ). Πληγή που προκλήθηκε στους καρπούς εμβολιάστηκε με 10 μ L βακτηριακής καλλιέργειας (10^6 CFU/ml) ή μίγματος καλλιεργιών (1:1) στελεχών ανθεκτικών σε διαφορετικά αντιβιοτικά και ακολούθησε επώαση για 3 ημέρες στους 25°C. Κομμάτι ιστού γύρω από την πληγή αφαιρέθηκε, ζυγίστηκε, ομογενοποιήθηκε σε NB και αραιώσεις επιστρώθηκαν σε τρυβλία που περιείχαν τα κατάλληλα αντιβιοτικά ώστε να προσδιοριστούν τα CFU. Μεταχειρίσεις με το ίδιο γράμμα δεν έχουν στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0.05$) σύμφωνα με την post hoc ανάλυση Tukey's HSD που ακολούθησε την One-way ANOVA για τους μέσους όρους. Οι ράβδοι αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο 3 ανεξάρτητων επαναλήψεων με 5 καρπούς το καθένα ($n=15$), ο οποίος αναγράφεται μέσα σε κάθε ράβδο, ενώ οι κάθετες μπάρες υποδεικνύουν την τυπική απόκλιση του μέσου όρου.

Αφού επιβεβαιώθηκε η ικανότητα αποικισμού των στελεχών στην πληγή σταφυλιού είτε ως μεμονωμένα στελέχη, είτε ως μίγματα, εξετάστηκε η ικανότητα περιορισμού της τεφράς σήψης (Εικόνα 4.55). Από την Εικόνα 4.55A φαίνεται πως τα βακτήρια ως μοναδικά εμβόλια δεν αναπτύσσονται υπέρμετρα στην πληγή σχηματίζοντας προστατευτικά βιοϋμένια. Όσον αφορά την ένταση της ασθένειας (Εικόνα 4.55B), με το παθογόνο και τις περισσότερες μεταχειρίσεις να έχουν τιμές 100%, το στέλεχος Hir139 ήταν το πιο αποτελεσματικό (80%), ενώ με τις μεταχειρίσεις Tel52 (90%) και Tel34-Hir139 (90%) δεν παρουσιάζει στατιστικά σημαντική διαφορά. Ο δείκτης σοβαρότητας της ασθένειας (Εικόνα 4.55Γ) υπολογίστηκε με βάση το ποσοστό κάλυψης του καρπού από υφές παθογόνου ή/και σήψη με τη βοήθεια μίας κλίμακας που διαθέτει 4 κλάσεις, όπου 0 υποδεικνύει 0% κάλυψη, 1 υποδεικνύει 0⁺-25% κάλυψη, 2 υποδεικνύει 25⁺-50% κάλυψη, 3 υποδεικνύει 50⁺-75% κάλυψη και 4 υποδεικνύει 75⁺-100% κάλυψη και 5 υποδεικνύει 75⁺-100% κάλυψη (Calvo et al., 2020). Όλες οι μεταχειρίσεις προκάλεσαν στατιστικά σημαντική μείωση της σοβαρότητας της ασθένειας. Τη μεγαλύτερη σοβαρότητα της ασθένειας έδειξε η μεταχείριση του μάρτυρα (77.5%), ενώ τη χαμηλότερη, χωρίς στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ τους, οι μεταχειρίσεις Tel52 (33.3%), Hir139 (25%) και Tel34-Hir139 (25%). Το μίγμα Hil4-Tel52 είχε

ενδιάμεση τιμή του δείκτη σοβαρότητας της ασθένειας (40.83%) σε σχέση με τα δύο μεμονωμένα βακτηριακά στελέχη Tel52 (33.33%) και Hir4 (45.83%), χωρίς στατιστικά σημαντικές διαφορές. Το μίγμα Tel34-Ter90 είχε καλύτερη αποτελεσματικότητα (37.50%) από τα δύο μεμονωμένα βακτήρια Tel34 (51.66%) και Ter90 (46.66%), αν και στατιστικά σημαντική διαφορά υπήρχε μόνο με το στέλεχος Tel34. Όσον αφορά το μίγμα Tel34-Hir139 (25%) έδειξε μεγάλη και στατιστικά σημαντική διαφορά από το στέλεχος Tel34 (51.66%), αλλά όχι από το Hir139 (25%), γεγονός που υποδεικνύει πως το στέλεχος Hir139 είναι ικανό να μειώσει τη σοβαρότητα της ασθένειας και σε μίγμα με ένα πιο αδύναμο βακτήριο. Την περισσότερο μειωμένη εξάπλωση του μυκηλίου και της σήψης παρουσίασαν οι μεταχειρίσεις Tel34-Hir139, Hir139 και Tel52, συμφωνώντας με τα δεδομένα του δείκτη σοβαρότητας της ασθένειας (Εικόνα 4.55Α).



Εικόνα 4.55 Η δράση βακτηριακών καλλιεργειών εναντίον της τεφράς σήψης σε σταφύλια. Πληγή που προκλήθηκε στους καρπούς εμβολιάστηκε με 10μL καλλιεργείας βακτηριακών στελεχών (10^8 CFU/ml) ή μίγματος καλλιεργειών (1:1), ακολούθησε επώαση για 2 ώρες στους 25°C και εμβολιασμός με 10 μL του φυτοπαθογόνου *B. cinerea* (10^5 σπόρια/ml). Η ασθένεια αξιολογήθηκε 2 ή/και 3 ημέρες μετά τον εμβολιασμό του παθογόνου. (Α) Αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες καρπών, (Β) Δείκτης Σοβαρότητας της ασθένειας (%) που υπολογίστηκε με τη χρήση κλίμακας διαβάθμισης (0-4), (Γ) Ένταση της ασθένειας (%) που υπολογίστηκε ως το ποσοστό μολυσμένων καρπών, (Δ) Εμβασδόν μολυσμένης επιφάνειας που υπολογίστηκε ως το εμβασδόν εξάπλωσης του μυκηλίου (mm^2) σε box-whisker διάγραμμα. Μεταχειρίσεις με το ίδιο γράμμα δεν έχουν στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0.05$) σύμφωνα με την post hoc ανάλυση Tukey's HSD που ακολούθησε την One-way ANOVA για τους μέσους όρους των (Α) και (Β) ή σύμφωνα με τις πολλαπλές συγκρίσεις κατά ζεύγη που πραγματοποιήθηκαν μετά τη μη παραμετρική ανάλυση Kruskal-Wallis για τους διάμεσους του (Γ). Οι τιμές για Ένταση και Σοβαρότητα της ασθένειας αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο 3 ανεξάρτητων επαναλήψεων με 10 καρπούς. Οι τιμές για το Εμβασδόν της ασθένειας αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο του συνόλου των καρπών από τις 3 ανεξάρτητες επαναλήψεις ($n=30$). Οι κάθετες μπάρες υποδεικνύουν την τυπική απόκλιση του μέσου όρου για τα (Α) και (Β).

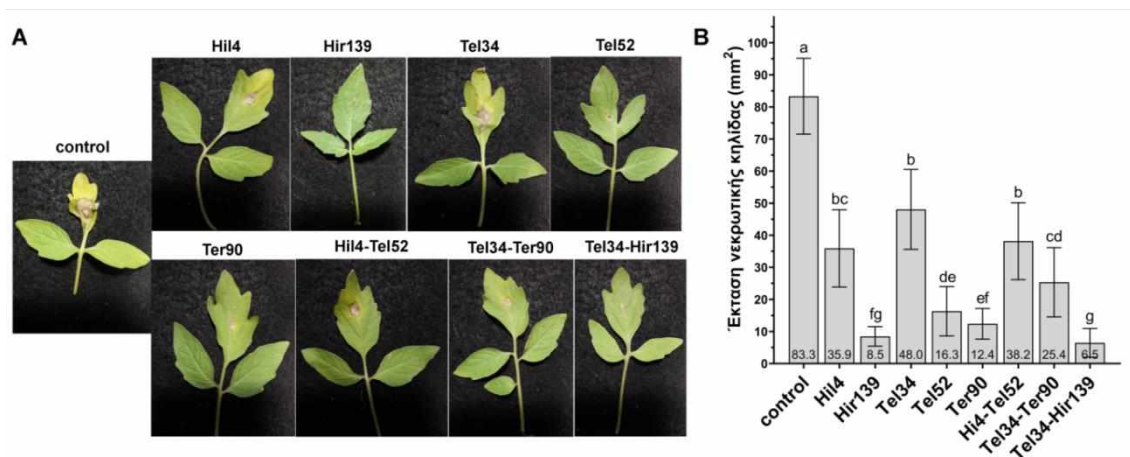
Συμπερασματικά, λαμβάνοντας υπόψιν το σύνολο των πειραμάτων και στους δύο καρπούς, διαφαίνεται πως τα βακτήρια παρουσιάζουν γρηγορότερη ανάπτυξη στους καρπούς της τομάτας σε σχέση με καρπούς αμπέλου, όπου η αυξημένη συγκέντρωση παρουσιάζει υπέρμετρη βακτηριακή ανάπτυξη και πρόκληση ήπιων αλλοιώσεων στον καρπό της τομάτας. Επίσης, σταθερά καλύτερο φαινότυπο σε όλες τις δοκιμές όσον αφορά τη συχνότητα εμφάνισης της ασθένειας αλλά και το δείκτη σοβαρότητας της ασθένειας παρουσίασε το στέλεχος Hir139, ενώ τα υπόλοιπα ισάξια στελέχη ή μίγματα διαφοροποιούνταν ανάλογα με τον καρπό και το χαρακτηριστικό που μελετάται.

4.9 Διερεύνηση ικανότητας των μεμονωμένων και μιγμάτων βακτηριακών στελεχών για επαγωγή διασυστηματικής αντοχής σε φυτά τομάτας υπό συνθήκες θερμοκηπίου

4.9.1 Δοκιμή βιολογικής αντιμετώπισης του φυτοπαθογόνου μύκητα *Botrytis cinerea*

Η δοκιμή βιολογικής αντιμετώπισης μέσω επαγωγής της διασυστηματικής αντοχής του φυτού υπό συνθήκες θερμοκηπίου πραγματοποιήθηκε με τον ίδιο πειραματικό σχεδιασμό της δοκιμής προώθησης της φυτικής ανάπτυξης, με τη διαφορά ενός επιπλέον ριζοποτίσματος βακτηριακών καλλιεργειών στις 36 ημέρες, ενώ στις 37 ημέρες εμβολιάστηκε ο φυτοπαθογόνος μύκητας στο δεύτερο πραγματικό φύλλο. Μετά από επιπλέον 5 ημέρες επώασης είναι εμφανής η μεγάλη έκταση της νεκρωτικής κηλίδας στη μεταχείριση του μάρτυρα και η μείωση της έκτασής της από τα βακτηριακά στελέχη (Εικόνα 4.56A). Συγκεκριμένα, όλες οι μεταχειρίσεις μείωσαν την έκταση της κηλίδας από περίπου 40% έως και 75%, εκτός από τη μεταχείριση του στελέχους Tel34, η οποία πέτυχε μείωση περίπου 25% (Εικόνα 4.56B). Τα μεμονωμένα στελέχη τα οποία μείωσαν εξαιρετικά σημαντικά την έκταση της νεκρωτικής κηλίδας σε σύγκριση με το μάρτυρα (83.3 mm) ήταν τα Tel52 (16.3 mm), Ter90 (12.4 mm), Hir139 (8.5 mm), καθώς και το μίγμα Tel34-Hir139 (6.5 mm).

Η μέση έκταση της νεκρωτικής κηλίδας στη μεταχείριση Hil4-Tel52 ομοιάζει στην τιμή της μεταχείρισης Hil4 και είναι κατά πολύ μεγαλύτερη της μεταχείρισης Tel52. Η μεταχείριση Tel34-Ter90 είχε τιμές ενδιάμεσες των μεταχειρίσεων Tel34 και Ter90. Τέλος, η μεταχείριση Tel34-Hir139 εμφάνισε τιμές παρόμοιες με τη μεταχείριση Hir139, με εξαιρετικά μικρότερες τιμές από τη μεταχείριση Tel34.



Εικόνα 4.56 Η επίδραση μεμονωμένων και μιγμάτων βακτηριακών στελεχών στην επαγωγή της άμυνας φυτών *Solanum lycopersicum* var. *Chondrokatsari* Messinias εναντίον του φυτοπαθογόνου μύκητα *Botrytis cinerea* υπό συνθήκες θερμοκηπίου. Σπόροι τομάτας μετά τη βιοδιέγερση με εναιωρήματα κυττάρων μεμονωμένων στελεχών ή μίγμα εναιωρημάτων (1:1) φυτεύτηκαν σε υπόστρωμα τύρφης-περλίτη, ενώ στις 15, 30 και 36 ημέρες μετά τη φύτευση πραγματοποιήθηκε εμβολιασμός με βακτηριακές καλλιεργειές μεμονωμένων στελεχών ή μίγματα καλλιεργειών (1:1). Στις 37 ημέρες εμβολιάστηκε ποσότητα 10 μl εναιωρήματος σπορίων *B. cinerea* (10⁵/ml) στο δεύτερο πραγματικό φύλλο κάθε φυτού και ακολούθησε επώαση για άλλες 5 ημέρες. (A) Αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες φύλλων μολυσμένων με *B. cinerea* κάθε βακτηριακής μεταχείρισης που αποκόπηκαν από το φυτό μετά το πέρας των 5 ημερών επώασης. (B) Έκταση νεκρωτικής κηλίδας (mm²). Μεταχειρίσεις με το ίδιο γράμμα δεν έχουν στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0.05$) σύμφωνα με την post hoc ανάλυση Games-Howell που ακολούθησε την Welch ANOVA για τους μέσους όρους. Οι ράβδοι αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο του συνόλου των φυτών που αναλύθηκαν για κάθε μεταχείριση ($n=12$), ο οποίος αναγράφεται μέσα σε κάθε ράβδο, ενώ οι κάθετες μπάρες υποδεικνύουν την τυπική απόκλιση του μέσου όρου.

4.9.2 Εξέταση επαγωγής γονιδίων άμυνας του φυτού με τη μέθοδο ποσοτικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (RT-qPCR)

Η εφαρμογή των μεμονωμένων βακτηριακών στελεχών, καθώς και των μιγμάτων τους, σε σπόρους και αργότερα ως ριζοπότισμα φάνηκε να προκαλεί μείωση του εμβαδού της νεκρωτικής κηλίδας που προκαλεί ο φυτοπαθογόνος μύκητας *B. cinerea*. Έτσι, εξετάστηκε αν η εφαρμογή των βακτηρίων επηρεάζει τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων άμυνας του φυτού με τη βοήθεια της μεθόδου RT-qPCR. Ο πειραματικός σχεδιασμός ήταν όμοιος με τον προηγούμενο, ενώ πραγματοποιήθηκαν δειγματοληψίες των δεύτερων πραγματικών φύλλων στις 15 ημέρες, δηλαδή πριν το πρώτο ριζοπότισμα, καθώς και στις 16 ημέρες, δηλαδή μία ημέρα μετά το πρώτο ριζοπότισμα. Στα γονίδια φυτικής άμυνας που εξετάστηκαν συμπεριελήφθηκαν εκείνα που κωδικοποιούν για τις πρωτεΐνες PR1, PR2, PR3, PR5, PI-II, TomloxA, TomloxC, ERF1, ACO1 και Prosystemin.

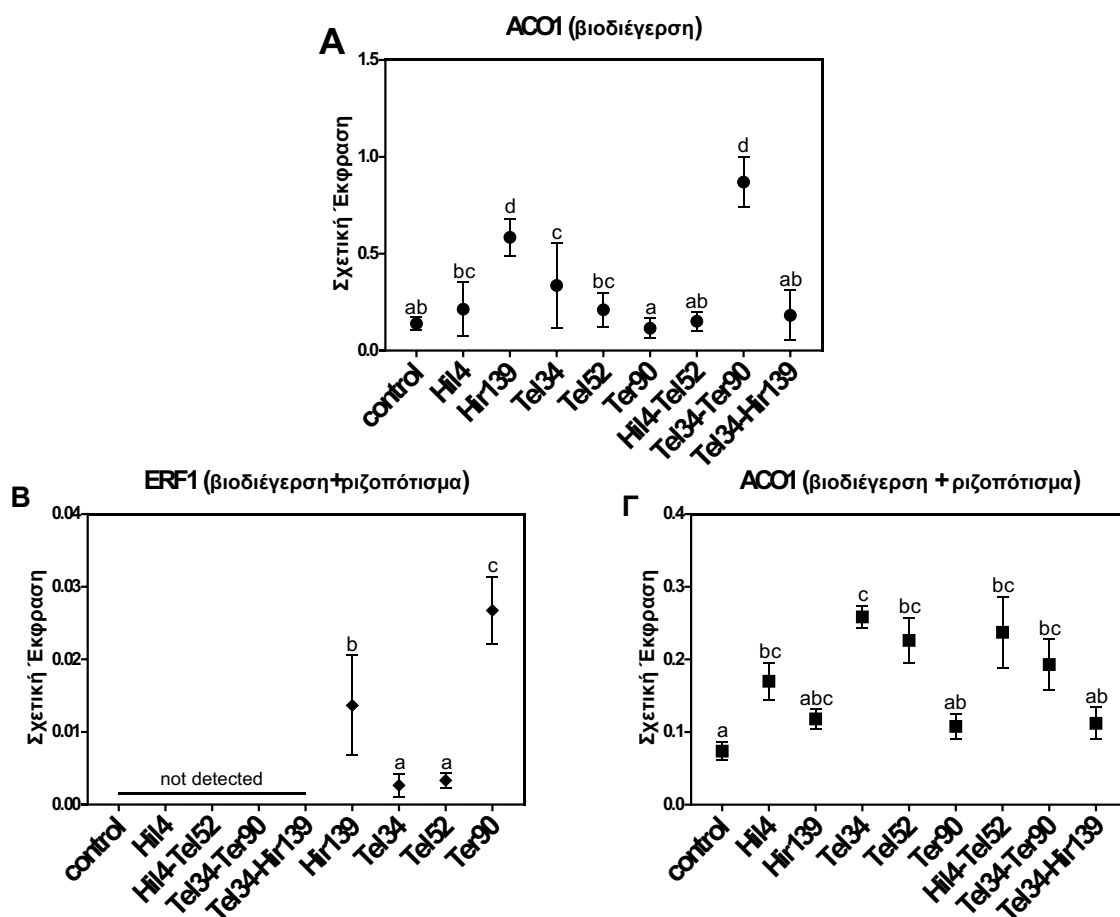
Δεν ανιχνεύθηκε έκφραση σε όλα τα γονίδια, ούτε σε όλες τις μεταχειρίσεις στις συγκεκριμένες χρονικές στιγμές (Πίνακας 4.31). Συγκεκριμένα, τα γονίδια που κωδικοποιούν για τις πρωτεΐνες PR1, PR2, PR3, PR5, PI-II και TomloxC δεν εκφράστηκαν σε καμία μεταχείριση. Έκφραση του γονιδίου *ACO1* ανιχνεύθηκε σε όλες τις μεταχειρίσεις και στις δύο χρονικές στιγμές. Όσον αφορά το γονίδιο *ERF1* ανιχνεύθηκε η έκφρασή του στις μεταχειρίσεις Hir139, Tel34, Tel52 και Ter90 στις 16 ημέρες. Το γονίδιο που κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη Prosystemin ανιχνεύθηκε επίσης σε όλες τις μεταχειρίσεις σε όλες τις χρονικές στιγμές, ωστόσο η χαμηλή αποδοτικότητα της αντίδρασης δεν επέτρεψε την περαιτέρω ανάλυσή του.

Πίνακας 4.31 Αποτελέσματα έκφρασης γονιδίων φυτικής άμυνας μετά από βιοδιέγερση των σπόρων (15 ημέρες) και 24 ώρες μετά το πρώτο ριζοπότισμα (16 ημέρες) με βακτηριακές καλλιέργειες μεμονωμένων στελεχών ή μίγματα καλλιεργειών (1:1). Η απουσία έκφρασης ορίζεται με χρώμα σκούρο γκρι, ενώ η έκφραση ορίζεται με χρώμα πράσινο.

Μεταχείριση	Γονίδιο στόχος-Σχετική έκφραση									
	<i>ACO1</i>	<i>ERF1</i>	<i>TomloxA</i>	<i>PR5</i>	<i>Prosystemin</i>	<i>PR1</i>	<i>PR2</i>	<i>PR3</i>	<i>PI-II</i>	<i>TomloxC</i>
15 ημέρες (βιοδιέγερση)										
Μάρτυρας					*					
Hir14					*					
Hir139					*					
Tel34					*					
Tel52					*					
Ter90					*					
Hir14-Tel52					*					
Tel34-Ter90					*					
Tel34-Hir139					*					
16 ημέρες (βιοδιέγερση και ριζοποτίσματα)										
Μάρτυρας					*					
Hir14					*					
Hir139					*					
Tel34					*					
Tel52					*					
Ter90					*					
Hir14-Tel52					*					
Tel34-Ter90					*					
Tel34-Hir139					*					

Στα γονίδια των οποίων η έκφραση παρατηρήθηκε σε περισσότερες από μία μεταχειρίσεις (*ACO1*, *ERF1*) πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση για να συγκριθούν τα επίπεδα έκφρασης μεταξύ των

μεταχειρίσεων (Εικόνα 4.57). Έκφραση του γονιδίου *ACO1* στις 15 ημέρες μετά τη φύτευση, όπου είχε πραγματοποιηθεί μόνο βιοδιέγερση των σπόρων, παρατηρήθηκε σε όλες τις μεταχειρίσεις, ενώ στατιστικά σημαντική διαφορά από τη μεταχείριση του μάρτυρα παρατηρήθηκε στις μεταχειρίσεις Tel34-Ter90, Hir139, Tel34 (Εικόνα 4.57Α). Το ίδιο γονίδιο στις 16 ημέρες φάνηκε να εκφράζεται σε μεγαλύτερα επίπεδα από το μάρτυρα στις μεταχειρίσεις Hil4, Tel34, Tel52, Hil4-Tel52, Tel34-Ter90 (Εικόνα 4.57Γ). Το γονίδιο *ERF1* στις 16 ημέρες εκφράστηκε στις μεταχειρίσεις Hir139, Tel34, Tel52 και Ter90 με πιο μεγάλη έκφραση να παρατηρείται στη μεταχείριση Ter90.



Εικόνα 4.57 Η επίδραση μεμονωμένων και μιγμάτων βακτηριακών στελεχών στη σχετική έκφραση ($2^{\Delta Ct}$) των γονιδίων *ACO1* και *ERF1* στις 15 ημέρες μετά τη φύτευση (βιοδιέγερση σπόρου) και στις 16 ημέρες μετά τη φύτευση (βιοδιέγερση σπόρου και ριζοπότισμα). Σπόροι τομάτας μετά τη βιοδιέγερση με εναιωρήματα κυττάτων μεμονωμένων στελεχών ή μίγμα εναιωρημάτων (1:1) φυτεύτηκαν σε υπόστρωμα τύρφης-περλίτη, ενώ στις 15, 30 και 36 ημέρες μετά τη φύτευση πραγματοποιήθηκε εμβολιασμός με βακτηριακές καλλιέργειες μεμονωμένων στελεχών ή μίγματα καλλιεργείων (1:1). (Α) Σχετική έκφραση του γονιδίου *ACO1* στις 15 ημέρες μετά τη φύτευση. (Β) Σχετική έκφραση του γονιδίου *ERF1* στις 16 ημέρες μετά τη φύτευση. (Γ) Σχετική έκφραση του γονιδίου *ACO1* στις 16 ημέρες μετά τη φύτευση. Μεταχειρίσεις με το ίδιο γράμμα δεν έχουν στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0.05$) σύμφωνα με την post hoc ανάλυση Tukey's HSD που ακολούθησε την One-way ANOVA για τους μέσους όρους των τιμών ΔCt , όπου $\Delta Ct = Ct_{ref} - Ct_{target}$, με Ct_{ref} να αντιπροσωπεύει τον αριθμό κύκλων του γονιδίου αναφοράς και Ct_{target} να αντιπροσωπεύει τον αριθμό κύκλων του γονιδίου στόχου.

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι αρνητικές επιδράσεις της αλόγιστης χρήσης των χημικών φυτοπροστατευτικών προϊόντων και λιπασμάτων στην ανθρώπινη υγεία και το περιβάλλον δημιούργησαν την ανάγκη για ανάπτυξη περιβαλλοντικά φιλικών στρατηγικών στις γεωργικές πρακτικές με σκοπό την προσπάθεια μείωσης των χημικών εισροών και την επίτευξη της αειφόρου γεωργίας (Savci, 2012; Carvalho et al., 2017). Μία τέτοια λύση αποτελεί η ενσωμάτωση βακτηρίων που προάγουν την ανάπτυξη των φυτών (Plant Growth Promoting Bacteria, PGPB) ή αλλιώς δρουν ως προβιοτικά των φυτών (Plant Probiotic Bacteria, PPB) σε ολοκληρωμένα συστήματα διαχείρισης παράσιτων και θρεπτικών (Berlec et al., 2012; Gouda et al., 2018). Τα PGPB μπορούν να προάγουν την ανάπτυξη των φυτών άμεσα λειτουργώντας ως βιοδιεγέρτες (biostimulants) και ως βιολιπάσματα (biofertilizers) ή/και έμμεσα λειτουργώντας ως παράγοντες βιολογικής αντιμετώπισης (biological control agents, BCAs) με το να παράγουν λυτικά ένζυμα, αντιμικροβιακούς δευτερογενείς μεταβολίτες, και παράγοντες ενεργοποίησης της φυτικής άμυνας (Vacheron et al., 2013; Jayakumara et al., 2020).

Ωστόσο, παρ'όλη την έρευνα που πραγματοποιείται γι' αυτούς τους μικροοργανισμούς, η χρήση τους στις γεωργικές πρακτικές είναι σχετικά περιορισμένη, λόγω της ασυνέπειας της δράσης τους, ενώ είναι αναλογικά λίγα τα σκευάσματα που είναι διαθέσιμα στο εμπόριο. Έτσι, πραγματοποιείται μια συνεχής αναζήτηση νέων στελεχών και εις βάθος διερεύνηση του γενετικού δυναμικού τους και της δράσης τους. Τα ενδοφυτικά βακτήρια που μπορούν να προάγουν την ανάπτυξη των φυτών (PGPEB) είναι μία ενδιαφέρουσα πηγή μελέτης και εφαρμογής και γι' αυτό το σκοπό αποτελούν το αντικείμενο της συγκεκριμένης διατριβής. Τα ενδόφυτα (endophytes) διαβιούν εντός των φυτικών ιστών χωρίς να προκαλούν ασθένεια (Santoyo et al., 2016), ενώ παρουσιάζουν πολλά πλεονεκτήματα έναντι των ριζοσφαιρικών μικροβίων, με τα κυριότερα να είναι η άμεση επίδραση στο φυτό και η δυνατότητα καταπολέμησης διασυστηματικών και ενδοφυτικών λανθάνοντων παθογόνων (Eljounaidi et al., 2016; Bolívar-Anillo et al., 2020; Morales-Cedeño et al., 2021; Oukala et al., 2021). Έχει αναφερθεί πως τα αρωματικά φυτά διαθέτουν ενδοφυτικά βακτήρια με ιδιαίτερα χαρακτηριστικά και αυξημένη ανταγωνιστική ικανότητα εναντίον φυτοπαθογόνων (Egamberdieva et al., 2017; Castronovo et al., 2021). Για όλους αυτούς τους λόγους στη συγκεκριμένη μελέτη επιλέχθηκαν ενδοφυτικά βακτήρια από αρωματικά φυτά και συγκεκριμένα τα *Teucrium polium* και *Hypericum hircinum*, τα οποία έχουν σημαντικές επωφελείς ιδιότητες ως φυτά και δεν έχουν μελετηθεί ιδιαίτερα προς αυτή την κατεύθυνση.

Ο σκοπός της παρούσας διατριβής ήταν η ανάδειξη ενδοφυτικών βακτηριακών απομονώσεων με ικανότητες προώθησης της ανάπτυξης των φυτών, βιολογικής αντιμετώπισης και περιβαλλοντικής προσαρμογής, η μελέτη της συμβατότητας ζευγών βακτηρίων, αλλά και της δράσης τους όσον αφορά την προώθηση της ανάπτυξης και την ενεργοποίηση της άμυνας φυτών τομάτας (*Solanum lycopersicum* var. *Chondrokatsari* Messinias) εναντίον του φυτοπαθογόνου *Botrytis cinerea*.

5.1 Επιλογή αντιπροσωπευτικών στελεχών

Τα βακτηριακά στελέχη που μελετήθηκαν είχαν απομονωθεί σε μεταπτυχιακές μελέτες του εργαστηρίου (Θωμλούδη, 2018; Δάβαρη, 2019). Επιλέχθηκαν απομονώσεις που ανήκουν στα γένη *Bacillus* ή *Pseudomonas*, καθώς αυτά φαίνεται να συγκεντρώνουν στελέχη με πολλαπλά χαρακτηριστικά προώθησης της ανάπτυξης των φυτών (Gouda et al., 2018; Wei et al., 2019). Στη συνέχεια, επιλέχθηκαν όλα τα διαφορετικά είδη, ενδεικτικά, από τη φυλογενετική ανάλυση του 16S rRNA γονιδίου και τα στελέχη ταξινομήθηκαν σε ομάδες ανάλογα με τη μορφολογία της αποικίας τους. Τέλος, επιλέχθηκαν δύο με τρία στελέχη από κάθε ομάδα, με προτίμηση αυτά να ανήκουν σε διαφορετικό φυτό ή διαφορετικό ιστό του ίδιου φυτού, όπου αυτό ήταν δυνατόν.

Σύμφωνα με τη φυλογενετική ανάλυση της αλληλουχίας 16S rDNA των στελεχών του γένους *Bacillus*, ανιχνεύθηκε η φυλογενετική ομάδα (group) *B. cereus*, καθώς και *B. subtilis* και συγκεκριμένα οι κλάδοι *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. pumilus* και *B. sonorensis*. Ακόμη, υπήρχε ένα στέλεχος του γένους *Paenibacillus* και 3 διακριτές ομάδες στελεχών του γένους *Pseudomonas*. Παρατηρήθηκε πως στελέχη προερχόμενα από τα δύο διαφορετικά φυτά είχαν ομοιότητες όπως τα Hil4-Tel46, Tel52-Hir102-Hir105 και Tel40-Tel42-Tel51-Hir119-Hir148-Hir149. Άλλα παρόμοια στελέχη βρέθηκαν σε διαφορετικό ιστό του ίδιου φυτού, όπως τα Tel34-Tel54-Ter61 και Tel36-Ter78-Ter80. Τέλος, κάποια στελέχη βρέθηκαν μόνο σε έναν ιστό του ενός φυτού, όπως το Tel31. Η ποικιλία διαφορετικών ειδών και γενών των ενδοφυτικών μικροοργανισμών ενός φυτού εξαρτάται από διάφορους παράγοντες, όπως το φυτικό ιστό, το φυτικό είδος, την ηλικία, την ποικιλία στη ριζόσφαιρα (Andreolli et al., 2016; Tan et al., 2017; Kōiv et al., 2019; Dastogeer et al., 2020; Deyett & Rolshausen, 2020; Wang et al., 2020c). Ακόμη, κάποιες μελέτες έχουν δείξει πως τα ενδόφυτα μπορούν να μετακινηθούν από τη ρίζα στα φύλλα και το αντίστροφο (Haruna et al., 2017; Deyett & Rolshausen, 2020; Fazle-Rabbee & Baek 2020).

5.2 Τα βακτηριακά στελέχη του γένους *Bacillus* συγκεντρώνουν πολλαπλά επιθυμητά χαρακτηριστικά

Οι περισσότερες μελέτες εύρεσης ωφέλιμων μικροοργανισμών για χρήση στη γεωργία περιλαμβάνουν μία προκαταρκτική διερεύνηση ικανοτήτων των απομονωμένων στελεχών σε *in vitro* συνθήκες που αφορούν χαρακτηριστικά προώθησης της ανάπτυξης των φυτών, επίδραση στο φυτό-μοντέλο *Arabidopsis thaliana* και παρεμπόδιση φυτοπαθογόνων ώστε να εντοπιστεί το περισσότερο υποσχόμενο στέλεχος και να ακολουθήσουν δοκιμές σε αποκομμένους καρπούς, στο θερμοκήπιο και αργότερα στο πεδίο (Shehata et al., 2016; Compant et al., 2019; Niu et al., 2020; Amaya-Gómez et al., 2020; Raymaekers et al., 2020).

Αν και υπάρχουν μελέτες που υποστηρίζουν πως η ικανότητα δράσης σε *in vitro* συνθήκες δε μεταφέρεται πάντα και σε συνθήκες θερμοκηπίου ή αγρού, ή και το αντίστροφο, όπου στελέχη είναι

ικανά *in planta* και όχι *in vitro* (Daayf et al., 2003; Köhl et al., 2011; Reva et al., 2019; Compant et al., 2019; Niu et al., 2020), θεωρείται γενικά ο πιο αξιόπιστος και γρήγορος τρόπος επιλογής υποσχόμενων μικροβίων. Ωστόσο, κάποια χαρακτηριστικά συχνά δεν εξετάζονται καθόλου σε *in vitro* συνθήκες σε τέτοιες σαρώσεις, όπως είναι η ικανότητα ταχείας κίνησης και σχηματισμού βιοϋμενίου (Amaya-Gomez et al., 2020), ενώ συχνά επιλέγεται ένα μόνο στέλεχος ως το «καλύτερο» όλων. Στη συγκεκριμένη διατριβή εφαρμόστηκε πολύπλευρη και λεπτομερής προσέγγιση διερεύνησης των ικανοτήτων των απομονωμένων στελεχών με δοκιμές σε πολλαπλές ιδιότητες ενώ στο τέλος επιλέχθηκαν περισσότερα του ενός στελέχη ώστε να υπάρχουν αυξημένες πιθανότητες να αξιοποιηθούν επιτυχημένα εμβόλια σε συνθήκες θερμοκηπίου (Köhl et al., 2011).

Καθώς στελέχη του ίδιου ή παρόμοιου είδους μπορεί να έχουν διαφορετικές ιδιότητες ως προς κάποια χαρακτηριστικά (Wielbo et al., 2010), τα αποτελέσματα των *in vitro* δοκιμών επιθυμητών χαρακτηριστικών που μελετήθηκαν στα 37 αρχικά επιλεγμένα στελέχη καθώς και των βακτηριακών αλληλεπιδράσεων χρησιμοποιήθηκαν και για διερεύνηση της λειτουργικής ομοιότητας ώστε να επιλεγούν αντιπροσωπευτικά στελέχη για την επόμενη φάση. Γενικά, επιβεβαιώθηκε η αρχική ομαδοποίηση ενώ σε κάποιες ομάδες αναδείχθηκαν και στελέχη με διαφορετικές λειτουργίες. Έτσι, επιλέχθηκαν όλα τα πιθανά διαφορετικά λειτουργικά στελέχη για τις δοκιμές της δεύτερης φάσης, δηλαδή 19 βακτηριακά στελέχη από τα 37 συνολικά.

Κατά τις δοκιμές αλληλεπίδρασης των βακτηριακών στελεχών χρησιμοποιήθηκαν η δοκιμή υπερκείμενης έγχυσης ημιστερεού θρεπτικού υλικού (Soft agar overlay assay) και η δοκιμή σχηματισμού γραμμής οριοθέτησης κατά την ομαδική κίνηση σε επιφάνειες (Swarm boundary assay). Η τεχνική soft overlay agar και η παρόμοια τεχνική agar well diffusion χρησιμοποιούνται σε δοκιμές ανταγωνιστικότητας *in vitro*, εναντίον ανθρωποπαθογόνων και φυτοπαθογόνων αρνητικών κατά Gram στελεχών (Mora et al., 2015; Zhang et al., 2019). Ακόμη, οι τεχνικές αυτές χρησιμοποιούνται για τη μελέτη της συμβατότητας βακτηριακών στελεχών για την αξιοποίησή τους ως εμβόλια στη γεωργία (Kumar et al, 2016b; Marian et al., 2018; Kumawat et al., 2019). Η άλλη *in vitro* μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε ήταν η δοκιμή swarm boundary, κατά την οποία αλληλεπιδρούν δύο στελέχη που εκτελούν κίνηση swarming τοποθετημένα αντιδιαμετρικά στο τρυβλίο. Σε αυτή την αλληλεπίδραση τα δύο κινούμενα μέτωπα κυττάρων μπορεί να συγχωνευτούν (merge) ή να σχηματιστεί μια διαφανής γραμμή οριοθέτησης (demarcation line, DL) στο σημείο συνάντησης, η οποία περιέχει κύτταρα που έχουν υποστεί λύση. Το φαινόμενο αυτό παρατηρήθηκε πρώτη φορά σε στέλεχη *Proteus mirabilis*, όπου το DL ονομάστηκε Dienes line, ενώ έχει παρατηρηθεί και σε στέλεχη *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycobacteria* (Budding et al., 2009; Rendueles et al, 2015), καθώς και σε στέλεχη του γένους *Bacillus subtilis* (Stefanic et al., 2015). Αίτιο αυτού του φαινομένου είναι ο μηχανισμός Kin discrimination (KD), ο οποίος περιγράφει τη διαφορετική συμπεριφορά ενός οργανισμού προς άλλους οργανισμούς ανάλογα με το πόσο συγγενικοί είναι (Wall, 2016; Kalamara et al., 2018). Σε αυτό το σύστημα τα «conspecific» κύτταρα, δηλαδή τα κύτταρα οργανισμών με πανομοιότυπο γενετικό περιεχόμενο (self) ή τα κύτταρα με παρόμοιο γενετικό περιεχόμενο που έχουν ίδια κάποια συγκεκριμένα γονίδια

συνεργασίας (kin) μπορούν να συνεργαστούν (Kalamara et al., 2018), ενώ το σύστημα KD στο είδος *B. subtilis* προσδιορίζεται από τον αποκλεισμό των non kin κυττάρων (Lyons & Kolter, 2017).

Σε μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί σε στελέχη *B. subtilis* έχει παρατηρηθεί πως κατά την αλληλεπίδραση οικοτύπων ή στελεχών του ίδιου είδους μπορεί να παρατηρηθεί DL ή συγχώνευση, ανάλογα με την γενετική ομοιότητα. Έτσι, κατά την αλληλεπίδραση στελεχών από διαφορετικά κοντινά είδη σχηματίζεται DL, ενώ κατά την αλληλεπίδραση στελεχών πιο μακρινών φυλογενετικά παύει να υφίσταται ο μηχανισμός KD με τις αλληλεπιδράσεις να είναι είτε ανταγωνιστικές είτε όχι (Stefanic et al., 2015; Lyons & Kolter, 2017; Kiesevalter et al., 2021). Αυτός ο μηχανισμός επιτρέπει σε μακρινά είδη να συνυπάρξουν κατά την κίνηση swarming ή σε βιοϋμένιο, προωθώντας την ποικιλότητα, ενώ παρέχει προστασία από την εκμετάλλευση δημόσιων αγαθών (public goods), π.χ. Surfactins, από κύτταρα-κλέφτες (cheaters) που δε συνεισφέρουν στην παραγωγή τους αλλά μπορούν, λόγω γενετικής ομοιότητας, να τα χρησιμοποιήσουν (Wall, 2016; Lyons & Kolter, 2017; Patra et al., 2017; Kraigher et al., 2020). Ακόμη, κατά τη λύση κυττάρων απελευθερώνεται γενετικό υλικό και έχει δειχθεί πως η οριζόντια γενετική μεταφορά (Horizontal Gene Transfer, HGT) είναι πολύ συχνή κατά την αλληλεπίδραση δύο non kin στελεχών σε swarming συνθήκες, υποδεικνύοντας τη χρησιμότητα του KD στην απόκτηση γονιδίων που θα προσφέρουν εξελικτικό πλεονέκτημα, από στελέχη όχι απόλυτα όμοια όπου δε θα εισαχθεί νέο γενετικό υλικό, αλλά ούτε και πολύ απομακρυσμένα όπου δε θα πετύχει ο ανασυνδυασμός (Stefanic et al., 2021).

Συνδυάζοντας τα αποτελέσματα έκβασης της αλληλεπίδρασης των στελεχών κάθε ομάδας μεταξύ τους, αλλά και με στελέχη των άλλων ομάδων φάνηκε πως η αρχική ομαδοποίηση ήταν σωστή σε γενικές γραμμές. Για παράδειγμα, στην τεχνική swarm boundary assay παρατηρήθηκε συγχώνευση μεταξύ των στελεχών κάθε ομάδας του κλάδου *B. amyloliquefaciens*, αλλά σχηματίστηκε DL κατά την αλληλεπίδραση στελεχών από διαφορετική ομάδα, ενώ τα στελέχη κάθε ομάδας είχαν ίδιες εκβάσεις με τα στελέχη εκτός ομάδας. Ακόμη, παρατηρήθηκε πως μεταξύ των δύο φυτών υπάρχουν στελέχη που αναγνωρίζονται ως kin, δηλαδή έχουν παρόμοιο γενετικό περιεχόμενο. Ωστόσο, ανιχνεύθηκαν και δύο απομονώσεις που είχαν ταξινομηθεί στην ίδια κατηγορία ως στελέχη *B. halotolerans* (Hil4, Tel46), των οποίων η αλληλεπίδραση swarming τα κατέταξε ως non kin, υποδεικνύοντας πως ίσως έχουν διαφορετική λειτουργικότητα. Ακόμη, μέσα από τις *in vitro* δοκιμές βακτηριακής αλληλεπίδρασης αναδείχθηκαν τα πιο επιθετικά στελέχη ως προς τα υπόλοιπα, που ίσως να επιβίωναν ευκολότερα αν χρησιμοποιούνταν ως εμβόλιο στο έδαφος λόγω ικανότητας ανταγωνισμού του αυτόχθονα πληθυσμού, τα οποία ανήκουν στους κλάδους *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis* και *B. halotolerans*.

Άλλα επιθυμητά χαρακτηριστικά που μελετήθηκαν με *in vitro* μεθόδους στα 37 ή 19 στελέχη αφορούσαν την προώθηση της ανάπτυξης των φυτών, την περιβαλλοντική προσαρμογή σε εύρος συνθηκών, τη φυσική ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά, την κινητικότητα και το σχηματισμό βιοϋμένιου. Σε γενικές γραμμές, διαφάνηκε πως στελέχη του γένους *Bacillus*, και συγκεκριμένα τα στελέχη των κλάδων *B. subtilis*, *B. halotolerans* και *B. amyloliquefaciens*, συγκέντρωσαν περισσότερα θετικά

χαρακτηριστικά σε σχέση με τα στελέχη του γένους *Pseudomonas* στις *in vitro* δοκιμές που πραγματοποιήθηκαν. Θετικά αποτελέσματα στις δοκιμές ομαδικής κίνησης σε επιφάνειες, παραγωγής της ένωσης acetoin και έκκρισης χιτινασών εμφάνισαν μόνο στελέχη του γένους *Bacillus*. Ωστόσο, σε κάποια χαρακτηριστικά, όπως η παραγωγή ενώσεων που περιέχουν ινδόλιο και η διαλυτοποίηση του ιζηματοποιημένου φωσφόρου, τα στελέχη του γένους *Pseudomonas* είχαν μεγαλύτερη ικανότητα συγκρίνοντας τα ποσοτικά επίπεδα, γεγονός που έχει παρατηρηθεί και σε άλλες μελέτες (Di Benedetto et al., 2019). Τα στελέχη του γένους *Bacillus* είχαν εντυπωσιακή ανθεκτικότητα σε υψηλές θερμοκρασίες σε *in vitro* συνθήκες, γεγονός που τα καθιστά περισσότερο κατάλληλα για εφαρμογή σε συνθήκες θερμοκηπίου και αγρού, όπου αναπτύσσονται υψηλές θερμοκρασίες.

Οι ρίζες διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στην πρόσληψη θρεπτικών και νερού και κατ' επέκταση στην παραγωγικότητα των φυτών και την αντοχή τους σε καταπονήσεις. Η αρχιτεκτονική του ριζικού συστήματος (Root System Architecture, RSA), δηλαδή η χωρική ταξινόμηση του, καθορίζεται από τη σχετική ανάπτυξη των διαφορετικών μερών του ριζικού συστήματος όπως και τη συχνότητα των διακλαδώσεων (branching) και καθορίζεται από το συνδυασμό γενότυπου και περιβάλλοντος (Bellini et al., 2014; Koevoets et al., 2016; Morris et al., 2017). Η βελτιστοποίηση της RSA, λοιπόν, είναι επιτακτική για τη βελτίωση της προσαρμοστικότητας των φυτών, ειδικά για αβιοτικές καταπονήσεις όπως η ξηρασία, η πλημμύρα, η έλλειψη θρεπτικών, αλλά και βιοτική καταπόνηση (Koevoets et al., 2016). Τα ριζικά τριχίδια διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην απορρόφηση νερού και θρεπτικών, αλλά και στην έκκριση φωσφατασών, μηλικού και κιτρικού οξέος (Tanaka et al., 2014). Ριζικό σύστημα κοντό με αυξημένες πλευρικές ρίζες στο επάνω μέρος του ριζικού συστήματος και αυξημένη πυκνότητα ριζικών τριχιδίων βοηθάει στην πρόσληψη του φωσφόρου, ο οποίος βρίσκεται στο επιφανειακό στρώμα του εδάφους (Péret et al., 2014). Αυξημένη συγκέντρωση νιτρικών σε ορισμένα σημεία προκαλεί ανάπτυξη πλευρικών ριζών, έτσι φαίνεται πως η αύξηση των πλευρικών ριζών βοηθά στην απορρόφηση αζώτου (Ruffel et al., 2011).

Τα PGPB μπορούν να τροποποιήσουν την αρχιτεκτονική του ριζικού συστήματος μέσω μεταβολής της κυτταρικής διαίρεσης και διαφοροποίησης των κυττάρων της ρίζας, καθώς και επιρροής στο μηχανισμό σχηματισμού ριζικών τριχιδίων και ανάπτυξης των πλευρικών ριζών (Zamioudis et al., 2013; López-Bucio et al., 2007; Ortiz-Castro et al., 2011,2014; Verbon & Liberman, 2016), οδηγώντας σε αύξηση της πρόσληψης θρεπτικών στοιχείων και νερού και βελτίωση της ανάπτυξης ολόκληρου του φυτού (Vacheron et al., 2013; Verbon & Liberman, 2016), ενώ οι αναπτυξιακές μεταβολές στη φυλλική επιφάνεια φαίνεται να είναι αποτέλεσμα αύξησης της κυτταρικής διαίρεσης (Luo et al., 2019). Ακόμα, έχει υποθεθεί πως η επαφή με βακτηριακά κύτταρα ερμηνεύεται από τη ρίζα ως σήμα για τοπικά υψηλή συγκέντρωση θρεπτικών (Pečenkova et al., 2017).

Στη συγκεκριμένη μελέτη πραγματοποιήθηκε μία εκτενής διερεύνηση της επίδρασης των στελεχών στο φυτό-μοντέλο *A. thaliana* Col-0 όπου εξετάστηκαν διάφορες συνθήκες εφαρμογής και περιβάλλοντος. Το συγκεκριμένο φυτό χρησιμοποιείται κατά κόρον ως μοντέλο για τη μελέτη αλληλεπίδρασης φυτών-μικροβίων και έχει καθιερωθεί ως το φυτό που χρησιμοποιείται στην

προκαταρκτική διερεύνηση μικροοργανισμών για την προώθηση της ανάπτυξης των φυτών (Baldan et al., 2015; Charron-Lamoureux & Beauregard, 2019; Lee et al., 2020). Το συγκεκριμένο φυτικό είδος δίνει ομογενοποιημένες αποκρίσεις σε μικρό χρονικό διάστημα, ενώ έχει μικρό μέγεθος και ευκολία στην καλλιέργεια. Κατά την προκαταρκτική αξιολόγηση όλων των 37 στελεχών, αυτά εμβολιάστηκαν σε υψηλή συγκέντρωση (10^9 - 10^{10} CFU/ml), με ποσότητα εμβολίου 10 μ L και η επώαση πραγματοποιήθηκε σε θάλαμο ανάπτυξης φυτών σε πιο υψηλή θερμοκρασία από την προβλεπόμενη για το φυτό *A. thaliana* (25 °C), ώστε τα βακτηριακά στελέχη να αναπτυχθούν με γρήγορο ρυθμό και να ελεγχθεί άμεσα αν υπάρχει κάποια αρνητική επίδραση στην ανάπτυξη των φυτών. Στη δεύτερη αξιολόγηση τα 19 αντιπροσωπευτικά στελέχη εμβολιάστηκαν στη συγκέντρωση που προτείνεται από τη βιβλιογραφία (10^8 CFU/ml) με ποσότητα εμβολίου 5 μ l και επώαση στο εύρος θερμοκρασίας που συστήνεται για το φυτό αραβίδωση (22 ± 1 °C). Ακόμη, οι μελέτες χωρίστηκαν σε αυτές όπου το στέλεχος εμβολιάστηκε σε απόσταση από το ακρορρίζιο και σε αυτές που το στέλεχος εμβολιάστηκε επάνω στο ακρορρίζιο.

Κατά τον εμβολιασμό των βακτηριακών στελεχών σε απόσταση από το ακρορρίζιο των φυτών παρατηρήθηκαν διάφοροι φαινότυποι με εύρος μεταβολών στην αρχιτεκτονική της ρίζας και στις δύο σαρώσεις που πραγματοποιήθηκαν σε διαφορετικές συνθήκες. Κάποια στελέχη δεν προκάλεσαν μεταβολές στο μήκος της ρίζας συγκριτικά με τα φυτά της μεταχείρισης του μάρτυρα ενώ άλλα στελέχη προκάλεσαν έντονη ή λιγότερο έντονη μείωση του μήκους με ταυτόχρονη αύξηση του αριθμού των πλευρικών ριζών. Τέτοιες παρατηρήσεις και κατηγοριοποιήσεις φαινοτύπων έχουν γίνει και σε άλλες μελέτες που εξετάζουν πλήθος βακτηρίων, όπου καταγράφηκαν ομάδες με έντονη μείωση της ρίζας, μέτρια μείωση της ρίζας ή επιμηκυμένες ρίζες συγκριτικά με το μάρτυρα (Baldan et al., 2015; Tsolakidou et al., 2019; Tzec-Interián et al., 2019).

Γενικά, δύο θετικά αποτελέσματα φαινοτύπων έχουν περιγραφεί στη βιβλιογραφία από την επίδραση βακτηρίων σε φυτά αραβίδωσης. Ο πιο κοινός είναι ο πρώτος, όπου η ανάπτυξη της κεντρικής ρίζας παρεμποδίζεται, με τις πλευρικές ρίζες και ριζικά τριχίδια να αυξάνονται σε αριθμό, ενώ ο δεύτερος αφορά αύξηση της βιομάζας χωρίς μείωση στο μήκος της κεντρικής ρίζας (Ryu et al., 2005; Zamioudis et al., 2013; Baldan et al., 2015; Dahmani et al., 2020). Το ριζικό σύστημα που χαρακτηρίζεται από μειωμένο μήκος ρίζας με αυξημένο αριθμό πλευρικών ριζών έχοντας ως αποτέλεσμα ένα κοντό και πυκνό ριζικό σύστημα περιγράφεται με τον όρο «clumped root phenotype» και έχει παρατηρηθεί σε πολλές μελέτες που αφορούν PGPB (Spaepen et al., 2014; Baldan et al., 2015; Asari et al., 2017; Chu et al., 2020; Lee et al., 2020).

Τα στελέχη που μείωσαν σημαντικά το μήκος της ρίζας στην πρώτη αξιολόγηση ήταν τα στελέχη που προκάλεσαν και το μικρότερο μήκος ρίζας στη δεύτερη αξιολόγηση συγκριτικά με τη μεταχείριση του μάρτυρα, και συγκεκριμένα ήταν τα στελέχη των κλάδων *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis*, *B. pumilus* και τα στελέχη Ter78 και Ter80 του γένους *Pseudomonas*. Ακόμη, τα ίδια στελέχη προκάλεσαν και μεγάλη αύξηση του μήκους των ριζικών τριχιδίων της κεντρικής ρίζας από 4 έως 5.5 φορές σε σύγκριση με το μάρτυρα, ενώ τη μεγαλύτερη αύξηση του αριθμού των τριχιδίων

προκάλεσαν τα στελέχη Tel34 και Ter78. Ωστόσο, αύξηση του αριθμού και του μήκους των ριζικών τριχιδίων προκλήθηκε και από στελέχη που δε μείωσαν σημαντικά το μήκος της ρίζας. Αντίθετα, στη μελέτη των Baldan και συνεργατών (2015) παρατηρήθηκε πως μεγαλύτερη αύξηση στον αριθμό και την πυκνότητα των ριζικών τριχιδίων προκάλεσαν τα στελέχη των ομάδων όπου τα φυτά είχαν έντονα μειωμένο μήκος της κεντρικής ρίζας και όχι αυτών όπου τα φυτά είχαν μακρύτερη κεντρική ρίζα. Ακόμη, παρατηρήθηκε πως τα ριζικά τριχίδια στις μεταχειρίσεις των περισσότερων στελεχών αναδύονταν πιο κοντά στο ακρορρίζιο συγκριτικά με τη μεταχείριση του μάρτυρα. Το ίδιο φαινόμενο παρατηρήθηκε και στη μελέτη των López-Bucio και συνεργατών (2007) και εξηγήθηκε ως πιθανό αποτέλεσμα πρόωρης διαφοροποίησης των κυττάρων.

Το αποτέλεσμα «clumped root phenotype» που παρατηρήθηκε σε συγκεκριμένα στελέχη φάνηκε να είναι πιο έντονο στην πρώτη αξιολόγηση όπου ευνοήθηκε η γρήγορη και έντονη ανάπτυξη του βακτηρίου, υποδεικνύοντας πως διαχεόμενες ή πτητικές ενώσεις, που παράγονται σε μεγαλύτερη ποσότητα όταν υπάρχουν περισσότερα βακτηριακά κύτταρα, ευθύνονται γι' αυτόν τον φαινότυπο. Για παράδειγμα, οι μεταχειρίσεις με τα στελέχη του κλάδου *B. pumilus* είχαν εντυπωσιακό φαινότυπο στην πρώτη αξιολόγηση, με εξαιρετικά κοντό και πυκνό ριζικό σύστημα, ενώ κατά τη δεύτερη αξιολόγηση τα στελέχη είχαν πολύ μικρότερη επίδραση, αλλά πάλι θετική. Τα στελέχη των κλάδων *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis* και *B. halotolerans* προκάλεσαν εντυπωσιακό φαινότυπο του ριζικού συστήματος κατά τη δεύτερη αξιολόγηση, με το μήκος των κεντρικών ριζών να έχει μειωθεί και οι πλευρικές ρίζες να έχουν αυξηθεί σε αριθμό, παρουσιάζοντας συνολικά ένα μέτριο μήκος κεντρικής ρίζας και πολύ πλούσιο ριζικό σύστημα συγκριτικά με τη μεταχείριση του μάρτυρα. Ωστόσο, κατά την πρώτη αξιολόγηση όπου η βακτηριακή ανάπτυξη ήταν μεγαλύτερη, υπήρχε πιο έντονη μείωση του μήκους της κεντρικής ρίζας και λιγότερο πλούσιο ριζικό σύστημα σε σχέση με τη δεύτερη αξιολόγηση, ενώ παρατηρήθηκε ήπιος καφέ μεταχρωματισμός της ρίζας. Κατά τη μελέτη των Charron-Lamoureux και Beauregard (2019) επίσης παρατηρήθηκε έντονη μείωση του μήκους της ρίζας, αλλά και επαγωγή καφέ μεταχρωματισμού, μετά από εμβολιασμό του στελέχους *B. subtilis* NCIB361 (=DSM10) επάνω στη ρίζα φυταρίου 3 ημερών και επώαση για άλλες 7 ημέρες. Τα στελέχη με αυτό το φαινότυπο παράγουν εκκρινόμενους και διαχεόμενους αντιμυκητιακούς μεταβολίτες *in vitro*, ωστόσο στη μελέτη των Asari και συνεργατών (2016) η δοκιμή του βιοδραστικού έναντι μυκήτων κλάσματος απομονωμένων λιποπεπτιδίων δεν είχε το ίδιο αποτέλεσμα και επηρέασε θετικά τη γενική ανάπτυξη της ρίζας, υποδεικνύοντας ότι η παρεμπόδιση της επιμήκυνσης δεν οφείλεται σε αντιμυκητιακούς δευτερογενείς μεταβολίτες αλλά σε άλλους παράγοντες. Τα στελέχη του γένους *Pseudomonas* παρουσίασαν περίπου ίδιο φαινότυπο και κατά τις δύο σαρώσεις. Καλύτερη επίδραση στα φυτά κατά την πρώτη αξιολόγηση, όπου η βακτηριακή ανάπτυξη ήταν μεγαλύτερη, είχαν και τα στελέχη που ανήκουν στο γένος *B. cereus*, καθώς και τα Hir115, Hir127, σε σχέση με την δεύτερη αξιολόγηση όπου οι μεταχειρίσεις τους παρομοίαζαν τη μεταχείριση του μάρτυρα.

Γενικά, έχει αναφερθεί και από άλλες μελέτες ότι η ένταση της επίδρασης των βακτηριακών στελεχών και εν τέλει ο φαινότυπος των φυτών εξαρτάται από την συγκέντρωση και ποσότητα του

βακτηριακού εμβολίου, καθώς και από την απόσταση όπου το εμβόλιο εφαρμόζεται σε σχέση με το άκρο της ρίζας (Kapulnik et al., 1985; Persello-Cartieaux et al., 2001; Shi et al., 2010; Ortiz-Castro et al., 2011,2014; Spaepen et al., 2014). Άλλη μια μελέτη έχει δείξει πως το βακτηριακό στέλεχος *Pseudomonas brassicacearum* Am3, το οποίο θεωρείται παθογόνο στην τομάτα, μπορεί να προκαλέσει προώθηση της ανάπτυξης του φυτού, ή να είναι φυτοπαθογόνο σε φυτά τομάτας ανάλογα με τον τρόπο εφαρμογής (Belimov et al., 2007). Ακόμη, σε υψηλές συγκεντρώσεις εμβολίου (10^7 - 10^8 CFU/ml) το στέλεχος προκάλεσε κοντή ρίζα, ενώ σε μικρότερη συγκέντρωση (10^6 CFU/ml) προκάλεσε επιμήκυνση της ρίζας συγκριτικά με τη μεταχείριση του μάρτυρα (Belimov et al., 2007). Μείωση της ανάπτυξης σε υψηλές συγκεντρώσεις βακτηριακού εμβολίου έχει παρατηρηθεί και σε φυτάρια τομάτας (Quiao et al., 2017).

Κατά τη δεύτερη αξιολόγηση πραγματοποιήθηκε εμβολιασμός των στελεχών στο ακρορρίζιο παρουσία σουκρόζης στο μέσο, με τις ίδιες συνθήκες που προαναφέρθηκαν για τη δεύτερη αξιολόγηση. Ως αποτέλεσμα του εμβολιασμού των στελεχών των κλάδων *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis*, *B. halotolerans*, *B. pumilus* και των στελεχών Ter78 και Ter80 του γένους *Pseudomonas*, το μήκος της ρίζας μειώθηκε σημαντικά, αλλά παράλληλα μειώθηκε και η πυκνότητα της ρίζας συγκριτικά με τον εμβολιασμό σε απόσταση. Αντιθέτως, αυξήθηκε το νωπό βάρος και φαίνεται να αυξήθηκε και η φυλλική επιφάνεια των φυταρίων σε σύγκριση με το μάρτυρα. Η έντονη μείωση του μήκους και της πυκνότητας της ρίζας μπορεί να οφείλεται στο ότι το εμβόλιο ήταν ισχυρό, με τη σουκρόζη να βοηθά στη γρήγορη βακτηριακή ανάπτυξη, ενώ ο εμβολιασμός των βακτηρίων πάνω στο ακρορρίζιο είχε ως αποτέλεσμα την άμεση και έντονη επίδραση τους στα πολύ νεαρά φυτάρια. Κατά τον εμβολιασμό των βακτηριακών στελεχών στο ακρορρίζιο του φυτού σε μέσο που δεν περιείχε σουκρόζη, προέκυψαν φυτά πιο καχεκτικά σε σχέση με εκείνα που αναπτύχθηκαν σε μέσο που περιείχε σουκρόζη. Ταυτόχρονα, και τα ίδια τα βακτήρια δεν είχαν αναπτυχθεί όσο στο μέσο που περιείχε σουκρόζη. Εκεί ίσως οφείλεται το γεγονός του μεγαλύτερου μήκους ρίζας παρουσία των βακτηριακών εμβολίων σε σχέση με το μέσο όπου υπάρχει σουκρόζη, καθώς μικρότερη συγκέντρωση των βακτηριακών κυττάρων συνεπάγεται και λιγότερο έντονη επίδραση. Ακόμη, τα στελέχη ομαδοποιήθηκαν ανάλογα με το βαθμό επίδρασης στην έκπτυξη πλευρικών ριζών, η οποία φαίνεται πιο ξεκάθαρα απουσία σουκρόζης, κάτι που παρατηρείται και σε άλλες μελέτες (Tzec-Interián et al., 2019). Στη μελέτη των Dahmani και συνεργατών (2020), ο εμβολιασμός του βακτηριακού στελέχους *Bacillus megaterium* RmBm31 που πραγματοποιήθηκε στο ακρορρίζιο φυτών *A. thaliana* σε μέσο που δεν περιέχει σουκρόζη οδήγησε σε σχηματισμό πλευρικών ριζών και αύξηση του μήκους των ριζικών τριχιδίων.

Η φυτική ορμόνη ινδολοξεϊκό οξύ (αυξίνη) διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην προώθηση της κυτταρικής διαίρεσης, την επιμήκυνση των κυττάρων και την αύξηση του αριθμού των πλευρικών ριζών και των ριζικών τριχιδίων (Verbon & Liberman, 2016). Εκτιμάται πως βακτήρια που σχετίζονται με τα φυτά μπορούν να παράγουν 10 μ M αυξίνης στη ριζόσφαιρα (Brandl et al., 1998). Μελέτες έχουν δείξει πως όσο πιο υψηλή είναι η συγκέντρωση της αυξίνης που παράγεται από τα

βακτηριακά στελέχη ή εφαρμόζεται εξωγενώς, τόσο μειώνεται το μήκος της ρίζας, ενώ αυξάνονται οι πλευρικές ρίζες σε αριθμό και τα ριζικά τριχίδια σε μήκος (Patten & Glick, 2002; Remans et al., 2008; Spaeren et al., 2014), συνεπώς το φαινόμενο «clumped root phenotype» θεωρείται τυπική απόκριση εξαρτώμενη από την αυξίνη (Vacheron et al., 2013). Ωστόσο, φαίνεται να μπορεί να επιτευχθεί και ανεξάρτητα από αυτήν, καθώς στελέχη που δεν παράγουν αυξίνη μπορούν να προκαλέσουν το συγκεκριμένο φαινότυπο (Zamioudis et al., 2013).

Το θετικό αποτέλεσμα στην *in vitro* δοκιμή παραγωγής ενώσεων που περιέχουν ινδόλιο θεωρείται ισχυρή ένδειξη παραγωγής ινδολοξεικού οξέος (αυξίνη) (Gilbert et al., 2018; Goswami et al., 2015a), αν και υπάρχουν και διάφορες άλλες ενώσεις με ινδόλιο που έχουν δραστηριότητα αυξίνης, όπως οι indole-3-ethanol, indole-3-acetaldehyde, indole-3-acetonitrile και indole butyric acid (IBA) (Keswani et al., 2020). Τα στελέχη που παρήγαγαν τη μεγαλύτερη συγκέντρωση ενώσεων που περιέχουν ινδόλιο σε σχέση με τα υπόλοιπα στελέχη (βάσει χρωματικής διαβάθμισης) ανήκουν στο γένος *Pseudomonas* και προκάλεσαν μείωση του μήκους της ρίζας και αύξηση του εμβαδού του ριζικού συστήματος, χωρίς ωστόσο να παρατηρείται πιο έντονη επίδραση στην πρώτη αξιολόγηση όπου εμβολιάστηκαν σε μεγαλύτερη συγκέντρωση. Τα στελέχη που παρουσίασαν μέτρια παραγωγή αυτών των ενώσεων και ανήκουν στους κλάδους *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens* και *B. halotolerans* προκάλεσαν κι αυτά το φαινόμενο «clumped root phenotype» με μεγαλύτερη επίδραση όταν εμβολιάστηκαν σε μεγαλύτερη συγκέντρωση. Αντίθετα, το στέλεχος Tel34 που είχε τη χαμηλότερη παραγωγή αυτών των ενώσεων, προκάλεσε πολύ έντονη μείωση του μήκους της ρίζας και αύξηση της πυκνότητας του ριζικού συστήματος σε μεγαλύτερη συγκέντρωση, ενώ είχε μικρότερη επίδραση σε μικρότερη συγκέντρωση. Έτσι, φαίνεται πως η αυξίνη ίσως να μην είναι η μόνη παραγόμενη ένωση από αυτά τα στελέχη που επηρεάζει την αρχιτεκτονική της ρίζας, ενώ το φαινόμενο αυτό φαίνεται να είναι δοσο-εξαρτώμενο κατά τον εμβολιασμό στελεχών *Bacillus*. Ενώσεις που εμπλέκονται σε βασικές λειτουργίες των βακτηριακών κυττάρων μπορούν να λειτουργήσουν ως μιμητές φυτικών ορμονών ή να επηρεάσουν έμμεσα την ομοίωση των ενδογενών ορμονών (Koevoets et al., 2016). Για παράδειγμα, έχει αναφερθεί η ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού του αζώτου από το στέλεχος *B. subtilis* L1 (Lee et al., 2020), η έκκριση συγκεκριμένων πρωτεϊνών, όπως η YxaL του στελέχους *B. velezensis* GH1-13 (Kim et al., 2019) και η παραγωγή νιτρικού οξειδίου (NO) το οποίο έχει προταθεί ως φυτοδιεγερτικός παράγοντας (Molina-Favero et al., 2008; Sami et al., 2018; Vacheron et al., 2018).

Ακόμη, έχει αναφερθεί ότι μικροβιακές πτητικές ενώσεις όπως η ακετοΐνη και το ινδόλιο μπορούν να προάγουν την ανάπτυξη των φυτών (Ryu et al., 2003; Bailly et al., 2014; Hossain et al., 2019). Ακετοΐνη παρήγαγαν όλα τα στελέχη του γένους *Bacillus* σύμφωνα με την *in vitro* δοκιμή. Όταν εξετάστηκε η επίδραση των πτητικών ενώσεων στο φυτό *A. thaliana* φάνηκε πως οι πτητικές ενώσεις δεν διαδραμάτισαν μεγάλο ρόλο στην ανάπτυξη του φυλλώματος, καθώς η μεγαλύτερη αύξηση του νωπού βάρους ήταν 1.3 έως 1.5 φορές, ενώ της φυλλικής επιφάνειας 2 φορές από τα στελέχη Hil4 και

Ter82, ωστόσο μπορεί να διαδραματίζουν σημαντικότερο ρόλο στην ανάπτυξη της ρίζας (Jiang et al., 2019), φαινόμενο που δεν εξετάστηκε.

Πέραν των μελετών στο φυτό-μοντέλο *A.thaliana* Col-0, είναι αναγκαία και η *in vitro* αξιολόγηση σε φυτό οικονομικής σημασίας, γι'αυτό χρησιμοποιήθηκαν φυτά τομάτας *S. lycopersicum* var. Chondrokatsari Messinias (Darras et al., 2017), μια τοπική ποικιλία της Μεσσηνίας, όπου τα βακτηριακά στελέχη εφαρμόστηκαν στο σπόρο. Η μεταχείριση των σπόρων με σκοπό την επαγωγή αμυντικών μηχανισμών έναντι αβιοτικών και βιοτικών καταπονήσεων ή τη βελτίωση της βλαστικότητας και προώθηση της φυτικής ανάπτυξης ονομάζεται διέγερση σπόρου (seed priming) και περιλαμβάνει διάφορες μεταχειρίσεις του σπόρου όπως η υδροδιέγερση (hydropriming), αλλά και εφαρμογές χημικών παραγόντων και μικροοργανισμών (Bisen et al., 2015; Paparella et al., 2015; Song et al., 2017; Dawood et al., 2018; Mitra et al., 2021). Η εφαρμογή βιολογικών παραγόντων σε σπόρους ονομάζεται βιοδιέγερση του σπόρου (seed biopriming) και είναι ιδιαίτερα υποσχόμενη, καθώς μπορεί να προστατεύσει το σπόρο από ασθένειες, να αυξήσει τη βλαστικότητα, να οδηγήσει σε πρόωμη επαγωγή άμυνας του φυτού και να εξοπλίσει το νεαρό φυτάριο από νωρίς με το επιθυμητό μικροβίωμα για προώθηση της ανάπτυξης και βιολογική αντιμετώπιση των φυτοπαθογόνων μικροοργανισμών, αρκεί να είναι συμβατό με τα φυτοπροστατευτικά προϊόντα που χρησιμοποιούνται για τους σπόρους (Compant et al., 2019; Mitra et al., 2021).

Οι περισσότερες μελέτες που αφορούν δοκιμές σε καλλιεργήσιμα φυτά με εφαρμογή βιολογικών παραγόντων, χρησιμοποιούν τη μέθοδο βιοδιέγερσης του σπόρου, είτε εμβαπτίζοντας τους σπόρους σε διάλυμα μικροοργανισμών, είτε χρησιμοποιώντας έναν πιο εμπορικό τρόπο, όπου εφαρμόζονται οι μικροοργανισμοί με κάποιο συγκολλητικό παράγοντα. Στη συγκεκριμένη μελέτη, κατά την διερεύνηση της επίδρασης των βακτηριακών στελεχών στη βλαστικότητα των σπόρων και την ανάπτυξη φυταρίων τομάτας *in vitro*, τα 19 αντιπροσωπευτικά στελέχη εφαρμόστηκαν ως εναιωρήματα στο σπόρο με τη βοήθεια του συγκολλητικού παράγοντα Carboxymethyl Cellulose (CMC, 1%). Τα στελέχη Hil4 και Tel34 ήταν τα μόνα που αύξησαν την βλαστικότητα στις 3 ημέρες, ενώ στις 8 ημέρες όλες οι μεταχειρίσεις συμπεριλαμβανομένου του μάρτυρα είχαν παρόμοιο χρόνο βλάστησης, υποδεικνύοντας πρόωμη βλάστηση αντί για συνολική βελτίωση της βλαστικότητας στη συγκεκριμένη ποικιλία, καθώς πρόκειται για μια ποικιλία με υψηλό ποσοστό βλαστικότητας. Σε άλλες μελέτες, στελέχη του γένους *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens* και *B. subtilis* πέτυχαν προώθηση της βλαστικότητας ή αύξηση της συνολικής βλαστικότητας σπόρων τομάτας (Abdallah et al., 2018). Μετά από ανάπτυξη του φυταρίου για 8 ημέρες, παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση του νωπού βάρους, μήκους βλαστού, μήκους ρίζας και επιφάνειας ρίζας από την εφαρμογή των στελεχών Hil4 (*B. halotolerans*), Hir139 (κλάδος *B. amyloliquefaciens*), Tel34 (κλάδος *B. pumilus*), καθώς και των Ter67, Ter78 (*Pseudomonas* spp.). Σε άλλες μελέτες έχει επίσης αναφερθεί αύξηση των τιμών φυτικών παραμέτρων από στελέχη *B. subtilis* και *B. velezensis* μέσω κάλυψης του σπόρου ή εμβολιασμού στο θρεπτικό μέσο (Xu et al., 2013; Qiao et al., 2017; Torres et al., 2020), αλλά και πτητικών ενώσεων (Tahir et al., 2017; Jiang et al., 2019; Chaouachi et al., 2021).

Στη συνέχεια, τα 19 στελέχη δοκιμάστηκαν έναντι σημαντικών φυτοπαθογόνων μυκήτων που καλύπτουν ένα ευρύ φάσμα ασθενειών προ- και μετασυλλεκτικά, όπως τα *Rhizoctonia solani* (σηψιρριζίες), *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* (αδρομυκώσεις), *Colletotrichum acutatum* (ανθράκωση), *Pythium debaryanum* (τήξη φυταρίων), *Botrytis cinerea* (τεφρά σήψη λαχανικών και καρπών). Κάποια στελέχη του γένους *Bacillus* και *Paenibacillus* ήταν τα πιο ικανά στην παρεμπόδιση των φυτοπαθογόνων *in vitro* σχηματίζοντας ζώνη παρεμπόδισης. Στελέχη των κλάδων *B. amyloliquefaciens* και *B. subtilis* έχουν αναδειχθεί ως οι πιο ισχυροί ανταγωνιστικοί μικροοργανισμοί των φυτοπαθογόνων μυκήτων *in vitro* (Calvo et al., 2017; Reyes-Estebanez et al., 2019; Chaouachi et al., 2021).

5.3 Επιλογή των καταλληλότερων στελεχών

Έχει ήδη αναφερθεί πως τα στελέχη της συγκεκριμένης διατριβής που ανήκουν στο γένος *Bacillus* φάνηκε να συγκεντρώνουν περισσότερα θετικά χαρακτηριστικά από τα στελέχη του γένους *Pseudomonas*. Έτσι, παρ'όλο που στελέχη του γένους *Pseudomonas* διέθεταν μεγαλύτερη, ποσοτικά, ικανότητα για διαλυτοποίηση φωσφόρου και παραγωγή αυξίνης, και προώθησαν την ανάπτυξη και στα δύο φυτά που εξετάστηκαν, τα στελέχη του γένους *Bacillus* φαίνεται να είναι περισσότερο υποσχόμενα σε αυτό το χαρακτηριστικό καθώς και στην αντιμετώπιση φυτοπαθογόνων μικροοργανισμών. Ακόμη, τα στελέχη του γένους *Bacillus* είχαν ικανότητα ταχείας ομαδικής κίνησης σε επιφάνειες που βοηθά στη γρήγορη προσέγγιση και τον αποικισμό της ριζόσφαιρας και της ρίζας, αλλά και στον ανταγωνισμό άλλων μικροοργανισμών, ενώ έδειξαν ισχυρή ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου που επηρεάζει την πρόσδεση και την εμμονή στη ριζική επιφάνεια (Bogino et al., 2013; Venieraki et al., 2016).

Τα είδη *Bacillus* έχουν ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών στη βιομηχανία, στη γεωργία, στα τρόφιμα, στην υγεία, ενώ κατατάσσονται ακριβώς μετά το είδος *Escherichia coli* και τις ζύμες όσον αφορά τη σημασία τους (Ngalimat et al., 2021). Το βασικότερό τους πλεονέκτημα είναι η παραγωγή ενδοσπορίων σε αντίξοες συνθήκες, τα οποία είναι δομές ανθεκτικές σε φυσικές και χημικές μεταχειρίσεις, όπως η θέρμανση, η αφυδάτωση, οι οργανικοί διαλύτες και η UV ακτινοβολία. Εξαιτίας αυτού, παρουσιάζουν μεγαλύτερη ευκολία χειρισμού κατά την προετοιμασία ενός βιολογικού σκευάσματος, καθώς διασφαλίζεται και μακροχρόνια διάρκεια ζωής τους στο σκεύασμα και πάνω στο σπόρο, ενώ άλλο ένα πλεονέκτημα είναι η έκκριση πλήθους σημαντικών αντιμικροβιακών μεταβολιτών, όπως είναι τα κυκλικά λιποπεπτίδια (López et al., 2018; Miljaković et al., 2020; Morales-Cedeño et al., 2020). Έτσι, κυρίως στελέχη του γένους *Bacillus* χρησιμοποιούνται σε εμπορικά σκευάσματα για γεωργικές εφαρμογές, με τα περισσότερα διαθέσιμα σκευάσματα να περιέχουν τέτοια στελέχη (Cawoy et al., 2011; Berg et al., 2017).

Ο κυβερνητικός οργανισμός FDA (Food and Drug Administration) των Η.Π.Α. έχει κατατάξει τα είδη *B. amyloliquefaciens/velezensis* και *B. subtilis* στην κατηγορία «Γενικά αναγνωρισμένα ως

ασφαλή» (Generally recognized as safe, GRAS) (Fira et al., 2018). Πειράματα τοξικότητας σε πλανγκτόν, σκουλήκια ή ποντίκια που πραγματοποιούνται από διάφορες έρευνες επιβεβαιώνουν την απουσία τοξικότητας τους (Harwood et al., 2018; Joly et al., 2021; Ye et al., 2021). Ακόμα, θεωρούνται ασφαλή για χρήση ως προβιοτικά παραγωγικών ζώων, όπως είναι οι κότες και τα γουρούνια, και ψαριών (Khalid et al., 2021; Quach et al., 2021), στη διατήρηση των τροφίμων και ως προβιοτικά για ανθρώπινη χρήση (Algburi et al., 2016; Elshagabee et al., 2017; Lee et al., 2019; Soto, 2021). Επίσης, στελέχη του *B. subtilis* χρησιμοποιούνται στην Ανατολή στα φαγητά που υποβάλλονται σε ζύμωση (fermented foods) (Kimura & Yokoyama, 2019; Gopikrishna et al., 2021). Έχουν βρεθεί στελέχη *B. velezensis* σε πεπτικά συστήματα ζώων ως προβιοτική φυσική μικροχλωρίδα (Reva et al., 2019). Ακόμη, όσον αφορά εφαρμογές σε καρπούς για μετασυλλεκτικές ασθένειες, αυτά τα στελέχη μεγαλώνουν σε συγκεκριμένα σημεία, κυρίως στις πληγές, ενώ ο πληθυσμός τους φθίνει με την πάροδο του χρόνου και δεν αποτελεί απειλή για την ανθρώπινη υγεία (Arrebola et al., 2010). Υποσχόμενα στελέχη πρέπει να χαρακτηρίζονται ταξινομικά σε επίπεδο είδους και στελέχους μέσω αλληλούχισης ολικού γονιδιώματος ώστε να κατηγοριοποιηθούν στην αντίστοιχη ομάδα κινδύνου (risk group) (Keswani et al., 2019).

Από τα στελέχη του γένους *Bacillus* ξεχώρισαν τα Hil4, Hir139, Tel34, Tel52, Ter90 για το συνδυασμό κατοχής πολλών επιθυμητών χαρακτηριστικών. Λίγο πιο ικανά στην προώθηση της ανάπτυξης των φυτών και λιγότερο ικανά στην αντιμετώπιση των φυτοπαθογόνων μυκήτων κρίθηκαν τα στελέχη Hil4 και Tel34, σε σύγκριση με τα υπόλοιπα 3 στελέχη. Ενδοφυτικά και ριζοσφαιρικά στελέχη των ειδών *B. subtilis* και *B. velezensis* έχουν μελετηθεί εκτενώς όσον αφορά τη δράση τους ως PGPB και BCAs (Calvo et al., 2019; Nifakos et al., 2021; Ye et al., 2021; Charron-Lamoureaux & Beauregard, 2019), χωρίς να σημαίνει ότι όλα τα στελέχη έχουν τέτοιες ικανότητες (Reva et al., 2019). Αντίθετα, στελέχη του είδους *B. halotolerans* έχουν μελετηθεί σε μικρότερο βαθμό (Slama et al., 2019; Wang et al., 2021; Wu et al., 2021). Το είδος *B. safensis* εντοπίστηκε πρώτη φορά σε επιφάνεια διαστημόπλοιου (Satomi et al., 2006) και στελέχη του έχουν δείξει ικανότητα διάσπασης ρύπων πετρελαίου και φυτοπροστατευτικών προϊόντων (Roy et al., 2018; Wu T. et al., 2019), αντιμικροβιακή δράση (Mayer & Kronstad, 2017), επαγωγή της φυτικής άμυνας (Sarkar et al., 2018) και προώθηση της ανάπτυξης των φυτών (Roy et al., 2018; Prakash & Agora, 2020), ωστόσο δεν υπάρχουν πολλές μελέτες έως σήμερα.

Συνήθως, μελέτες τέτοιου τύπου επιλέγουν είτε ένα (1) στέλεχος που να είναι καλύτερο σε όλα τα χαρακτηριστικά με βάση την αποτελεσματικότητά του σε εργαστηριακές δοκιμές, ώστε να γίνουν περαιτέρω μελέτες σε συνθήκες θερμοκηπίου ή αγρού, είτε δύο (2) στελέχη ώστε να ελεγχθεί το μίγμα τους. Ωστόσο, στη συγκεκριμένη μελέτη επιλέχθηκαν πέντε (5) από τα καταλληλότερα στελέχη. Κι άλλες μελέτες έχουν υποδείξει τη δοκιμή περισσότερων στελεχών σε πειράματα θερμοκηπίου ή αγρού ως την πιο σωστή προσέγγιση, καθώς αυξάνει τις πιθανότητες εύρεσης υποσχόμενων βακτηριακών στελεχών που δρουν αποδοτικά εκτός του εργαστηρίου (Köhl et al., 2011; Calvo-Garrido et al., 2018).

5.4 Η ανάλυση του γενώματος και των εκκρινόμενων διαχεόμενων μεταβολιτών ανέδειξε το δυναμικό των επιλεγμένων στελεχών

Επιβάλλεται πλέον η ακριβής φυλογενετική ταξινόμηση των ειδών που προορίζονται για χρήση ως PGPB και BCAs (Keswani et al., 2019). Τα τελευταία χρόνια γίνεται προσπάθεια να διαχωριστούν με περισσότερη ακρίβεια τα είδη του γένους *Bacillus*, καθώς φυλογενετικές αναλύσεις ολικού γονιδιώματος έχουν οδηγήσει σε πολλές ανακατατάξεις στην ονοματολογία με συγχώνευση ειδών, καθώς και διαμοίρασμα των ειδών σε περισσότερες ομάδες (groups) (Dunlap et al., 2016a,b; Palazzini et al., 2016; Ben-Gad & Gerchman, 2017; Fan et al., 2017; Calvo et al., 2019; Dunlap et al., 2020; Mullins et al., 2020). Έτσι, στη συγκεκριμένη μελέτη, πραγματοποιήθηκε αλληλούχιση ολικού γονιδιώματος των επιλεγμένων στελεχών με στόχο την ακριβή ταξινόμηση τους, αλλά και διερεύνηση του γενετικού δυναμικού τους όσον αφορά επιθυμητά χαρακτηριστικά ενός βακτηριακού εμβολίου. Μετά από φυλογενωμική ανάλυση, το στέλεχος Hil4 ταξινομήθηκε ως *B. halotolerans*, τα στελέχη Hir139 και Tel52 ως *B. velezensis*, το στέλεχος Tel34 ως *B. safensis* και το στέλεχος Ter90 ως *B. subtilis*.

Τα στελέχη Hil4, Hir139, Tel52, Ter90 φαίνεται πως παράγουν επιφανειοδραστικές ενώσεις τις οποίες εκκρίνουν στο υγρό μέσο καλλιέργειάς τους, αφού βρέθηκαν θετικά στη μέθοδο drop collapse. Πράγματι, το υπερκείμενο της υγρής καλλιέργειας αυτών των στελεχών παρεμπόδισε την ανάπτυξη του φυτοπαθογόνου μύκητα *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* σε στερεό μέσο ανάπτυξης μέσω σχηματισμού ζώνης παρεμπόδισης. Αντιθέτως, το υπερκείμενο της καλλιέργειας Tel34 που δεν είχε θετικό αποτέλεσμα στη δοκιμή drop collapse δεν κατάφερε να παρεμποδίσει την ανάπτυξη του φυτοπαθογόνου.

Τέτοιες ενώσεις φαίνεται να εκκρίνονται και στο στερεό μέσο καλλιέργειάς τους, αφού σχηματίστηκε ζώνη παρεμπόδισης με τους περισσότερους μύκητες που εξετάστηκαν σε διπλή καλλιέργεια. Για τη διερεύνηση της επίδρασης των διαχεόμενων μεταβολιτών στη μορφολογία των υφών του φυτοπαθογόνου κατά τη διπλή καλλιέργεια βακτηρίου-μύκητα, αυτές εξετάστηκαν μικροσκοπικά και παρατηρήθηκαν αλλοιώσεις, και συγκεκριμένα διογκωμένες υφές και αυξημένος αριθμός κάθετων διαφραγμάτων (σέπτα). Τέτοιες αλλοιώσεις έχουν παρατηρηθεί και σε άλλες μελέτες όπου έχουν δοκιμαστεί υπερκείμενα καλλιέργειών (Khedher et al., 2020; Toral et al., 2018; Kilani-Feki et al., 2016). Η παραμόρφωση των υφών μπορεί να οφείλεται σε παραγωγή αντιμυκητιακών ενώσεων, όπως τα κυκλικά λιποπεπτίδια (Xiao et al., 2021). Στη μελέτη των Calvo και συνεργατών (2019) το λιποπεπτιδικό κλάσμα του υπερκείμενου έδειξε σχεδόν ίδια δραστηριότητα με όλο το υπερκείμενο, υποδεικνύοντας ότι η αντιμυκητιακή δράση οφείλεται στα λιποπεπτίδια. Ακόμη, κατά τη διπλή καλλιέργεια των βακτηριακών στελεχών με το μύκητα *B. cinerea* σε θρεπτικό μέσο PDA παρατηρήθηκε σχηματισμός λευκού ιζήματος γύρω από τη βακτηριακή αποικία στην περιοχή της ζώνης παρεμπόδισης, φαινόμενο που έχει παρατηρηθεί και από άλλες μελέτες σε δοκιμές στελεχών *B. velezensis* έναντι του *B. cinerea* (Cawoy et al., 2015; Calvo et al., 2017). Οι συγγραφείς

υπέθεσαν πως μπορεί να οφείλεται σε συγκαθίζηση των εκκρινόμενων λιποπεπτιδίων όταν φθάνουν σε συγκεκριμένη συγκέντρωση ή να είναι αποτέλεσμα της μείωσης του pH λόγω της παραγωγής οξαλικού οξέος από το *B. cinerea* (Cawoy et al., 2015; Calvo et al., 2017). Το ίζημα δεν παρατηρήθηκε κατά τη συγκαλλιέργεια σε μέσο NA, αλλά μόνο σε PDA που υποστηρίζει την καλύτερη και γρηγορότερη ανάπτυξη του μύκητα και πιθανώς μεγαλύτερη παραγωγή των οξαλικών οξέων. Συνδυάζοντας αυτά τα αποτελέσματα, έγινε η υπόθεση πως το υπερκείμενο της καλλιέργειας περιέχει αντιμυκητιακούς παράγοντες που είναι και επιφανειοδραστικές ενώσεις, οι οποίες παράγονται και κατά τη στερεή καλλιέργεια, και πιθανώς ανήκουν στην οικογένεια των κυκλικών λιποπεπτιδίων.

Οι δευτερογενείς μεταβολίτες της ομάδας των κυκλικών λιποπεπτιδίων, είναι βιοεπιφανειοδραστικές αμφίφιλες ενώσεις που βοηθούν στην ομαδική κίνηση σε επιφάνειες (swarming) και το σχηματισμό βιοϋμενίου, εμφανίζουν άμεση, αλλά και έμμεση αντιμικροβιακή δράση με το να επάγουν την άμυνα των φυτών, ενώ είναι οι μεταβολίτες που αναζητούνται συχνότερα σε βακτηριακές απομονώσεις (Raaijmakers et al., 2010; Falardeu et al., 2013; Mnif & Ghribi, 2015; Stringlis et al., 2018b). Ακόμη, εμφανίζουν ιδιότητες όπως χαμηλή τοξικότητα, υψηλή βιοαποικοδομησιμότητα και υψηλή αποτελεσματικότητα, οπότε χρησιμοποιούνται ως γαλακτωματοποιητές και σταθεροποιητές στη βιομηχανία τροφίμων και καλλυντικών, ως ουσίες που επιτυγχάνουν βιολογική αντιμετώπιση φυτοπαθογόνων μικροοργανισμών στη γεωργία, αλλά και στη βιοαποκατάσταση εδαφών (Meena & Kanwar, 2015). Τα κυκλικά λιποπεπτιδία χωρίζονται σε 3 οικογένειες ενώσεων, τις Iturins, Fengycins και Surfactins. Η κάθε οικογένεια περιλαμβάνει πολλές ισόμορφες ενώσεις (isoforms, variants) με διαφορετική σύσταση αμινοξέων, ενώ η κάθε ένωση έχει αρκετές ομόλογες ενώσεις (homologues/homologs), με διαφορετικό μήκος αλειφατικής αλυσίδας (Falardeu et al., 2013). Κάθε ισόμορφη ή ομόλογη ένωση μπορεί να έχει και διαφορετική δραστηριότητα από τις υπόλοιπες (Zhou S. et al., 2020). Αυτές οι ενώσεις δρουν έναντι των παθογόνων μέσω αλληλεπίδρασης με την κυτταρική μεμβράνη κυρίως δημιουργώντας πόρους, αλλά και με ενδοκυττάριους στόχους (Raaijmakers et al., 2010; Falardeu et al., 2013).

Στην παρούσα μελέτη, πραγματοποιήθηκε εκχύλιση των εκκρινόμενων διαχεόμενων μεταβολιτών που περιέχονταν στη ζώνη παρεμπόδισης κατά τη διπλή καλλιέργεια των βακτηριακών στελεχών με το φυτοπαθογόνο *B. cinerea*, όπως και σε ζώνη παρόμοιου μεγέθους κατά την αξενική καλλιέργεια των στελεχών, με σκοπό να ελεγχθεί εάν οι μεταβολίτες παράγονται ιδιοσυστατικά και να ταυτοποιηθούν. Χρησιμοποιήθηκε ο διαλύτης οξικός αιθυλεστέρας (ethyl acetate) καθώς φαίνεται πως τα συγκεκριμένα εκχυλίσματα περιέχουν μεγαλύτερη ποικιλία και ποσότητα μεταβολιτών σε σύγκριση με εκχυλίσματα με άλλους διαλύτες (Dimkić et al., 2017). Η βιοδραστικότητα των ακατέργαστων εκχυλισμάτων έναντι του μύκητα *B. cinerea* δοκιμάστηκε με τη μέθοδο της διπλής καλλιέργειας, όπου φάνηκε πως όλα τα εκχυλίσματα ήταν βιοδραστικά, σε μικρότερο ή μεγαλύτερο βαθμό, εκτός από αυτά του Tel34. Στη συνέχεια, τα εκχυλίσματα υποβλήθηκαν σε χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) και ακολούθησε βιοαυτογραφία για να εντοπιστούν βιοδραστικές ζώνες

ενώσεων. Το μοτίβο των βιοδραστικών ζωνών στην πλάκα TLC ήταν ίδιο για τα εκχυλίσματα μονής και διπλής καλλιέργειας κάθε στελέχους, υποδεικνύοντας ότι οι συγκεκριμένες αντιμυκητιακές ενώσεις παράγονται συνεχώς ανεξάρτητα από την παρουσία του φυτοπαθογόνου μύκητα, γεγονός πολύ σημαντικό για τη βιολογική αντιμετώπιση φυτοπαθογόνων μικροοργανισμών (Arseneault & Fillion, 2017; Dimoroulou et al., 2019). Τα εκχυλίσματα του Hil4 εμφάνισαν δύο βιοδραστικές ζώνες, με τη μία εκ των δύο ζωνών να είναι οριακά διακριτή, ενώ κατά τη δοκιμή βιοδραστικότητας των εκχυλισμάτων σε διπλή καλλιέργεια με το μύκητα σχηματίζεται μικρή ζώνη παρεμπόδισης η οποία κρατάει έως και 4 ημέρες. Αντιθέτως, τα εκχυλίσματα των Hir139 και Tel52, εμφάνισαν μία μεγάλη βιοδραστική ζώνη, η οποία μπορεί να περικλείει περισσότερες ζώνες που δεν μπορούν να διαχωριστούν λόγω μεγάλης συγκέντρωσης των ενώσεων, ενώ η συγκεκριμένη βιοδραστική ζώνη παραμένει αναλλοίωτη στο πέρας της επώασης. Συνδυάζοντας τα αποτελέσματα της βιοαυτογραφίας και της διπλής καλλιέργειας, συμπεραίνεται πως ίσως υπήρχε διαφορά συγκέντρωσης των βιοδραστικών ενώσεων μεταξύ των δύο ομάδων δειγμάτων. Ωστόσο, δεν μπορεί να αποκλειστεί και το ενδεχόμενο να οφείλεται και στη διαφορετική σύσταση των ενώσεων, με πιο βιοδραστικές ενώσεις ή ενώσεις με μεγαλύτερο χρόνο ημιζωής να είναι παρούσες στα εκχυλίσματα των στελεχών Hir139 και Tel52. Τα εκχυλίσματα του στελέχους Ter90 εμφάνισαν βιοδραστικότητα στη διπλή καλλιέργεια, αλλά όχι στην TLC, ενώ τα εκχυλίσματα του Tel34 δεν εμφάνισαν καθόλου βιοδραστικότητα. Για τα εκχυλίσματα της αζενικής βακτηριακής καλλιέργειας των στελεχών Hil4 και Hir139 ακολούθησε ανάλυση υγρής χρωματογραφίας εξαιρετικά υψηλής απόδοσης σε σύζευξη με φασματομετρία μαζών υψηλής διακριτικής ικανότητας (UHPLC-HRMS) για την ταυτοποίηση των εκκρινόμενων διαχεόμενων στο μέσο ενώσεων.

Σε μελέτες όπου η κινητή φάση της TLC είναι η ίδια που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη, έχουν καταγραφεί τιμές R_f 0.26-0.60 για τα λιποπεπτίδια της οικογένειας των Iturins, 0.55-0.80 για Surfactins και 0.08-0.23 για Fengycins (Arrebola et al., 2010; Zerouh et al., 2011; Dimkić et al., 2017; Calvo et al., 2019; Cozzolino et al., 2020). Μάλιστα για τα ιτουρινικά λιποπεπτίδια υπάρχει μία σύγχυση ως προς τις τιμές R_f καθώς φαίνεται πως διαφορετικές ισόμορφες ενώσεις ιτουρινών εμφανίζουν ίδια τιμή μεταξύ των διάφορων μελετών (Arrebola et al., 2010; Yáñez-Mendizábal et al., 2012; Dimkić et al., 2017; Calvo et al., 2019). Αυτό μπορεί να οφείλεται είτε στο ότι η TLC δεν είναι απόλυτα αναπαραγώγιμη μέθοδος μεταξύ διαφορετικών εργαστηρίων είτε στο ότι δεν είναι τόσο ευαίσθητη μέθοδος για την ανίχνευση διαφορετικών ισομορφών. Οι τιμές R_f που υπολογίστηκαν κυμάνθηκαν στο εύρος 0.359-0.459, που υποδεικνύει ότι οι βιοδραστικές ενώσεις είναι λιποπεπτίδια της οικογένειας των Iturins (Zerouh et al., 2011; Cozzolino et al., 2020). Στα εκχυλίσματα του στελέχους Hil4 εμφανίστηκαν δύο βιοδραστικές ζώνες σε αυτό το εύρος, ενώ στα εκχυλίσματα των στελεχών Hir139 και Tel52 εμφανίστηκε μία μεγάλη ζώνη, η οποία ίσως περικλείει δύο ή περισσότερες ζώνες. Στη μελέτη των Dimkić και συνεργατών (2017) αναφέρθηκε η ύπαρξη πολλαπλών ζωνών για την πρότυπη ένωση Iturin A από την εταιρεία Sigma-Aldrich κατά την ανάπτυξή της σε πλάκα TLC και αποδόθηκε στην ύπαρξη διαφορετικών ομόλογων ενώσεων (Tsuge et al., 2001).

Οι ενώσεις που ανήκουν στην οικογένεια των Iturins φαίνεται να έχουν ισχυρή δράση εναντίον ευρέος φάσματος μυκήτων και ζυμών, με πιο περιορισμένη αντιβακτηριακή και καθόλου αντιϊκή δράση (Romero et al., 2007; Zerriouh et al., 2011; Ma et al., 2012), ενώ μπορούν να επάγουν και τους μηχανισμούς άμυνας των φυτών (Farace et al., 2015; Kawagoe et al., 2015; Park et al., 2016; Wu et al., 2018). Κάποιες μελέτες αναφέρουν τις ενώσεις της οικογένειας Iturins ως τις πιο δραστικές και σημαντικές σε σχέση με τις υπόλοιπες οικογένειες εναντίον φυτοπαθογόνων μυκήτων (Zhao et al., 2013; Falardeu et al., 2013; Mnif & Ghribi, 2015; Béchet et al., 2013; Zhang et al., 2013; Arrebola et al., 2010; Ma et al., 2012). Για παράδειγμα, στη μελέτη των Cao και συνεργατών (2018), όπου εξετάστηκαν μεταλλάγματα στελεχών *B. velezensis* εναντίον του μύκητα *F. oxysporum* και του βακτηρίου *Ralstonia solanacearum*, φάνηκε πως είτε η Iturin είτε η Fengycin είναι επαρκής για την αντιβακτηριακή δράση, κινητικότητα και σχηματισμό βιοϋμενίου, ενώ μόνο η Iturin παίζει κύριο ρόλο στη δράση έναντι του μύκητα *in vitro* και στα πειράματα θερμοκηπίου. Κάτι αντίστοιχο αναφέρεται και στη μελέτη των Xu και συνεργατών (2013) για τη Bacillomycin D.

Κατά την ανάλυση του γονιδιώματος του στελέχους Hil4 με το πρόγραμμα antiSMASH βρέθηκε μία συστάδα βιοσυνθετικών γονιδίων (BGC) της ένωσης Mojavensin (Asn₁, Tyr₂, Asn₃, Gln₄, Pro₅, Asp₆, Asp₇) (Dunlap et al., 2019), η οποία δεν υπάρχει καταχωρημένη στη βάση δεδομένων MIBiG που χρησιμοποιείται από το antiSMASH. Η ένωση Mojavensin απομονώθηκε πρώτη φορά από την καλλιέργεια του στελέχους *B. mojavensis* B0621A και φαίνεται να διαθέτει χαμηλή αντιμυκητιακή ικανότητα, ωστόσο ο ακριβής λειτουργικός της ρόλος δεν έχει εξακριβωθεί ακόμα (Ma et al., 2012; Ma & Hu, 2014). Παλαιότερα, υπήρχε η πεποίθηση πως μόνο στελέχη του είδους *B. mojavensis* παρήγαγαν την ένωση Mojavensin, ωστόσο πλέον κάποια από αυτά τα στελέχη ταξινομούνται στο είδος *B. halotolerans* (Dunlap et al., 2016a). Η συγκεκριμένη BGC δεν έχει βρεθεί στα άλλα δημοσιευμένα γονιδιώματα *B. halotolerans* που σχετίζονται με φυτά (Gold et al., 2014; Heo et al., 2019; Slama et al., 2019), αλλά και άλλες απομονώσεις (Sagredo-Beltrán et al., 2018; Wang et al., 2021; Wu et al., 2021). Κατά την ανάλυση UHPLC-HRMS του εκχυλίσματος των εκκρινόμενων διαχεόμενων μεταβολιτών κατά την αζενική καλλιέργεια του στελέχους Hil4 εντοπίστηκε η ένωση Mojavensin, επιβεβαιώνοντας τα ευρήματα της ανάλυσης γονιδιώματος. Κατά την ανάλυση του γονιδιώματος του στελέχους Hir139 βρέθηκε η συστάδα βιοσυνθετικών γονιδίων της ένωσης Bacillomycin D, ενώ βρέθηκαν 5 ομόλογες ενώσεις της (C13-C17) κατά την ανάλυση του εκχυλίσματος από τη μονή βακτηριακή καλλιέργεια με UHPLC-HRMS. Τη BGC της ένωσης Bacillomycin D κατέχει και το στέλεχος Tel52. Πέρα από τις παραγόμενες συγκεντρώσεις των ενώσεων, ίσως η διαφορά του στελέχους Hil4 με το στέλεχος Hir139 στη βιοδραστικότητα των εκχυλισμάτων να οφείλεται στην παραγωγή ενός πιο αδύναμου ιτουρινικού λιποπεπτιδίου, της Mojavensin, σε σύγκριση με τις αρκετές ομόλογες ενώσεις της ισχυρής Bacillomycin D. Κατά την ανάλυση του γονιδιώματος του στελέχους Ter90 δε βρέθηκε συστάδα γονιδίων που να εμπλέκεται στη βιοσύνθεση κάποιου από τα ιτουρινικά λιποπεπτίδια, κάτι που ίσως εξηγεί την απουσία βιοδραστικής ζώνης στην πλάκα TLC, καθώς και τη μειωμένη δράση του στη δοκιμή βιολογικής αντιμετώπισης *in vitro* συγκριτικά με τα 3 προηγούμενα στελέχη, όπου χρειαζόταν μεγαλύτερη ποσότητα του

βακτηριακού εμβολίου για να υπάρχει ξεκάθαρη ζώνη σε κάποιους από τους εξεταζόμενους μύκητες. Τα ευρήματα αυτά συμφωνούν με την κατάταξη αυτών των Iturins σε κάθε είδος, καθώς φαίνεται πως τα στελέχη *B. velezensis* συνδέονται με την παραγωγή Bacillomycin D, Bacillomycin L και Iturin A, τα στελέχη *B. subtilis* συνδέονται με την παραγωγή Mycosubtilin ή κανενός ιτουρινικού λιποπεπτιδίου, ενώ τα *B. halotolerans* συνδέονται με την παραγωγή Mojavensin ή κανενός ιτουρινικού λιποπεπτιδίου, αν και η ένωση Mojavensin δε λαμβάνεται σοβαρά υπ' όψιν στις μελέτες σύγκρισης BGCs (Dunlap et al., 2019; Steinke et al., 2021).

Εκτός από τα λιποπεπτίδια της οικογένειας Iturins, ισχυρή αντιμυκητιακή δράση εμφανίζουν και τα λιποπεπτίδια της οικογένειας Fengycins (Falardeu et al., 2013). Αρκετές μελέτες έχουν προτείνει ότι η ένωση Fengycin είναι ο κύριος τρόπος δράσης εναντίον των μυκήτων (Yanez-Mendizabal et al., 2012; Guo et al., 2014; Li et al., 2014; Xu et al., 2013; Zihahirwa et al., 2017; Zeng et al., 2021), πως μπορεί να επάγει την άμυνα των φυτών (Ongena et al., 2007; Wu et al. 2018; Li et al. 2019), ενώ είναι απαραίτητη για το σχηματισμό βιοϋμενίου (Zeng et al., 2021). Ωστόσο, έχει αναφερθεί και *in vitro* αντιβακτηριακή δράση έναντι των *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* και *Pseudomonas aeruginosa* PA01 (Medeot et al., 2021). Αυτές οι διαφορές στις αναφορές της σημασίας των Iturins και Fengycins μεταξύ των μελετών μπορεί να οφείλονται στο ότι διαφορετικά λιποπεπτίδια είναι περισσότερο δραστικά έναντι διαφορετικών μυκήτων (Touré et al., 2004; Liu et al., 2014) ή σε διαφορές παραγόμενης συγκέντρωσης ή σε άλλες διαφορές στην πειραματική διαδικασία. Ωστόσο, υπάρχουν μελέτες όπου αναφέρεται η σημασία της παρουσίας και των δύο λιποπεπτιδίων (Romero et al., 2007; Jiao et al., 2021). Κατά την ανάλυση TLC δε βρέθηκαν άλλες ζώνες βιοδραστικών ενώσεων, όπως οι Fengycins. Ωστόσο, όλα τα στελέχη εκτός του Tel34 διαθέτουν τα βιοσυνθετικά γονίδια της. Ακόμη, η ένωση Fengycin A (C16) ανιχνεύθηκε και στα εκχυλίσματα της μονής καλλιέργειας των στελεχών Hil4 και Hir139. Στη μελέτη των Calvo και συνεργατών (2019) παρατηρήθηκε αυτό το φαινόμενο, όπου ενώ υπήρχε η Fengycin στο υπερκείμενο της καλλιέργειας, εμφανίστηκε βιοδραστική κηλίδα μόνο στην Iturin, ενώ σε άλλες μελέτες έχει παρατηρηθεί το αντίθετο (Cozzolino et al., 2020). Αυτό το φαινόμενο ίσως οφείλεται στη συγκέντρωση του κάθε λιποπεπτιδίου, τις ομόλογες ενώσεις που παράγονται, το μύκητα που εξετάζεται ή σε διαφορές στις συνθήκες περιβάλλοντος κατά την ανάπτυξη της πλάκας (Fan H. et al., 2017a).

Η τελευταία κύρια οικογένεια ενώσεων κυκλικών λιποπεπτιδίων που συναντάται στο γένος *Bacillus* είναι αυτή των Surfactins. Αυτές οι ενώσεις είναι ισχυρά επιφανειοδραστικές, είναι αναγκαίες για την εκτέλεση της ομαδικής κίνησης και το σχηματισμό βιοϋμενίου, ενώ επιδεικνύουν ισχυρή αντιβακτηριακή και αντιϊκή δραστηριότητα (Ongena & Jacques, 2008; Fan H. et al., 2017b). Έχει αναφερθεί πως η ένωση Surfactin βοηθά στο σχηματισμό του βιοϋμενίου, οδηγώντας στην εμμονή του βακτηρίου πάνω στο φύλλο και κατ'επέκταση της συνεχούς έκκρισης των αντιμικροβιακών λιποπεπτιδίων Bacillomycin και Fengycin για επιτυχή αντιμετώπιση των φυτοπαθογόνων μικροοργανισμών (Zerliouh et al, 2014), αλλά και τη διέγερση της ISR (Stoll et al., 2021). Ακόμη, έχει αναφερθεί πως έχει άμεση αντιβακτηριακή δράση (Fan H. et al., 2017b), ή έμμεση εμποδίζοντας το

σχηματισμό βιοϋμενίου άλλων βακτηρίων, και άρα τον αποικισμό των παθογόνων στους φυτικούς ιστούς (Chen et al., 2009a). Αρχικά, θεωρούταν πως οι Surfactins δεν έχουν αντιμυκητιακή δράση (Ma et al., 2012; Waewthongrak et al., 2015), αλλά κάποιες μελέτες το καταρρίπτουν (Snook et al., 2009; Arrebola et al., 2010; Qi et al., 2010; Luo et al., 2015b; Jiang et al., 2016; Wang et al., 2017; Sarwar et al., 2018). Επιπρόσθετα, οι Surfactins φαίνεται να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο και στην επαγωγή της φυτικής άμυνας (Ongena et al., 2007; Farace et al., 2015; Falardeu et al., 2013; García-Gutiérrez et al., 2013; Cawoy et al., 2014; Rodriguez et al., 2018). Στα στελέχη Hil4, Hir139, Tel52 και Ter90 βρέθηκε η συστάδα γονιδίων της ένωσης Surfactin, ενώ στο στέλεχος Tel34 βρέθηκε η συστάδα που αφορά την ένωση Pumilacidin. Η ένωση Pumilacidin έχει αναφερθεί πως διαθέτει δράση αντιϊκή (Naguse et al., 1990), παρεμποδιστική της κίνησης παθογόνων βακτηρίων (Xiu et al., 2017) και πρόσφατα αναδείχθηκε η αντιμικροβιακή της δράση έναντι του *Staphylococcus aureus* (Saggese et al., 2018). Ακόμη, βρέθηκαν 2 ομόλογες ενώσεις της Surfactin A (C13, C15) στα εκχυλίσματα των στελεχών Hil4 και Hir139. Έχει παρατηρηθεί πως η δραστηριότητα των Surfactins εξαρτάται από το μέγεθος της αλειφατικής αλυσίδας και μάλιστα η Surfactin A C15 φαίνεται να έχει μεγαλύτερη δραστηριότητα σε σύγκριση με τις ομόλογες C12 και C13 (Bacon et al., 2012; Wu S. et al., 2019; Pršić & Ongena, 2020).

Η ικανότητα στελεχών *Bacillus* spp. να παράγουν περισσότερα του ενός λιποπεπτίδια είναι πολύ σημαντική, καθώς η συνεργιστική ή προσθετική τους δράση οδηγεί σε μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα (Falardeu et al., 2013). Πολλές μελέτες έχουν υποδείξει την συνεργιστική ή προσθετική δράση των λιποπεπτιδίων για τα ζεύγη Surfactin-Iturin, όπου η Surfactin ενισχύει τη δράση της Iturin (Maget-Dana et al., 1992; Lin et al., 2011), Iturin-Fengycin (Romero et al., 2007; Waewthongrak et al., 2014), Bacillomycin-Fengycin (Liu et al., 2011), Surfactin-Fengycin (Ongena et al. 2007; Tao et al., 2011; Alvarez et al., 2012; Wang et al., 2020b), ενώ τέτοιο φαινόμενο συνεργισμού δεν παρατηρήθηκε στη μελέτη των Dimkic και συνεργατών (2017). Στη μελέτη των Tanaka και συνεργατών (2015) συνδυασμός των Bacillomycin D και Surfactin έδειξε συνεργισμό εναντίον της τεφράς σήψης σε φύλλα αγγουριού αλλά όχι εναντίον του *B. cinerea in vitro*. Ωστόσο, έχει παρατηρηθεί και η μείωση δραστηριότητας των Surfactin και Fengycin, πιθανώς λόγω δημιουργίας συσσωματωμάτων υπό κάποιες συνθήκες (Liu et al., 2014; Cawoy et al., 2015; Zihalirwa Kullimushi et al., 2017).

Κοινά ευρήματα στα γονιδιώματα όλων των στελεχών ήταν οι συστάδες βιοσυνθετικών γονιδίων των ενώσεων Bacillibactin και Bacilysin, οι οποίες ανιχνεύθηκαν πιθανά και στα εκχυλίσματα των στελεχών Hil4 και Hir139. Η συστάδα βιοσυνθετικών γονιδίων της σιδηροφόρας ένωσης Bacillibactin αποτελείται από συνθετάσες μη ριβοσωμικών πεπτιδίων και η εύρεσή της επιβεβαίωσε το θετικό αποτέλεσμα της *in vitro* δοκιμής CAS-agar. Οι σιδηροφόρες ενώσεις λειτουργούν ως χηλικοί παράγοντες για το συμπλοκοποιημένο σίδηρο στο έδαφος καθιστώντας τον βιοδιαθέσιμο για τα φυτά, ενώ ταυτόχρονα τον καθιστούν μη διαθέσιμο για τους παθογόνους μύκητες, καθώς τα βακτηριακά σιδηροφόρα έχουν μεγαλύτερη συγγένεια για τον τρισθενή σίδηρο (Arguelles-Arias et al., 2009).

Επίσης, η Bacillibactin φαίνεται να έχει και άμεση αντιβιοτική δράση (Dimoroulou et al., 2021a). Η συγκεκριμένη ένωση έχει αναφερθεί να περιορίζει την ανάπτυξη και την μόλυνση του παθογόνου *Phytophthora capsici* και *Fusarium oxysporum* μειώνοντας τη σοβαρότητα της ασθένειας (Woo et al., 2008; Yu et al., 2011). Η ένωση Bacilysin είναι ένα μη ριβοσωμικά συντιθέμενο διπεπτιδίο με υψηλή αντιμικροβιακή δράση εναντίον βακτηρίων, όπως το *Erwinia amylovora* και *Xanthomonas* spp. που προκαλούν σοβαρές ασθένειες (Chen et al., 2009b; Wu et al., 2015) και κατά της ζύμης *Candida albicans*. Το διπεπτιδίο αποτελείται από L-alanine στο N-τελικό άκρο και από ένα μη πρωτεϊνογόνο αμινοξύ, το L-anticapsin στο C-τελικό άκρο. Η ένωση αυτή φαίνεται να μεταφέρεται στα κύτταρα του μύκητα *C. albicans* όπου υδρολύεται και το αμινοξύ anticapsin παρεμποδίζει ένα ένζυμο που εμπλέκεται στη βιοσύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος (Wang et al., 2018). Στο εκχύλισμα των στελεχών Hil4 και Hir139 βρέθηκε η ένωση Dihydroanticapsin. Μετάλλαγμα του στελέχους *B. velezensis* FZB42 που δεν μπορούσε να βιοσυνθέσει Bacilysin έχασε την ικανότητα παρεμπόδισης φυτοπαθογόνων μυκήτων *Phytophthora* spp. (Han et al., 2021), ενώ φαίνεται να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο και στην επαγωγή της φυτικής άμυνας (Wu et al., 2018).

Στα γονιδιώματα των στελεχών Hil4, Hir139, Tel52 και Ter90 εντοπίστηκε η συστάδα βιοσυνθετικών γονιδίων της ένωσης Bacillaene, η οποία αποτελείται από συνθάσες πολυκετιδίων (PKS) καθώς και μία συνθετάση μη ριβοσωμικών πεπτιδίων (NRPS) (υβριδική) και αναφέρεται ως πολυκετιδίο ή υβριδική NRP-PK. Είναι ισχυρός παρεμποδιστής της προκαρυωτικής πρωτεϊνοσύνθεσης, υποδεικνύοντας ικανότητα ανταγωνισμού έναντι παθογόνων βακτηρίων, ενώ φαίνεται να προστατεύει το βακτήριο *B. subtilis* από τη θήρευση του *Mycococcus xanthus* (Chen et al., 2006; Müller et al., 2014; Wu et al., 2015). Τέλος, ανιχνεύθηκε και κατά την ανάλυση UHPLC-HRMS εκχυλίσματος του στελέχους Hil4, παρ'όλο που θεωρείται χημικά ασταθής ένωση η οποία αποδομείται γρήγορα κατά την έκθεση σε φως (Butcher et al., 2007). Έχει αναφερθεί πως φυτά *Eruca sativa* επάγουν την παραγωγή του αντιβιοτικού Bacillaene από το στέλεχος *B. subtilis* NCIB 3610 παρουσία παθογόνου βακτηρίου (Ogran et al., 2021).

Η συστάδα βιοσυνθετικών γονιδίων της ένωσης Subtilisin βρέθηκε μόνο στο γονιδίωμα των στελεχών Hil4 και Ter90. Η ένωση αυτή ανήκει στην ευρύτερη κατηγορία των πεπτιδίων ριβοσωμικής προέλευσης που υποβάλλονται σε μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις (Ribosomally Synthesized and post-translationally modified peptides-RiPPs) και συγκεκριμένα στην κλάση I των Bacteriocins. Αρχικά, είχε ταξινομηθεί στην κατηγορία των λανθιπεπτιδίων (lanthipeptides), ωστόσο οι θειοεστερικοί δεσμοί στο μόριο οδήγησαν στην κατηγοριοποίησή της στα Sactipeptides ή Sactibiotics (Gabrielsen et al., 2014; Perez et al., 2018). Η Subtilisin έχει αντιβακτηριακή δράση έναντι θετικών και αρνητικών κατά Gram βακτηρίων, ενώ τα στελέχη που παράγουν βακτηριοσίνες ερευνώνται για χρήση ως προβιοτικά σε ανθρώπους και ζώα (Babasaki et al., 1985; Thennarasu et al., 2005; Shelburne et al., 2007). Η συγκεκριμένη ένωση προκαλεί αποσταθεροποίηση της κυτταρικής μεμβράνης μέσω της αλληλεπίδρασης με τα λιπίδια και δημιουργεί πόρους μέσω εξειδικευμένων αλληλεπιδράσεων με την κυτταρική μεμβράνη (Thennarasu et al., 2005; Noll et al., 2011).

Οι συστάδες βιοσυνθετικών γονιδίων των ενώσεων Difficidin, Macrolactin H και Amylocyclicin βρέθηκαν μόνο στα γονιδιώματα των στελεχών Hir139 και Tel52. Η Difficidin ανήκει στα πολυκετίδια και φαίνεται να έχει αντιβακτηριακή δραστηριότητα έναντι ανθρωποπαθογόνων και φυτοπαθογόνων βακτηρίων (Chen et al., 2009b; Wu et al., 2015) μέσω παρεμπόδισης της πρωτεϊνοσύνθεσης (Zweerink & Edison, 1987). Το παράγωγο Oxydifficidin ανιχνεύθηκε στο εκχύλισμα των εκκρινόμενων και διαχεόμενων μεταβολιτών του στελέχους Hir139 και έχει δειχθεί πως έχει αντιβακτηριακή δράση (Wu et al., 2018; Caulier et al., 2019). Η Macrolactin H ταξινομείται στα πολυκετίδια και έχει αντιβακτηριακή δράση εναντίον φυτοπαθογόνων (Yuan et al., 2012). Οι ενώσεις Macrolactins και Difficidin θεωρούνται φυλογενετικοί δείκτες για το είδος *B. velezensis* (Schneider et al., 2007). Η Amylocyclicin έχει βρεθεί ως BGC ή παραγόμενη ένωση σε στελέχη *B. velezensis*, ανήκει στις ενώσεις Circular Bacteriocins και έχει αντιβακτηριακή δράση έναντι κοντινών φυλογενετικά στελεχών, όπως *B. subtilis*, αλλά και άλλων θετικών κατά Gram βακτηρίων (Scholz et al., 2014; Perez et al., 2018; Kurata et al., 2019; Rungsirivanich et al., 2021).

Η BGC της ένωσης Plantazolicin βρέθηκε στο γονιδίωμα του στελέχους Hir139 και όχι του Tel52, ενώ της ένωσης Mersacidin βρέθηκε στο γονιδίωμα του στελέχους Tel52 και όχι του Hir139. Και οι δύο ενώσεις ανήκουν στη γενικότερη ομάδα των RiPPs και συγκεκριμένα στην οικογένεια των Bacteriocins. Η Plantazolicin ανήκει στην κατηγορία των Microcins και συγκεκριμένα στην ομάδα TOMM/LAP, έχει ανταγωνιστική δράση προς βακτήρια θετικά κατά Gram, κυρίως του *B. cereus* group, καθώς και νηματώδεις (Scholz et al., 2011; Liu et al., 2013; Molohon et al., 2016). Η Mersacidin έχει ταξινομηθεί στην κλάση I των Bacteriocins και συγκεκριμένα στην κατηγορία των Lanthipeptides (Acedo et al., 2018; Rungsirivanich et al., 2021) και έχει παρεμποδιστική δράση στη σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος βακτηρίων μέσω εμπλοκής στο βιοσυνθετικό μονοπάτι των μορίων πεπτιδογλυκάνης (Brötz et al., 1998). Στη μελέτη των Wang J. και συνεργατών (2019) αναφέρθηκε πως κάποιες BGCs υπάρχουν σε πολλά στελέχη *B. velezensis*, ενώ κάποιες άλλες είναι συντηρημένες σε διαφορετικά στελέχη κι έτσι τα στελέχη *B. velezensis* χωρίζονται σε 2 υποτύπους ανάλογα με τα BGCs που κατέχουν.

Στο γονιδίωμα του στελέχους Tel34, ανιχνεύθηκαν δύο συστάδες γονιδίων που αφορούν τη βιοσύνθεση Circular Bacteriocins, οι οποίες γενικά εμφανίζουν αντιβακτηριακή δράση (Acedo et al., 2018). Η μία από αυτές φαίνεται να είναι η ένωση Safencin, αν και διαφέρει σε ένα αμινοξύ από την πρώτη ένωση Safencin που χαρακτηρίστηκε από το στέλεχος *B. safensis* C3. Οι Safencins του είδους *B. safensis* και οι παρόμοιες Pumilarins του είδους *B. pumilus* φαίνεται να παρουσιάζουν αμινοξική και δομική ομοιότητα με την καλά χαρακτηρισμένη ένωση Enterocin AS-48 του είδους *Enterococcus faecalis* (Fields et al., 2018; Romero-Severson et al., 2021).

Μέσα από αυτή την ανάλυση έγινε ξεκάθαρο πως κάποιες συστάδες γονιδίων είναι ειδο-εξαρτώμενες ή βρίσκονται μόνο σε στελέχη πολύ κοντινά φυλογενετικά, όπως είναι η BGC της Subtilosin (Hil4 και Ter90), οι BGC των Macrolactin, Difficidin, Amylocyclicin (Hir139 και Tel52), ενώ κάποιες άλλες εξαρτώνται από το στέλεχος όπως οι BGC των Plantazolicin (Hir139) και

Mersacidin (Tel52). Αυτό το φαινόμενο αναφέρεται και σε άλλες μελέτες για τις συγκεκριμένες συστάδες (Wang J. et al., 2019; Wu X. et al., 2021). Ακόμη, φαίνεται πως τα στελέχη Tel52 και Hir139 είναι εξοπλισμένα με μεγαλύτερο δυναμικό αντιμυκητιακών και αντιβακτηριακών ενώσεων σε σχέση με τα υπόλοιπα στελέχη, ενώ όλα τα στελέχη κατέχουν γονίδια βιοσύνθεσης νέων άγνωστων αντιμικροβιακών ενώσεων. Είναι πολύ σημαντικό το ότι μεταβολίτες παράγονται συνεχώς και όχι μόνο παρουσία του φυτοπαθογόνου μύκητα, ενώ έχει αναφερθεί πως παρουσία του φυτοπαθογόνου μπορεί να παράγονται μεγαλύτερες ποσότητες (Li et al., 2014; Cawoy et al., 2015; Zihahirwa Kulimushi et al., 2017).

Στα εκχυλίσματα των εκκρινόμενων και διαχεόμενων μεταβολιτών από τα Hir4 και Hir139 ανιχνεύθηκε επιπλέον η ένωση Azelaic acid. Αυτός ο μεταβολίτης έχει ανιχνευθεί στα σιτηρά, σίκαλη και κριθάρι (Khakimov et al., 2014) και έχει προταθεί πως κινείται διασυστηματικά συνεισφέροντας στην επαγωγή της SAR σε φυτά *A. thaliana* (Cecchini et al., 2015, 2019). Ακόμη, βακτήρια γαλακτικού οξέος το παράγουν και δείχνει αντιμικροβιακή δράση έναντι ανθρωποπαθογόνων του δέρματος και όχι μόνο (Lay et al., 2016; Siedler et al., 2019). Πρόσφατα βρέθηκε πως το υπερκείμενο στελέχους *Pseudomonas syringae* περιέχει Azelaic acid υποδεικνύοντας ότι διαδραματίζει κάποιο ρόλο στην επικοινωνία φυτών-βακτηρίων (Janvadi et al., 2018). Η πρώτη αναφορά για την παραγωγή αυτής της ένωσης από στελέχη του γένους *Bacillus* έγινε από τους Nifakos και συνεργάτες (2021), όπου μελετήθηκαν οι εκκρινόμενοι και διαχεόμενοι μεταβολίτες του στελέχους *B. velezensis* Bvel1, ενώ έχει αναφερθεί και στο στέλεχος *B. halotolerans* Cal.1.30 (Tsalgatidou et al., 2022).

Η μεταφορά BGCs που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση δευτερογενών αντιμικροβιακών μεταβολιτών μεταξύ στελεχών του ίδιου είδους ή μεταξύ κοντινών ειδών του γένους *Bacillus* μέσω οριζόντιας γενετικής μεταφοράς (Horizontal Gene Transfer, HGT) έχει αναφερθεί συνοπτικά σε κάποιες μελέτες. Οι παρατηρήσεις που οδήγησαν σε αυτό το συμπέρασμα ήταν οι παρόμοιες πλευρικές περιοχές (flanking regions) της BGC μεταξύ δύο στελεχών διαφορετικών ειδών υποδεικνύοντας την πιθανότητα ανασυνδυασμού, καθώς και η παρουσία συγκεκριμένων BGC σε κάποια στελέχη του είδους και όχι σε άλλα (Luo et al., 2015a; Wang J. et al., 2019; Reva et al., 2020). Οι Dunlap και συνεργάτες (2019) παρατήρησαν πως οι BGC που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση των διάφορων ισομορφών των λιποπεπτιδίων της οικογένειας Iturins σε στελέχη *B. velezensis* έχουν συντηρημένη γονιδιακή οργάνωση και χρωμοσωμική θέση, υποδεικνύοντας HGT λειτουργικών modules ή όλου του BGC. Η HGT αναγνωρίζεται γενικά ως κινητήρια δύναμη στην εξέλιξη των βακτηρίων και η απόκτηση μιας συστάδας γονιδίων βιοσύνθεσης κάποιου ιδιαίτερου δευτερογενή μεταβολίτη μπορεί να είναι επωφελής καθώς μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα πιο αποτελεσματικό πολλαπλασιασμό, προστασία από άλλους οργανισμούς ή πρόσβαση σε πόρους που δεν έχουν άλλα στελέχη (Medema et al., 2021). Στη διεθνή βιβλιογραφία υπάρχουν ενδείξεις και αναφορές για μεταφορά συστάδων γονιδίων μεταξύ βακτηρίων, κυρίως ακτινοβακτηρίων, ωστόσο η συχνότητα του γεγονότος και οι μηχανισμοί παραμένουν άγνωστοι (Medema et al., 2014; Ziemert et al., 2014; Letzel et al., 2017).

Η συγκεκριμένη μελέτη αποτελεί μια περισσότερο αναλυτική προσέγγιση αυτού του φαινομένου. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης συνταινίας (synteny) καθώς και νουκλεοτιδικής και αμινοξικής ομολογίας μεταξύ στελεχών *B. halotolerans* που διαθέτουν την BGC της ένωσης Mojavensin και αυτών που δεν τη διαθέτουν υποδεικνύουν πως η BGC εισέρχεται σε συγκεκριμένο σημείο του γονιδιώματος, το οποίο φαίνεται να αποτελεί «hot spot». Κάτι παρόμοιο, παρατηρείται και στη μελέτη του Dunlap και συνεργατών (2019) για τις συστάδες των Iturins, αν και δεν έχουν συμπεριλάβει τη Mojavensin στις αναλύσεις τους. Γενικά τα αποκτώμενα μέσω HGT τμήματα τείνουν να είναι ομαδοποιημένα σε σημεία που είναι hotspots για την ενσωμάτωση νέου γενετικού υλικού (Slomka et al., 2020). Ακόμη, οι αναλύσεις της συγκεκριμένης διατριβής υποδεικνύουν πως έχει πραγματοποιηθεί HGT της Mojavensin BGC μεταξύ στελεχών *B. halotolerans* και *B. cabrialesii*, καθώς υπάρχει μεγάλο ποσοστό ομολογίας αυτής της BGC, σε αντίθεση με τις πλευρικές περιοχές και τη διπλανή συστάδα της Fengycin, ενώ αυτά τα δύο είδη έχουν μεγάλη φυλογενετική απόσταση. Το ίδιο έχει παρατηρηθεί και στο στέλεχος *B. halotolerans* Cal.1.30 (Tsalgatidou et al., 2022).

Ακόμη, στο γονιδίωμα του στελέχους Hil4 βρέθηκε μία περιοχή που εμφάνισε υψηλή ομολογία γονιδίων (69%) με μία περιοχή του βακτηρίου *B. velezensis* SQR9, ενώ οι περιεχόμενες συστάδες γονιδίων που αναγνωρίστηκαν είχαν υψηλή νουκλεοτιδική ομολογία (97.7%) μεταξύ των δύο στελεχών. Η εν λόγω συστάδα στο στέλεχος SQR9 είναι υπεύθυνη για τη βιοσύνθεση των Bacillunoic acids, λιπαρών οξέων με αντιβακτηριακή δράση έναντι στελεχών *B. cereus*, *B. licheniformis*, *B. subtilis*, *Staphylococcus aureus*, και επίδειξη ισχυρότερης δράσης έναντι κοντινών φυλογενετικά βακτηρίων, όπως του είδους *B. velezensis* (Wang D. et al., 2019). Ακόμη, αυτή η συστάδα φαίνεται να λείπει από τα δημοσιευμένα γονιδιώματα άλλων στελεχών *B. halotolerans* που σχετίζονται με τα φυτά (Gold et al., 2014; Heo et al., 2019; Slama et al., 2019). Η πιθανή ανταλλαγή αυτής της BGC μεταξύ στελεχών του *B. velezensis* έχει αναφερθεί από τους Wang D. και συνεργάτες (2019), με την ευρύτερη περιοχή να περιγράφεται ως «σημείο hot-spot για την απόκτηση γονιδίων μέσω οριζόντιας μεταφοράς», καθώς όλα τα στελέχη είχαν συστάδες βιοσύνθεσης δευτερογενών μεταβολιτών ίδιες ή διαφορετικές από το στέλεχος SQR9. Έτσι, είναι πιθανόν αυτή η συστάδα να προήλθε από οριζόντια μεταφορά γονιδίων (HGT) μεταξύ των ειδών *B. halotolerans* και *B. velezensis*. Ωστόσο, παρόμοια συστάδα δε βρέθηκε στο γονιδίωμα των στελεχών Hir139 και Te52, παρ'όλο που ανήκουν στο είδος *B. velezensis*.

Επιπρόσθετη ανάλυση του γονιδιώματος για εύρεση γονιδίων που πιθανώς εμπλέκονται στην προώθηση της ανάπτυξης των φυτών αποκάλυψε γονίδια που εμπλέκονται στην κινητικότητα, σχηματισμό βιοϋμενίου και τη βιοσύνθεση ρυθμιστών της ανάπτυξης, καθώς και γονίδια που κωδικοποιούν για λυτικά ένζυμα που βοηθούν στον ενδοφυτικό αποικισμό και την παρεμπόδιση φυτοπαθογόνων. Για παράδειγμα, οι πρωτεΐνες FliD και YhaN διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στον αποικισμό της ριζόσφαιρας και την προσκόλληση του *B. velezensis* SQR9 στη ριζική επιφάνεια (Huang et al., 2021). Ισχυρή κινητικότητα, σχηματισμός βιοϋμενίου, παραγωγή ενώσεων που περιέχουν ινδόλιο, παραγωγή ακετοΐνης και έκκριση χιτινασών είναι κάποια από τα χαρακτηριστικά

που ανιχνεύθηκαν και στις *in vitro* βιοχημικές δοκιμές. Πρωτεάση, γλουκανάση και σιδηροφόρες ενώσεις έχουν ανιχνευθεί στη ριζόσφαιρα φυτών ρυζιού μετά από αποικισμό στελεχών *Bacillus* spp. (Rais et al., 2017), υποδεικνύοντας πως αυτά τα προϊόντα μπορούν να εκκριθούν και να δράσουν στο περιβάλλον. Η δράση της χιτοζανάσης μπορεί να βοηθήσει στην άμεση αντιμετώπιση των μυκήτων (Seo et al., 2014) αλλά και στην έμμεση, καθώς τα τμήματα χιτοζάνης (chitosan) που απελευθερώνονται ενεργοποιούν τη φυτική άμυνα τοπικά και διασυστηματικά (Malerba & Cerana, 2016). Το μονοξείδιο του αζώτου (Nitric oxide, NO), ένωση της οποίας τα βιοσυνθετικά γονίδια βρέθηκαν στα γονιδιώματα των στελεχών, είναι ένα βασικό σηματοδοτικό μόριο που εμπλέκεται σε διάφορες αναπτυξιακές διεργασίες των φυτών, αποκρίσεις σε καταπόνηση και επαγωγή της φυτικής άμυνας και φαίνεται πως η παραγωγή του από βακτήρια έχει φυτοδιεγερτική δράση (Creus et al., 2005; Molina-Favero et al., 2008; Sami et al., 2018; Vacheron et al., 2018; Pande et al., 2021). Η πρωτεΐνη YxaL που εκκρίνεται από βακτηριακά στελέχη φαίνεται να επηρεάζει θετικά τις ρίζες (Kim et al., 2019). Ακόμη μία ένωση της οποίας τα βιοσυνθετικά γονίδια ανιχνεύθηκαν, η τρεχαλόζη, φαίνεται να προστατεύει τα φυτά υπό συνθήκες καταπόνησης (Orozco-Mosqueda et al., 2019) και να επάγει τη φυτική άμυνα (De Britto et al., 2021). Η ένωση σπερμιδίνη που παράγεται από PGPB αναγνωρίζεται από τα φυτά και μπορεί να προάγει την ανάπτυξη τους (Xie et al., 2014). Άλλο ένα σημαντικό γονίδιο είναι αυτό που πιθανώς κωδικοποιεί για πιθανή λακτονάση, ένζυμο που έχει δράση quorum-quenching, δηλαδή απενεργοποιεί τα μόρια ακυλ-ομοσερίνη λακτόνες (AHLs) που εμπλέκονται στην αίσθηση πυκνότητας πληθυσμού (quorum sensing) των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων περιορίζοντας, έτσι, τη φυτοπαθογόνο δράση τους (Hanano et al., 2014).

5.5 Επιλογή συνδυασμών στελεχών για δοκιμή μιγμάτων

Τα τελευταία χρόνια η έρευνα έχει αρχίσει να στρέφεται προς την χρήση μίγματος διαφορετικών στελεχών, αντί για την αναζήτηση ενός στελέχους που θα διαθέτει όλα τα επιθυμητά χαρακτηριστικά, καθώς εικάζεται πως δύο ή περισσότερα βακτήρια με επιθυμητά χαρακτηριστικά σε ένα μίγμα θα έχουν συνεργιστική ή προσθετική δράση (Compant et al., 2019; Santoyo et al., 2021). Σε αρκετές μελέτες η χρήση μιγμάτων οδηγεί σε αυξημένη προώθηση της ανάπτυξης των φυτών (Castanheira et al., 2016; Molina-Romero et al., 2017) ή βιολογικής αντιμετώπισης (Palmieri et al., 2016; Liu K. et al., 2018), αλλά και σε αυξημένο θρεπτικό και αντιοξειδωτικό δυναμικό του φυτού (Jain et al., 2014). Την τελευταία δεκαετία υπάρχει πολύ μεγαλύτερο ενδιαφέρον για την ανάπτυξη μιγμάτων βακτηρίων ή μιγμάτων βακτηρίων-μυκήτων που θα είναι περισσότερο αποτελεσματικά από τους μεμονωμένους μικροοργανισμούς (Thomloundi et al., 2019). Μέχρι στιγμής υπάρχουν αρκετές μελέτες για συνδυασμό στελεχών *Bacillus* spp. με στελέχη *Pseudomonas* spp., *Azospirillum* spp., *Trichoderma* spp., όπως και για βακτηριακά στελέχη *Pseudomonas* spp. με *Azospirillum* spp., ωστόσο, δεν υπάρχουν πολλές μελέτες για το συνδυασμό στελεχών *Bacillus* spp.

Έχει προταθεί πως η συμβατότητα των βακτηριακών στελεχών διαδραματίζει κύριο ρόλο στην επιτυχία ενός μίγματος (Thomloundi et al., 2019; Niu et al., 2020). Οι μελέτες συμβατότητας πραγματοποιούνται συνήθως μόνο σε *in vitro* συνθήκες σε στερεό θρεπτικό μέσο και περιλαμβάνουν διάφορες τεχνικές που δίνουν ασαφή αποτελέσματα κάποιες φορές, δυσκολεύοντας τον προσδιορισμό του αν είναι όντως συμβατά ή όχι τα στελέχη σε *in vitro* συνθήκες. Έχουν αναφερθεί μελέτες όπου τα αποτελέσματα συμβατότητας *in vitro* αντικατοπτρίζονται και σε συνθήκες *in planta*, αλλά έχει αναφερθεί και το αντίθετο φαινόμενο (Stockwell et al., 2011; Becker et al., 2012; Stefanic et al., 2015; Molina-Romero et al., 2017; Castanheira et al., 2017). Έχει διατυπωθεί η υπόθεση ότι ο ανταγωνισμός μεταξύ των στελεχών μπορεί είτε να ενισχύσει τα χαρακτηριστικά που έχουν σχέση με τη βιολογική αντιμετώπιση φυτοπαθογόνων μικροοργανισμών, είτε να οδηγήσει σε μείωση πληθυσμών και κατ' επέκταση της αποτελεσματικότητας (Thomloundi et al., 2019). Ακόμη, η απουσία *in vitro* συμβατότητας μπορεί να μη σχετίζεται με το αποτέλεσμα της δράσης των μικροβίων στους φυτικούς ιστούς ή τη ριζόσφαιρα καθώς μπορεί να αποικίζουν διαφορετικά σημεία και να μην έρχονται σε επαφή ώστε να επηρεάζεται η ανάπτυξή τους (Pliego et al., 2008). Σε άλλη περίπτωση, στελέχη μπορεί να δείχνουν συμβατότητα σε *in vitro* συνθήκες αλλά να είναι μη συμβατά καθώς το ένα μπορεί να παρεμποδίζει το μηχανισμό δράσης του άλλου (Stockwell et al., 2011). Τέλος, έχει αναφερθεί πως ο ανταγωνισμός μεταξύ των μελών ενός μίγματος εμφανίζεται όταν αυτά χρειάζονται την ίδια πηγή, είτε θρεπτικών, είτε νερού, είτε χώρου, με πιθανό αποτέλεσμα το στέλεχος που μεγαλώνει γρηγορότερα να υπερισχύσει στην πάροδο του χρόνου (Santoyo et al., 2021).

Κάποιες από τις πιο χρησιμοποιούμενες τεχνικές διερεύνησης της συμβατότητας *in vitro* είναι οι agar diffusion, cross streak και soft agar overlay (Kumar et al., 2016b; Molina-Romero et al., 2017; Marian et al., 2018; Kumawat et al., 2019). Έτσι, η μία τεχνική που χρησιμοποιήθηκε στη συγκεκριμένη μελέτη ήταν η soft agar overlay. Επίσης, χρησιμοποιήθηκε η τεχνική swarm boundary assay, η οποία όπως έχει αναφερθεί παραπάνω, χρησιμεύει στο χαρακτηρισμό ζευγών βακτηριακών στελεχών ως kin και non kin, ωστόσο δεν παύει να είναι μια μέθοδος που χαρακτηρίζει την ανταγωνιστικότητα των στελεχών που ερευνώνται. Μάλιστα, non kin ζεύγη στελεχών φαίνεται να μην μπορούν να συνυπάρξουν σε ρίζες φυτών *Arabidopsis*, καθώς το ένα από τα δύο στελέχη υπόκειται σε αποκλεισμό από το βιοϋμένιο στη ρίζα, με το κυρίαρχο στέλεχος να διαφέρει από επανάληψη σε επανάληψη σε μερικούς συνδυασμούς υποδεικνύοντας ένα βαθμό τυχαιότητας (Stefanic et al., 2015). Ανταγωνισμός non kin ζευγών με αποκλεισμό του ενός στελέχους από επιφάνειες έχει αναφερθεί και στην μελέτη των Kraigher και συνεργατών (2020). Συνδυασμοί στελεχών *Pseudomonas* spp. που είναι λιγότερο ανταγωνιστικά μεταξύ τους με βάση *in vitro* τεχνικές, όπως την soft agar overlay, μπορούν καλύτερα να αποικίσουν, αλλά και να προστατεύσουν τη ρίζα τριφυλλιού από το παθογόνο *Pythium ultimum* (Becker et al., 2012). Στη συγκεκριμένη μελέτη πραγματοποιήθηκε εκτενής δοκιμή αλληλεπιδράσεων στελεχών από πολλά είδη *Bacillus* sp. με δύο τεχνικές σε *in vitro* συνθήκες, επεκτείνοντας τις γνώσεις γύρω από αυτό το φαινόμενο και τη σύνδεσή του με τη σχέση αποικισμού kin και non kin ζευγών.

Τα γενώματα των *B. subtilis* περιέχουν αφθονία γενετικών τόπων που εμπλέκονται στο KD (Kin discrimination loci, KDL), οι οποίοι συνεισφέρουν με συνδυαστικό τρόπο στην διακυτταρική επίθεση και άμυνα και έτσι ο συνδυασμός γονιδίων που υπάρχει σε δύο στελέχη ή αλλοτύπους καθορίζει την ανταγωνιστικότητά τους (Lyons et al., 2016). Εμπλέκονται πληθώρα πρωτεϊνών παρεμπόδισης εξαρτώμενης από την επαφή που βρίσκονται στην επιφάνεια των κυττάρων (contact-dependent inhibition proteins, CDI proteins), εκκρινόμενων αντιμικροβιακών ενώσεων και πρωτεϊνών ανοσίας ώστε να εξασφαλιστεί ότι μη συγγενικά κύτταρα δε θα αλληλεπιδράσουν στο πλαίσιο πολυκύτταρων διεργασιών όπως είναι η κίνηση swarming και ο σχηματισμός βιοϋμενίου (Stefanic et al., 2015; Lyons et al., 2016; Garcia, 2018). Στο βακτήριο *Escherichia coli* έχει βρεθεί πως η παρουσία ενός βακτηριοφάγου είναι ένας από τους τρόπους αναγνώρισης του μηχανισμού KD (Song et al., 2019). Κάποια από τα γονίδια που έχουν ανιχνευθεί είναι το σύστημα CDI WapA/I, γονίδια που εμπλέκονται στην παραγωγή τοξινών και την ανθεκτικότητα (*sdpABCIR*, *sdpIRs*, *skfA-H*) και γονίδια που τροποποιούν τη δομή του κυτταρικού τοιχώματος (*lytC*, *dltA*, *tauD*) (Lyons et al., 2016; Stempler et al., 2017; Garcia, 2018). Άμεση συσχέτιση με την ομοιότητα BGCs των στελεχών του είδους *B. subtilis* δε φαίνεται να υπάρχει, καθώς σε κάποιες περιπτώσεις στελέχη με όμοια BGCs έδειξαν ανταγωνισμό (Kiesewalter et al., 2021).

Στη συγκεκριμένη μελέτη, το μόνο ζεύγος βακτηριακών στελεχών όπου κατά την αλληλεπίδρασή του δε σχηματίστηκε DL ήταν το Tel34-Ter90. Στη μελέτη των Lyons και Kolter (2017) παρατηρήθηκε πως ο κλάδος *B. pumilus* αποτελεί το φυλογενετικό όριο όπου εφαρμόζεται αναγνώριση non kin από το είδος *B. subtilis*. Σε όλες τις υπόλοιπες αλληλεπιδράσεις σχηματίστηκε DL με διαφορές στο μέγεθος και την ένταση της διαφάνειας, καθώς και μεταβολή των χαρακτηριστικών αυτών με το πέρας των ημερών, φαινόμενο πιθανώς συσχετισμένο με το βαθμό ανταγωνισμού μεταξύ των στελεχών. Παραλλαγές του μεγέθους και της διαφάνειας των DLs έχουν παρατηρηθεί και στη μελέτη των Lyons και συνεργατών (2016).

Τα 5 επιλεγμένα στελέχη θα μπορούσαν να σχηματίσουν ζεύγη με πολλούς διαφορετικούς συνδυασμούς εξετάζοντας διάφορες προσεγγίσεις. Στη συγκεκριμένη διατριβή, δοκιμάστηκαν 3 μίγματα αποτελούμενα από βακτήρια που έχουν συμπληρωματικές λειτουργίες όσον αφορά τις ιδιότητές τους, ενώ επιλέχθηκαν όλοι οι πιθανοί τύποι συμβατότητας. Έτσι, δοκιμάστηκε το ζεύγος στελεχών Hil4-Tel52 που είχαν αμοιβαία χαμηλή ανταγωνιστικότητα *in vitro*, το ζεύγος στελεχών Tel34-Ter90 που δεν εμφάνισαν ανταγωνιστικότητα *in vitro* καθώς και το ζεύγος στελεχών Tel34-Hir139 από τα οποία το Hir139 επιδεικνύει μονόπλευρη ανταγωνιστικότητα έναντι του Tel34 στις *in vitro* δοκιμές.

5.6 Το στέλεχος Ter90 και το μίγμα Hil4-Tel52 είχαν ωφέλιμη επίδραση σε φυτά τομάτας

Η τομάτα είναι το δεύτερο περισσότερο καλλιεργούμενο λαχανικό σε όλο τον κόσμο, μετά την πατάτα, καθώς έχει υψηλή διατροφική αξία περιέχοντας βιταμίνες, αντιοξειδωτικά, λυκοπένιο και β-καροτένιο (Frusciante et al., 2007; Martí et al., 2016; Quinet et al., 2019). Ανήκει στην οικογένεια *Solanaceae* που περιέχει κι άλλα σημαντικά καλλιεργούμενα φυτά, όπως η πατάτα (*Solanum tuberosum*) και η πιπεριά (*Capsicum annuum*), κάνοντας αυτή την οικογένεια μία από τις πιο πολύτιμες των καλλιεργειών καρπών και λαχανικών.

Για τη δοκιμή των βακτηριακών στελεχών σε φυτά *S. lycopersicum* var. Chondrokatsari Messinias σε συνθήκες θερμοκηπίου πραγματοποιήθηκε εφαρμογή μεμονωμένων και μιγμάτων εναιωρημάτων κυττάρων στο σπόρο (βιοδιέγερση σπόρων). Στη συνέχεια, 15 και 30 ημέρες μετά τη φύτευση πραγματοποιήθηκαν ριζοποτίσματα με τα βακτηριακά εμβόλια, ενώ στις 44 ημέρες μετρήθηκαν τα νωπό και ξηρό βάρος υπόγειου τμήματος, νωπό και ξηρό βάρος υπέργειου τμήματος και μήκος βλαστού. Η βιβλιογραφία υποστηρίζει τη χρήση της μεθόδου βιοδιέγερσης του σπόρου ως έναν τρόπο να εισαχθούν τα επιθυμητά βακτηριακά στελέχη σε πρώιμο αναπτυξιακό στάδιο του φυτού, τα οποία μπορούν να έχουν ωφέλιμη δράση ακόμα και σε μικρή συγκέντρωση, ενώ φαίνεται να βοηθούν και στην καταπολέμηση ασθενειών στο στάδιο του σπόρου (Correa et al., 2009; O'Callaghan et al., 2016; Hashmi et al., 2019). Ακόμα, μία μελέτη σε διάφορα φυτά και με διάφορους τρόπους εφαρμογής έδειξε πως ο συνδυασμός εφαρμογής των βακτηρίων στο σπόρο και μεταγενέστερο ριζοπότισμα έδωσε το καλύτερο αποτέλεσμα βιολογικής αντιμετώπισης της φουζαρίωσης σε φυτά σόγιας, καλαμποκιού και σιταριού (Parikh & Adesemoye, 2018).

Η κίνηση swarming φαίνεται να διαδραματίζει το βασικό ρόλο στην προσέγγιση ρίζας τομάτας από το στέλεχος *B. subtilis* SWR01 (Gao et al., 2016), ενώ ο σχηματισμός βιοϋμενίου είναι καθοριστικός παράγοντας για τον αποικισμό ριζόσφαιρας τομάτας από το στέλεχος *B. velezensis* FZB42 (Al-Ali et al., 2018). Τα επιλεγμένα βακτηριακά στελέχη ήταν ικανά να αποικίζουν τις ρίζες φυτών *A. thaliana* και τις ρίζες του φυτού *S. lycopersicum* var. Chondrokatsari Messinias *in vitro*, αλλά και τη ριζόσφαιρα των φυτών ντομάτας σε συνθήκες θερμοκηπίου, γεγονότα που συνδέονται με τα θετικά αποτελέσματα των *in vitro* δοκιμών για ικανότητα ομαδικής και κολυμβητικής κίνησης, αλλά και την ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου. Ωστόσο, παρατηρήθηκαν διαφορές μεταξύ των στελεχών στην ικανότητα αποικισμού, γεγονός που έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία για διαφοροποιήσεις ανάλογα με το είδος ή και το στέλεχος (Calvo-Garrido et al., 2018).

Έχουν αναφερθεί ενδοφυτικά και ριζοσφαιρικά στελέχη των ειδών *B. subtilis*, *B. pumilus*, *B. velezensis* που είχαν θετικό αντίκτυπο στην ανάπτυξη τομάτας, αυξάνοντας το βάρος υπέργειου και υπόγειου τμήματος, το ύψος, καθώς και τον αριθμό φύλλων και καρπών σε εφαρμογές στο θερμοκήπιο υπό κανονικές συνθήκες (Huang et al., 2015; Khan et al., 2016; Qiao et al., 2017; Abdallah et al., 2018; Franco-Sierra et al., 2020; Torres et al., 2020), συνθήκες έλλειψης θρεπτικών

(Huang et al., 2015) αλλά και μέσω πτητικών ενώσεων (Tahir et al., 2017). Εμβολιασμός φυτών τομάτας με το στέλεχος *B. velezensis* 83 είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της παραγωγής κατά περίπου 70 τόνους/εκτάριο και 10% αύξηση στον αριθμό των καρπών με υψηλό βάρος (Balderas-Ruiz et al., 2021). Το στέλεχος *B. velezensis* C2 βελτίωσε την ανάπτυξη φυτών τομάτας λόγω αύξησης του ύψους του βλαστού και αριθμού των φύλλων (Dhouib et al., 2019).

Στη συγκεκριμένη μελέτη, υψηλότερες τιμές από το μάρτυρα στα περισσότερα από τα μετρούμενα χαρακτηριστικά, με στατιστικά σημαντική διαφορά, εμφάνισε σταθερά η μεταχείριση του στελέχους Ter90 ακολουθούμενη από τη μεταχείριση του μίγματος Hil4-Tel52. Το στέλεχος Ter90 φάνηκε να έχει τον καλύτερο αποικισμό από όλα τα στελέχη, αν και χωρίς στατιστικά σημαντική διαφορά από το Hir139, γεγονός που υποδεικνύει ότι ο αποικισμός ίσως είχε θετική σχέση με την προώθηση της ανάπτυξης. Θετική συσχέτιση αποικισμού και ωφέλιμης δράσης έχει αναφερθεί και στη μελέτη των Myresiotis και συνεργατών (2011). Η μεταχείριση του μίγματος Hil4-Tel52 ήταν παρόμοια ή καλύτερη από τις μεταχειρίσεις των μεμονωμένων στελεχών που απαρτίζουν το μίγμα, οι οποίες εμφάνισαν παρόμοιες τιμές με το μάρτυρα. Στο πείραμα αποικισμού η συγκέντρωση και των δύο αυξήθηκε όταν βρέθηκαν σε μίγμα, διατηρώντας αναλογία περίπου 1:1, υποδεικνύοντας πως η αύξηση του πληθυσμού και ο καλύτερος αποικισμός της ριζόσφαιρας είχε άμεση σχέση με την αύξηση των φυτικών χαρακτηριστικών.

Παρ'όλο που ο εμβολιασμός του στελέχους Ter90 είχε ως αποτέλεσμα τη μεγαλύτερη προώθηση της ανάπτυξης συγκριτικά με όλες τις μεταχειρίσεις, η μεταχείριση του μίγματος Tel34-Ter90 είχε παρόμοιες ή υψηλότερες τιμές από τη μεταχείριση Tel34 και μικρότερες από τη μεταχείριση Ter90, γεγονός που ίσως μπορεί να εξηγηθεί από τη μείωση του πληθυσμού του στελέχους Ter90 στο μίγμα σε σύγκριση με το μεμονωμένο εμβολιασμό. Η μεταχείριση Tel34-Hir139 δεν είχε στατιστικά σημαντικές διαφορές από τις μεταχειρίσεις των μεμονωμένων στελεχών Tel34 και Hir139, οι οποίες ήταν παρόμοιες με του μάρτυρα. Ο πληθυσμός του στελέχους Hir139 μειώθηκε στο μίγμα, υποδεικνύοντας ανταγωνισμό μεταξύ των στελεχών. Ο ανταγωνισμός αυτός δε φάνηκε να επηρεάζει την απόδοση προς τα πάνω ή προς τα κάτω, κάτι σχετικά αναμενόμενο καθώς και τα δύο στελέχη είχαν παρόμοια απόδοση ως μεμονωμένα εμβόλια.

Ενδιαφέρον θα ήταν να διαπιστωθεί σε μελλοντικό πείραμα εάν η αύξηση του μήκους του βλαστού οφείλεται σε απλή επιμήκυνση του στελέχους ή σε αύξηση του ρυθμού ανάπτυξης του φυτού και πρωίμηση της παραγωγής, γεγονός το οποίο δεν ήταν δυνατό να εξακριβωθεί στο χρονικό διάστημα του συγκεκριμένου πειράματος. Στη μελέτη των Rourin και συνεργατών (2013), ένα PGPB στέλεχος φάνηκε να επηρεάζει τον κύκλο ζωής του φυτού *A. thaliana* Col-0 σε υπόστρωμα τύρφης/βερμικουλλίτη, επιταχύνοντας το ρυθμό ανάπτυξής του και μειώνοντας σε χρόνο τη βλαστική του περίοδο. Σε άλλη μελέτη ο εμβολιασμός φυτού τομάτας με PGPB προκάλεσε αύξηση του ύψους του φυτού σε πρώιμο στάδιο της φυτικής ανάπτυξης (33 μέρες), ενώ προκάλεσε αύξηση της φυλλικής επιφάνειας σε μεταγενέστερο στάδιο (57 ημέρες) (Lin et al., 2019), υποδεικνύοντας πως η κάθε ωφέλιμη δράση μπορεί να φαίνεται σε διαφορετικό στάδιο.

Το φαινόμενο ένα μίγμα να έχει ίδια ή χειρότερη δράση από τα μεμονωμένα στελέχη που το απαρτίζουν έχει παρατηρηθεί και σε άλλες μελέτες. Για παράδειγμα, τα ενδοφυτικά βακτηριακά στελέχη *B. velezensis* GL3, *B. atrophaeus* GMC1 και *B. megaterium* GS2 εφαρμόστηκαν ως μονά και ως μίγμα σε σπόρους τομάτας και με μεταγενέστερα ριζοποτίσματα και στις 6 εβδομάδες οι μεταχειρίσεις του *B. velezensis* GL3 και του μίγματος είχαν τις υψηλότερες τιμές, χωρίς ιδιαίτερη διαφορά μεταξύ τους (Agarwal et al., 2020). Στη μελέτη των Myresiotis και συνεργατών (2011) τα στελέχη *B. subtilis* GB03, *B. subtilis* FZB24, *B. amyloliquefaciens* IN937a και *B. pumilus* SE34 εφαρμόστηκαν ως μεμονωμένες μεταχειρίσεις και ως μίγμα σε φυτά τομάτας, όπου υψηλότερη προώθηση της ανάπτυξης παρατηρήθηκε από το στέλεχος *B. pumilus* SE34 ακολουθούμενο από το *B. subtilis* GB03, με το μίγμα να έχει τη μικρότερη ωφέλιμη δράση.

Μελλοντικά, θα ήταν χρήσιμο να δοκιμαστούν κάποια στελέχη και μίγματα και σε άλλα φυτά, καθώς φαίνεται πως κάποια βακτήρια είναι αποτελεσματικά στην προώθηση της ανάπτυξης ενός φυτού, αλλά όχι κάποιου άλλου. Για παράδειγμα, η εφαρμογή του βακτηριακού στελέχους *B. velezensis* BAC03 επέφερε διαφορετικό βαθμό αύξησης των φυτικών χαρακτηριστικών συγκριτικά με το μάρτυρα σε 9 διαφορετικά φυτικά είδη (Meng et al., 2016). Επίσης, πολλά στελέχη ή και μίγματα έχουν επιφέρει θετικά αποτελέσματα μόνο σε συνθήκες αβιοτικού στρες για το φυτό, όπως η ξηρασία και η έλλειψη θρεπτικών (Schütz et al., 2018; Bradáčová et al., 2019; Lin et al., 2019). Σε άλλη μελέτη βρέθηκε πως ενώ μίγμα ενδοφυτικών βακτηρίων δεν είχε μεγαλύτερη επίδραση στην προώθηση της φυτικής ανάπτυξης φυτών *Artemisia annua* σε σύγκριση με τις μονοκαλλιέργειες, προκάλεσε αύξηση της συγκέντρωσης της βιοδραστικής ένωσης artemisinin (Tripathi et al., 2020). Ακόμη, η απόδοση εξαρτάται και από άλλους παράγοντες. Για παράδειγμα, στη μελέτη των Meng και συνεργατών (2016) φάνηκε πως η χρονική στιγμή της εφαρμογής, καθώς και η συγκέντρωση κυττάρων του αρχικού εμβολίου επηρέασαν την απόδοση του *B. velezensis* BAC03 στο ραπανάκι. Άλλες συνθήκες στις οποίες μπορεί οφείλεται η διαφορετική απόδοση των μικροβιακών εμβολίων από μελέτη σε μελέτη είναι η λίπανση που χρησιμοποιείται (Huang et al., 2020; Lin et al., 2019) και ο τρόπος εφαρμογής (Salvatierra-Martinez et al., 2018; Hashmi et al., 2019; Torres et al., 2020).

5.7 Βακτηριακά στελέχη καταπολεμούν την τεφρά σήψη σε καρπούς τομάτας και αμπέλου, αλλά και την ανθράκωση σε καρπούς ελιάς

Συνθετικά μυκητοκτόνα που χρησιμοποιούνται μετασυλλεκτικά αφήνουν υπολείμματα στα τρόφιμα, υποδεικνύοντας την ανάγκη για χρήση εναλλακτικών μεθόδων καταπολέμησης (Lastochkina et al., 2019). Για παράδειγμα, οι Esteve-Turillas και συνεργάτες (2016) ανέφεραν πως 44% των διεθνών κρασιών που εξετάστηκαν περιείχαν τουλάχιστον μία από τις πέντε δραστικές ενώσεις κατά του *B. cinerea*. Χημικά φυτοφάρμακα που χρησιμοποιούνται για μετασυλλεκτική εφαρμογή είναι εξαιρετικά περιορισμένα και σε κάποιες ευρωπαϊκές χώρες εντελώς απαγορευμένα (Ambrico & Trupo, 2017). Για παράδειγμα, στην Ιταλία επιτρέπεται μόνο το διοξείδιο του θείου (SO₂) για χρήση σε σταφύλια,

ωστόσο χρειάζονται εναλλακτικές λύσεις καθώς και αυτό ενέχει κινδύνους και δυσκολίες (Parafati et al., 2015).

Η χρήση ενδοφυτικών και ριζοσφαιρικών βακτηρίων ως βιολογικός τρόπος καταπολέμησης προ- και μετα-συλλεκτικών ασθενειών έχει αρχίσει να ερευνάται έντονα τα τελευταία χρόνια (Busby et al., 2017; Ellis, 2017; Morales-Cedeño et al., 2021). Παρ'όλο που γίνεται αρκετή έρευνα για ανταγωνιστικά μικρόβια έναντι του *B. cinerea*, τα σκευάσματα που υπάρχουν στο εμπόριο για προστασία σε προ- ή μετα-συλλεκτικό στάδιο είναι περιορισμένα με μερικά παραδείγματα να είναι τα Serenade® Max (*B. subtilis* QST 713), Amylo-X® (*B. velezensis* D747) και Botector® (*Aureobasidium pullulans* DSM 14940) (Nicot et al., 2016; Romanazzi et al., 2016). Τα στελέχη *Bacillus* spp. δοκιμάζονται περισσότερο από όλα τα υπόλοιπα βακτήρια για τις ασθένειες που αφορούν καρπούς, είτε προσυλλεκτικά είτε μετασυλλεκτικά, λόγω των πολλών θετικών ιδιοτήτων τους, όπως είναι η γρήγορη ανάπτυξη, ο σχηματισμός ενδοσπορίων, αλλά και η παραγωγή μεγάλης ποικιλίας αντιμικροβιακών μεταβολιτών, ενώ φαίνεται πως είναι αρκετά υποσχόμενη μέθοδος (Buchholz et al., 2018; Chen et al., 2019; Lastochkina et al., 2019; Chaouachi et al., 2021; Lu et al., 2021). Πέραν της αποτελεσματικότητάς τους στη μείωση της ασθένειας, μελέτες έχουν καταγράψει θετικό αντίκτυπο στην ποιότητα των καρπών, όπως αυξημένο ασκορβικό οξύ, μειωμένη τιτλοδοτήσιμη οξύτητα και αυξημένο βάρος (Pingping et al., 2017; Reyes-Estebanez et al., 2019; Wang et al., 2021).

Στη συγκεκριμένη έρευνα οι δοκιμές των μεμονωμένων βακτηρίων ή και των μιγμάτων τους έναντι φυτοπαθογόνων μυκήτων στους καρπούς πραγματοποιήθηκαν σε ελεγχόμενες συνθήκες με τεχνητές πληγές και ισχυρά μικροβιακά εμβόλια, ως ένα προκαταρκτικό πείραμα εύρεσης στελεχών ικανών να παρεμποδίσουν την ανάπτυξη της ασθένειας, πρακτική που ακολουθείται σε πολλές μελέτες στο στάδιο της γρήγορης αξιολόγησης μετά τη δοκιμή διπλής καλλιέργειας *in vitro* (Raymaekers et al., 2020).

Στις περισσότερες μελέτες, έχει επιλεγεί η προληπτική εφαρμογή της βακτηριακής μεταχείρισης, από 2-24 ώρες πριν το παθογόνο (Haidar et al., 2015; Ambrico & Trupo, 2017; Kurniawan et al., 2018; Khedher et al., 2021; Fan H. et al., 2017a; Pingping et al., 2017; Kasfi et al., 2018), καθώς φαίνεται να λειτουργεί πιο επιτυχημένα από την ταυτόχρονη ή θεραπευτική εφαρμογή (Calvo et al., 2017; Arroyave-Torro et al., 2017; Nifakos et al., 2021; Lu et al., 2021), ενώ με την αύξηση των ημερών επώασης του βακτηρίου πριν τον εμβολιασμό του παθογόνου λαμβάνονται καλύτερα αποτελέσματα (Fedele et al., 2020). Η προληπτική εφαρμογή του βακτηρίου φαίνεται να δίνει προβάδισμα στο βακτήριο να αποικίσει και να παράξει την απαραίτητη συγκέντρωση αντιμικροβιακών ή άλλων μεταβολιτών (Arrebola et al., 2010; Calvo et al., 2017; Arroyave-Torro et al., 2017). Έτσι, στη συγκεκριμένη μελέτη επιλέχθηκε η προληπτική εφαρμογή των βακτηρίων. Στη μελέτη των On και συνεργατών (2015), στην μικρότερη αναλογία βακτηριακών κυττάρων *Bacillus* spp. ως προς σπόρια *B. cinerea* σε καρπούς τομάτας, η προληπτική εφαρμογή ήταν πιο αποτελεσματική από την ταυτόχρονη εφαρμογή, ενώ σε μεγαλύτερη αναλογία υπήρχε μικρή διαφορά

μεταξύ των δύο εφαρμογών, υποδεικνύοντας πως η εξάπλωση του μύκητα, σε συνδυασμό με τη συγκέντρωση και το χρόνο εφαρμογής του βακτηρίου είναι σημαντικοί παράγοντες στην έκβαση της ασθένειας.

Έχει συζητηθεί η επίδραση της συγκέντρωσης του βακτηριακού εμβολίου στην επιτυχία της καταπολέμησης, όπου όσο μεγαλύτερη η συγκέντρωση του βακτηρίου, τόσο μεγαλύτερη επιτυχία, με γενική παραδοχή τη συγκέντρωση 10^7 - 10^9 CFUs/ml και εμβόλιο προερχόμενο από καλλιέργειες (El-Ghaouth et al., 2004; Calvo et al., 2017; Reyes-Estebanez et al., 2020; Yáñez-Mendizábal et al., 2011; Touré et al., 2004). Έτσι, στη συγκεκριμένη μελέτη επιλέχθηκε η συγκέντρωση 10^8 CFUs/ml. Στα τοματίνια παρατηρήθηκε έντονη ανάπτυξη των κυττάρων στην πληγή και σχηματισμός προστατευτικών βιοϋμενίων, γεγονότα που είχαν ως αποτέλεσμα εντυπωσιακή προστασία από το παθογόνο *B. cinerea*, αλλά ταυτόχρονα την εμφάνιση ήπιων αλλοιώσεων του ιστού γύρω από την πληγή, με εξαίρεση τη μεταχείριση του στελέχους Tel34. Οπότε, πραγματοποιήθηκε εμβολιασμός και με συγκέντρωση 10^6 CFU/ml.

Ο εμβολιασμός των βακτηριακών στελεχών πραγματοποιήθηκε με καλλιέργειες βακτηριακών κυττάρων που περιέχουν ζωντανά κύτταρα, ενδοσπόρια και μεταβολίτες που έχουν εκκριθεί στο μέσο. Κάποιες μελέτες έχουν δείξει πως είναι πιο αποτελεσματική η χρήση κυττάρων ή υγρής καλλιέργειας σε σχέση με τη χρήση μόνο των παραγόμενων ενώσεων (Kong et al., 2010; Yáñez-Mendizábal et al., 2011; Calvo-Garrido et al., 2018; Kilani-Feki et al., 2016; Calvo et al., 2017; Chen et al., 2019; Ye et al., 2021), ενώ άλλες έχουν δείξει το αντίθετο ή ότι η δραστηριότητα είναι παρόμοια (Arroyave-Torro et al., 2017; Calvo et al., 2017). Σε κάποιες μελέτες όπου έχει εξεταστεί μόνο η χρήση υπερκειμένου καλλιέργειας ή λιποπεπτιδίων έχει αναδειχθεί η αποτελεσματικότητά τους έναντι των παθογόνων (Ambrico & Trupo, 2017; Toral et al., 2018). Για παράδειγμα, στη μελέτη των Khedher και συνεργατών (2020), εφαρμογή λιποπεπτιδίων του στελέχους *B. subtilis* V26 είχε μεγάλη αποτελεσματικότητα έναντι της τεφράς σήψης στα σταφύλια σε συγκέντρωση 1 mg/ml, ενώ εξαφάνισε τελείως τα συμπτώματα σε συγκέντρωση 2 mg/ml. Τα ενδοσπόρια φαίνεται να είναι ενεργά μόνο σε ευπαθή παθογόνα όπως τα *Monilinia* spp, καθώς χρειάζεται χρόνος για να βλαστήσουν (Kilani-Feki et al., 2016; Masmoudi et al., 2017), αν και σε άλλες μελέτες έχουν δείξει καλύτερα αποτελέσματα από το υπερκείμενο (Balderas-Ruiz et al., 2021). Το μειονέκτημα της χρήσης κυττάρων έναντι υπερκειμένου καλλιέργειας ή ενώσεων είναι ότι το αποτέλεσμα κρίνεται από την επιτυχία εδραίωσης και ανάπτυξης του βακτηριακού στελέχους πάνω στον καρπό, γεγονός που μπορεί να εξαρτάται από τις περιβαλλοντικές συνθήκες (Gotor-Vila et al., 2017; Zhang et al., 2017). Για παράδειγμα, στη μελέτη των Calvo και συνεργατών (2019), όπου μελετήθηκε η παραγωγή της ένωσης Iturin A πάνω σε καρπούς, αποδείχθηκε πως ο αποικισμός του βακτηρίου είναι σημαντικός. Η εφαρμογή βακτηριακών καλλιεργειών 24 ωρών του *B. amyloliquefaciens* BUZ-14 ήταν ικανή να καταστείλει τα παθογόνα *Monilinia* spp. στα ροδάκινα και το παθογόνο *Penicillium expansum* στα μήλα, αλλά όχι τα *Penicillium digitatum* και *Penicillium italicum* στα μανταρίνια και το *B. cinerea* στις φράουλες. Το βακτηριακό στέλεχος αναπτύχθηκε στα ροδάκινα και ανιχνεύθηκε παραγωγή της

ένωσης Iturin A, ενώ σε όλους τους υπόλοιπους καρπούς έμεινε στάσιμο και δεν ανιχνεύθηκε παραγωγή της ένωσης. Ωστόσο, μετά από διερεύνηση της ελάχιστης συγκέντρωσης αναστολής (MIC) *in vivo* προτάθηκε πως η συγκέντρωση της ένωσης που υπήρχε στο υπερκείμενο της καλλιέργειας κατάφερε να περιορίσει την ασθένεια στα μήλα, αλλά όχι στους υπόλοιπους καρπούς. Κάτι παρόμοιο συνέβη και στη μελέτη των Yáñez-Mendizábal και συνεργατών (2011), όπου η ανάπτυξη του βακτηρίου έμεινε στάσιμη.

Η χρήση υπερκειμένου καλλιέργειας με μέγιστη συγκέντρωση των απαιτούμενων μικροβιακών ενώσεων μετά από βελτιστοποίηση των συνθηκών παραγωγής ενέχει τη δυσκολία του προσδιορισμού της ακριβούς σύστασης και τη δυνατότητα εμπορικής εκμετάλλευσης, ενώ το κόστος παραγωγής θα είναι υψηλό, καθώς θα χρειάζεται μεγάλη συγκέντρωση των ενώσεων (Calvo et al., 2019). Η παραγωγή και εφαρμογή ενός καθαρού λιποπεπτιδίου με μεγάλη ανταγωνιστική ικανότητα, έχει το πλεονέκτημα της ευκολότερης τυποποίησής του και ελέγχου τοξικότητας, ωστόσο πάλι ενέχει πολύ υψηλό κόστος, δυσκολία παραγωγής υψηλών ποσοτήτων με υψηλή καθαρότητα, ενώ χάνεται το πλεονέκτημα χρήσης μίγματος ουσιών που ίσως έχει μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα (Ambrico & Truro, 2017; Calvo et al., 2019). Αν και αναφέρεται πως τα λιποπεπτίδια είναι σχετικά σταθερά στο περιβάλλον και θεωρείται ότι μπορούν να έχουν δραστηριότητα για κάποιο χρονικό διάστημα (Fan H. et al., 2017a; Guo et al., 2014), ο χρόνος ημιζωής τους είναι λίγες ημέρες καθώς μπορεί να αποδομηθούν από μικρόβια και να απενεργοποιηθούν μέσω προσρόφησης σε εδαφικά σωματίδια, υποδεικνύοντας τη σημασία της παρουσίας του βακτηρίου για τη συνεχή παραγωγή τους (Arseneault & Filion, 2017). Στη συγκεκριμένη διατριβή, κατά τις δοκιμές δραστηριότητας των υπερκειμένων καλλιεργειών και των ακατέργαστων εκχυλισμάτων *in vitro* παρατηρήθηκε πως η δραστηριότητα κράτησε λίγες μέρες, κάτι που μπορεί να οφείλεται στη μικρή συγκέντρωση των ουσιών και την ανάπτυξη ανθεκτικότητας του μύκητα, ενώ παρουσία του βακτηρίου η ζώνη παρεμπόδισης μένει αμετάβλητη για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα. Η υπεροχή της εφαρμογής βακτηριακών κυττάρων, με προαπαιτούμενη την ικανότητα αποικισμού, οφείλεται στη συνεχή παραγωγή μεταβολιτών από τα βακτηριακά κύτταρα, τον επιπρόσθετο ανταγωνισμό για χώρο και θρεπτικά, την ενεργοποίηση της φυτικής άμυνας από τα βακτηριακά κύτταρα, την ταυτόχρονη παραγωγή μεγάλου εύρους ενώσεων με συνεργιστικές δράσεις, καθώς και την πιθανότητα παραγωγής μεγαλύτερης ποσότητας των ιδιοσυστατικά παραγόμενων μεταβολιτών ή παραγωγή νέων αντιμικροβιακών ενώσεων λόγω της παρουσίας ενός παθογόνου (Ongena & Jaques, 2008; Li et al., 2014; Arseneault & Filion, 2017; Zihalirwa Kulimushi et al., 2017; Calvo et al., 2019; Dimopoulou et al., 2019). Έτσι, η εφαρμογή ενός βιολογικού παράγοντα καταπολέμησης που να είναι ικανός να αναπτυχθεί επαρκώς ώστε να εκκρίνει τις απαιτούμενες συγκεντρώσεις των αντιμικροβιακών μεταβολιτών φαίνεται να είναι η ευκολότερη, οικονομικότερη και αποτελεσματικότερη μέθοδος (Calvo et al., 2019).

Γενικά, προτείνεται η αξιολόγηση των μικροβίων σε διάφορα παθογόνα και καρπούς για την επιλογή υποσχόμενων παραγόντων βιολογικής αντιμετώπισης, το οποίο μπορεί να οδηγήσει και στην κατάλληλη επιλογή μιγμάτων ή διαδοχικής εφαρμογής διαφορετικών βακτηρίων (Haidar et al., 2015).

Υπάρχουν λίγες μελέτες χρήσης ενδοφυτικών και ριζοσφαιρικών *Bacillus* spp. κατά της τεφράς σήψης σε καρπούς τομάτας και αμπέλου, ενώ δεν υπάρχουν μελέτες για την καταπολέμηση του γλοιοσπορίου σε καρπούς ελιάς (Shi et al., 2021). Τα εκχυλισμένα λιποπεπτίδια του ριζοσφαιρικού *B. velezensis* XT1 CECT 8661 προκάλεσαν 100% και 50% μείωση της τεφράς σήψης στο σταφύλι και την τομάτα, αντίστοιχα (Toral et al., 2018). Το ενδοφυτικό στέλεχος *B. velezensis* BF11 έδειξε ισχυρή προστατευτική επίδραση εναντίον του *B. cinerea* σε καρπούς τομάτας (Chaouachi et al., 2021). Το ενδοφυτικό στέλεχος *B. velezensis* Bvel1 μείωσε την ένταση της ασθένειας σε καρπούς αμπέλου στο 25.33% (10^6 CFU/ml) και 16.33% (10^8 CFU/ml), σε σύγκριση με το 81.10% του μάρτυρα, ενώ μείωσε και τη σοβαρότητα της ασθένειας κατά περίπου 42% (10^6 CFU/ml) και 46% (10^8 CFU/ml) (Nifakos et al., 2021). Ενδοσπόρια του στελέχους *B. velezensis* 83 (Fungifree AB™) μείωσαν το εμβαδόν της μολυσμένης περιοχής από *B. cinerea* σε καρπούς τομάτας κατά 89% (Balderas-Ruiz et al., 2021). Το στέλεχος *Paenibacillus alvei* K165 μείωσε τη μόλυνση του *B. cinerea* σε καρπούς αμπέλου κατά 65% (Gkizi et al., 2021b). Στελέχη του είδους *B. safensis* και γενικά του κλάδου *B. pumilus* έχουν δοκιμαστεί ελάχιστα σε καρπούς. Το στέλεχος *B. pumilus* G3AX έδειξε υποσχόμενα αποτελέσματα εναντίον *Aspergillus* spp. σε σταφύλια (Arfaoui et al., 2019). Το εκχύλισμα του ενδοφυτικού στελέχους *B. safensis* QN1NO-4 έδειξε υψηλή ανταγωνιστική ικανότητα έναντι του μύκητα *Colletotrichum fragariae* σε φράουλες (Li et al., 2021). Στελέχη του είδους *B. subtilis* έχουν δοκιμαστεί, μεταξύ άλλων, εναντίον του μύκητα *B. cinerea* στο βατόμουρο (Kurniawan et al., 2018) και του μύκητα *C. acutatum* σε καρπούς tamarillo (Arroyave-Toro et al., 2017), αλλά και μήλα (Kim et al., 2016). Στη μελέτη των Kilani-Feki και συνεργατών (2016) η καλλιέργεια του ριζοσφαιρικού στελέχους *B. subtilis* V26 μείωσε την ένταση της τεφράς σήψης στην τομάτα κατά 79% σε σχέση με το μάρτυρα, ενώ εκχύλισμα λιποπεπτιδίων του συγκεκριμένου στελέχους μείωσε σημαντικά την τεφρά σήψη σε καρπούς αμπέλου (Khedher et al., 2020). Μελέτες όπου γίνεται εφαρμογή στελεχών *B. halotolerans* σε καρπούς είναι λίγες, ενώ δεν υπάρχει μελέτη που να αφορά ενδοφυτική απομόνωση ή την καταπολέμηση της τεφράς σήψης σε τομάτα ή σταφύλι εκτός από τη μελέτη του εργαστηρίου μας των Tsalgaidou και συνεργατών (2022). Στη μελέτη των Wang και συνεργατών (2021) το στέλεχος *B. halotolerans* KLBC XJ-5 προερχόμενο από δείγμα χόματος φραουλιάς, δεν μείωσε την ένταση της ασθένειας καρπών φράουλας μετά από 4 ημέρες επώασης, αλλά μείωσε στατιστικά σημαντικά τη διάμετρο της αλλοίωσης (10.9 mm) συγκριτικά με το μάρτυρα (14.5 mm) (περίπου 24.8% μείωση). Επίσης, το ριζοσφαιρικό στέλεχος *B. halotolerans* BFOA4 μείωσε τη σοβαρότητα της ασθένειας που προκαλεί ο μύκητας *F. oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici* σε καρπούς τομάτας (Slama et al., 2019).

Τα στελέχη εξετάστηκαν σε αρχικό στάδιο της μελέτης ως μεμονωμένα εμβόλια σε καρπούς ελιάς για την καταπολέμηση του παθογόνου *Colletotrichum acutatum* που προκαλεί την ασθένεια ανθράκωση της ελιάς. Η ανθράκωση προκαλείται από διάφορα είδη *Colletotrichum*, κυρίως του συμπλέγματος *C. acutatum*, και περιλαμβάνει τη σήψη του καρπού που οδηγεί στη ρίψη από το δέντρο ή τη μουμιοποίησή του, προκαλώντας απώλειες σοδειάς και υποβάθμιση της ποιότητας του λαδιού (Talhinhas et al., 2018). Οι κύριες μέθοδοι αντιμετώπισης είναι η χρήση ανθεκτικών ποικιλιών και χαλκούχα μυκητοκτόνα, τα οποία είναι μη αποδοτικά σε υψηλή πίεση του μύκητα και μπορεί να

οδηγήσουν σε υπολείμματα στο λάδι (Talhinhas et al., 2018). Στη συνέχεια, τα στελέχη εξετάστηκαν σε καρπούς τομάτας και αμπέλου έναντι του παθογόνου *B. cinerea*.

Με βάση τα αποτελέσματα φαίνεται πως τα στελέχη που ανήκουν στον κλάδο *B. subtilis* και *B. amyloliquefaciens* είναι τα αποτελεσματικότερα στην αντιμετώπιση των φυτοπαθογόνων μυκήτων σε καρπούς αλλά και τα ικανότερα στον αποικισμό της πληγής, με το στέλεχος *B. velezensis* Hir139 να είναι το αποτελεσματικότερο με διαφορά. Ακόμη, φαίνεται πως τα στελέχη έχουν αποτέλεσμα κυρίως στη μείωση της σοβαρότητας της ασθένειας και όχι στον αριθμό των ασθενών καρπών, με εξαίρεση την εφαρμογή τους στις τομάτες σε συγκέντρωση 10^8 CFU/ml.

Παρ'όλο που στην τομάτα τα στελέχη ξεκίνησαν με χαμηλότερο πληθυσμό (10^6 CFU/ml) απ'ότι στο σταφύλι (10^8 CFU/ml), τα στελέχη Tel34, Hil4 και Hir139 παρουσίασαν καλύτερο αποικισμό, ενώ τα στελέχη Tel52 και Ter90 είχαν παρόμοιο αποικισμό και στους δύο καρπούς. Έτσι, φαίνεται πως κάποια στελέχη είχαν ίδια συμπεριφορά και στους δύο καρπούς, ενώ σε κάποια άλλα διέφερε ανάλογα με τον καρπό. Ακόμη, τα στελέχη χρειάστηκαν πολύ λιγότερο χρόνο επώασης στις μικρόκαρπες τομάτες (1.5 ώρα) πριν τη μόλυνση με το παθογόνο σε σύγκριση με τους καρπούς ελιάς και αμπέλου (36 ώρες) ώστε να επιτευχθεί αποικισμός και ανταγωνιστικότητα έναντι αυτού. Το γεγονός αυτό μπορεί να οφείλεται στη θρεπτική σύσταση του κάθε καρπού, καθώς και στο pH του. Οι Chen και συνεργάτες (2019) παρατήρησαν πως όλα τα βακτηριακά στελέχη που εξέτασαν είχαν παρόμοια ικανότητα αποίκησης σε καρπούς τομάτας, αλλά όχι σε σταφύλια, με τον ίδιο χρόνο επώασης. Αν και η συγκεκριμένη μελέτη δείχνει πως η τομάτα παρουσίασε πιο ευνοϊκό περιβάλλον για γρήγορο αποικισμό, όλα τα στελέχη αποίκισαν επιτυχώς και το σταφύλι, ενώ η μέγιστη διαφορά μεταξύ των στελεχών είναι της τάξεως του 1-1.5 Log₁₀CFU. Αυτό μπορεί να αποδοθεί στην ισχυρή ικανότητα ομαδικής κίνησης και σχηματισμού βιοϋμενίου, την παραγωγή κυτταρινάσης, αλλά και την προβλεπόμενη, μέσω γενωμικής ανάλυσης, παραγωγή άλλων εκκρινόμενων λυτικών ενζύμων, όπως είναι οι πηκτινάσες.

Το στέλεχος Hir139 που φάνηκε να είναι το αποτελεσματικότερο σε όλους τους καρπούς, παρουσίασε τον καλύτερο αποικισμό στην τομάτα από όλα τα άλλα στελέχη, ενώ στο σταφύλι είχε τον τρίτο καλύτερο αποικισμό. Το στέλεχος Ter90 κατατάσσεται προτελευταίο όσον αφορά την ικανότητα αποικισμού στην τομάτα, ωστόσο έχει από τις καλύτερες αποτελεσματικότητες. Έτσι, φαίνεται πως ο αποικισμός δεν εμφάνισε πάντα άμεση συσχέτιση με την αποτελεσματικότητα του στελέχους (Calvo et al., 2019; Chen et al., 2019) ή εμφάνισε και αρνητική συσχέτιση (Calvo-Garrido et al., 2019), αν και οι διαφορές μεταξύ των στελεχών ήταν σχετικά μικρές. Οι περισσότερες μελέτες συγκλίνουν στο ότι ο ισχυρός αποικισμός είναι σημαντικός για την επιτυχή παρεμπόδιση του παθογόνου (Zerrouh et al., 2014; Fedele et al., 2020; Lastochkina et al., 2020a, 2020b; Calvo et al., 2019). Ακόμη, παρατηρήθηκε πως η αποτελεσματικότητα του κάθε στελέχους ήταν παρόμοια στους δύο καρπούς. Για παράδειγμα το στέλεχος Tel34 είχε τη μικρότερη αποτελεσματικότητα σε όλους τους καρπούς όπου εξετάστηκε, ακολουθούμενο από το στέλεχος Hil4, ενώ το στέλεχος Hir139 είχε

τη μεγαλύτερη. Τα στελέχη Tel52 και Ter90 αντάλλαζαν θέσεις ανάλογα με τον καρπό, με το Ter90 να είναι αποτελεσματικότερο σε 2 από τα 3 καρπούς.

Η μόνη περίπτωση όπου μίγμα έδωσε καλύτερα αποτελέσματα από τις μεμονωμένες μεταχειρίσεις αφορά το μίγμα Hil4-Tel52 κατά τον εμβολιασμό συγκέντρωσης 10^6 CFU/ml στην τομάτα, ωστόσο δεν είχε στατιστικά σημαντική διαφορά από τις μεταχειρίσεις των καλύτερων μεμονωμένων στελεχών Hir139 και Ter90. Κανένα μίγμα δεν εμφάνισε μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα με στατιστικά σημαντική διαφορά σε σύγκριση με όλα τα μεμονωμένα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν.

Κατά τον εμβολιασμό 10^8 CFU/ml στην πληγή της μικρόκαρπης τομάτας, το μίγμα Tel34-Hir139 πέτυχε την τρίτη καλύτερη μείωση της έντασης της ασθένειας (13.9%), μετά τις μεταχειρίσεις των μεμονωμένων στελεχών Tel52 και Hir139 (8.3%), χωρίς στατιστικά σημαντική διαφορά από αυτές. Καθώς η μεταχείριση Tel34 εμφάνισε τιμή έντασης της ασθένειας παρόμοια με του μάρτυρα, υποδεικνύεται πως το στέλεχος Hir139 καταφέρνει να μειώσει την τιμή κοντά στα επίπεδα του μεμονωμένου στελέχους. Παρ'όλο που το στέλεχος Tel52 ήταν πολύ αποτελεσματικό ως μεμονωμένο εμβόλιο, το μίγμα Hil4-Tel52 έδωσε τιμή μεγαλύτερη και από τα δύο μεμονωμένα στελέχη (52.8%), που περισσότερο ομοιάζει με το Hil4 (38.9%). Εμβολιασμός του μίγματος Tel34-Ter90 οδήγησε σε ένταση της ασθένειας σημαντικά μικρότερη από το Tel34 και λίγο μεγαλύτερη από το Ter90 χωρίς στατιστικά σημαντική διαφορά, υποδεικνύοντας ότι το Ter90 είναι ικανό να μειώσει την εμφάνιση της ασθένειας ακόμα και σε μίγμα με ένα λιγότερο αποτελεσματικό βακτήριο.

Κατά τον εμβολιασμό 10^6 CFU/ml στην πληγή της μικρόκαρπης τομάτας, το μίγμα Hil4-Tel52 πέτυχε την καλύτερη μείωση της σοβαρότητας της ασθένειας με ποσοστό 25.93%, σε σύγκριση με όλες τις μεταχειρίσεις, αν και όχι με στατιστικά σημαντική διαφορά από τα Hir139 και Ter90. Ακόμη, το μίγμα Hil4-Tel52 έδειξε καλύτερα αποτελέσματα από τα μεμονωμένα βακτήρια Hil4 και Tel52, με στατιστικά σημαντική διαφορά. Όσον αφορά τον αποικισμό της πληγής, παρατηρήθηκε πως το στέλεχος Tel52 είχε μικρή αύξηση του πληθυσμού του και σε σχέση με το μεμονωμένο εμβολιασμό. Ίσως ο αυξημένος πληθυσμός του ισχυρότερου στελέχους Tel52 να οδήγησε στην μεγαλύτερη μείωση της σοβαρότητας της ασθένειας. Τα μίγματα Tel34-Ter90 και Tel34-Hir139 παρουσίασαν ενδιάμεση αποτελεσματικότητα σε σχέση με τα μεμονωμένα στελέχη και στατιστικά σημαντική διαφορά με αυτά, υποδεικνύοντας πως τα ισχυρά στελέχη Ter90 και Hir139 δεν κατάφεραν να μειώσουν τη σοβαρότητα όταν βρέθηκαν σε μίγμα με ένα πιο αδύναμο βακτήριο στην περίπτωση εμβολιασμού τους σε μικρότερη συγκέντρωση. Αυτό ίσως εξηγείται από τη μείωση των πληθυσμών τους στο μίγμα με το Tel34 σε σύγκριση με το μεμονωμένο εμβολιασμό τους. Στην τομάτα φαίνεται πως λόγω της γρηγορότερης και μεγαλύτερης ικανότητας αποικισμού του στελέχους Tel34 σε σχέση με τα σταφύλια δημιουργείται μεγαλύτερος ανταγωνισμός στο μίγμα και μειώνονται οι πληθυσμοί των Hir139 και Ter90. Στην προηγούμενη συγκέντρωση, όπου το αρχικό εμβόλιο ήταν μεγαλύτερο (10^8 CFU/ml), ίσως να είχαν προλάβει να αυξηθούν γρηγορότερα και σε πολύ μεγαλύτερο ποσοστό από το Tel34, οπότε να μην επηρεάστηκαν από τη συνύπαρξη στο μίγμα, ενώ εδώ λόγω ανταγωνισμού με το Tel34 να μην πρόλαβαν να αυξηθούν σε πληθυσμό γρήγορα.

Όσον αφορά τα σταφύλια, το μίγμα Tel34-Hir139 ήταν το καλύτερο στη μείωση της έντασης και της σοβαρότητας της ασθένειας σε σύγκριση με τα υπόλοιπα μίγματα, είχε ίδιες τιμές και με το καλύτερο από τα μεμονωμένα στελέχη, το στέλεχος Hir139, ενώ ο πληθυσμός του Hir139 ήταν παρόμοιος όταν εμβολιάστηκε μεμονωμένα και στο μίγμα. Το μίγμα Tel34-Ter90 είχε μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα (37.50%) από τα δύο μεμονωμένα στελέχη Tel34 (51.66%) και Ter90 (46.66%), αν και στατιστικά σημαντική διαφορά υπήρχε μόνο με το στέλεχος Tel34. Είναι πιθανό πως η ομοιότητα δράσης του μίγματος με τη μεταχείριση Ter90 οφείλεται στην έλλειψη ανταγωνισμού του Tel34 με το Ter90. Το μίγμα Hil4-Tel52 είχε ενδιάμεση τιμή του δείκτη σοβαρότητας της ασθένειας (40.83%) σε σχέση με τα δύο μεμονωμένα βακτηριακά στελέχη Tel52 (33.33%) και Hil4 (45.83%), χωρίς στατιστικά σημαντικές διαφορές. Το γεγονός αυτό ίσως οφείλεται στη μικρή μείωση του πληθυσμού του Tel52 στο μίγμα σε σχέση με το μεμονωμένο εμβολιασμό ή στο ότι ο ανταγωνισμός των στελεχών «καταναλώνει» ενέργεια και ενώσεις που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν στον ανταγωνισμό κατά του παθογόνου (Thomludi et al., 2019).

Έτσι, βλέπουμε πως το κάθε μίγμα έχει διαφορετική αναλογία πληθυσμού των μεμονωμένων στελεχών στους διαφορετικούς καρπούς, καθώς και διαφορετική αποτελεσματικότητα σε σύγκριση με τους μεμονωμένους εμβολιασμούς, η οποία όμως φαίνεται να εξαρτάται από τον πληθυσμό του ισχυρότερου στελέχους στο μίγμα σε σύγκριση με το μεμονωμένο εμβολιασμό. Για παράδειγμα, το μίγμα Tel34-Hir139 εμφάνισε αποτελεσματικότητα ενδιάμεση των στελεχών που το απαρτίζουν στη μικρόκαρπη ντομάτα, με το στέλεχος Hir139 να έχει μικρότερο πληθυσμό σε σύγκριση με το μεμονωμένο του εμβολιασμό. Αντίθετα, στο σταφύλι το μίγμα εμφάνισε ίδια αποτελεσματικότητα με το Hir139, με το τελευταίο να έχει παρόμοιο πληθυσμό στο μίγμα και το μεμονωμένο εμβολιασμό. Τα στελέχη Ter90, Hir139 και Tel52 φαίνεται να είναι τα συστατικά επιτυχίας των μιγμάτων στις δοκιμές βιολογικής αντιμετώπισης στους καρπούς. Ανάλογη παρατήρηση έχει γίνει και από τη μελέτη των Myresiotis και συνεργατών (2011) όσον αφορά την καταπολέμηση του *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* σε φυτά τομάτας. Συγκεκριμένα, για το μίγμα *B. subtilis* GB03- *B. amyloliquefaciens* IN937a υποδεικνύεται πως το στέλεχος GB03 ήταν το κύριο συστατικό επιτυχίας, καθώς το IN937a δεν είχε διαφορά από το μάρτυρα όταν εμβολιάστηκε ως μεμονωμένο στέλεχος.

Θεωρείται πως τα ενδοφυτικά βακτήρια, μόλις εγκαθίστανται στο φυτικό ιστό, προσφέρουν μακροχρόνια προστασία βοηθώντας στην καλύτερη διατήρηση καρπών και λαχανικών κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης (Buchholz et al., 2018; Lastochkina et al., 2019; Lastochkina et al., 2020a,b). Η παρεμπόδιση φυτοπαθογόνων πάνω στους καρπούς μπορεί να οφείλεται σε ανταγωνισμό για χώρο και θρεπτικά, σε παραγωγή λυτικών ενζύμων, σε παραγωγή αντιμυκητιακών ενώσεων και στην επαγωγή της φυτικής άμυνας.

Στη μελέτη των Ye και συνεργατών (2021) υποστηρίζεται ότι η κατάληψη χώρου (site occupancy) ευθύνεται για την αποτελεσματικότητα της εφαρμογής βακτηριακών κυττάρων έναντι του εκχυλίσματος της καλλιέργειας. Η γρήγορη ανάπτυξη και η υψηλή πληθυσμιακή πυκνότητα των στελεχών *B. subtilis* σε πληγές καρπών συνεισφέρουν στο σχηματισμό βιοϋμενίων που καλύπτουν

ολόκληρη την περιοχή της πληγής και αποκλείουν την ανάπτυξη των φυτοπαθογόνων (Zerriouh et al., 2014; Lu et al., 2021). Στη δοκιμή των στελεχών σε μικρόκαρπες τομάτες παρατηρήθηκε έντονα αυτό το φαινόμενο όταν τα στελέχη εμβολιάστηκαν σε συγκέντρωση 10^8 CFU/ml και σχημάτισαν βιοϋμένιο που ήταν ορατό μακροσκοπικά στην πληγή υποδεικνύοντας τον ανταγωνισμό για χώρο ως τον κύριο μηχανισμό δράσης. Εξαίρεση αποτέλεσε το στέλεχος Tel34, το οποίο αναπτύσσεται πολύ γρήγορα σε *in vitro* καλλιέργεια και διαθέτει τη γρηγορότερη κίνηση swarming *in vitro*, ωστόσο είχε μικρότερη ικανότητα αποικισμού σε σχέση με τα υπόλοιπα στελέχη στην τομάτα στη συγκέντρωση 10^6 CFU/ml. Επίσης, δε διαθέτει τα γονίδια που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση των ενώσεων Iturin και Fengycin που βοηθούν στο σχηματισμό βιοϋμενίου, ενώ έδειξε και μικρή ικανότητα στην *in vitro* δοκιμή σχηματισμού βιοϋμενίου σε σύγκριση με τα υπόλοιπα στελέχη. Τέλος, όλα τα στελέχη έχουν τη γενετική ικανότητα, και παράγουν σύμφωνα με τη δοκιμή CAS-agar, σιδηροφόρα, που στερούν πολύτιμο σίδηρο από τα φυτοπαθογόνα.

Άλλος ένας τρόπος ανταγωνισμού είναι η παραγωγή λυτικών ενζύμων που στοχεύουν το κυτταρικό τοίχωμα των μυκήτων, όπως η χιτινάση (Baldan et al., 2015; Lastochkina et al., 2020). Τα επιλεγμένα βακτηριακά στελέχη φαίνεται να παράγουν χιτινάσες, καθώς βρέθηκαν θετικά στην *in vitro* δοκιμή και διαθέτουν το αντίστοιχο γονίδιο. Ακόμη, η *in silico* πρόβλεψη παραγωγής άλλων ενζύμων που στοχεύουν το κυτταρικό τοίχωμα των μυκήτων έδειξε πως όλα τα στελέχη μπορούν δυνητικά να παράξουν χιτοζανάση, ενώ τα στελέχη Hil4, Hir139, Tel52, Ter90 μπορούν δυνητικά να παράξουν γλουκανάσες.

Ο πιο μελετημένος τρόπος δράσης βακτηριακών στελεχών έναντι παθογόνων στους καρπούς είναι η παραγωγή αντιμικροβιακών ενώσεων, με αρκετές μελέτες να τον διερευνούν. Εκτός από την άμεση δράση των ενώσεων αυτών κατά των παθογόνων (Arrebola et al., 2010; Arroyave-Toro et al., 2017; Toral et al., 2018), η καταπολέμηση έχει αποδοθεί και στην έμμεση δράση τους μέσω ενεργοποίησης της φυτικής άμυνας του καρπού (Pingping et al., 2017; Lu et al., 2021; Wang et al., 2021). Κάποιες μελέτες αποδίδουν την ικανότητα βιολογικής αντιμετώπισης στην παραγωγή λιποπεπτιδίων της οικογένειας Iturins, μέσω της δοκιμής υπερκείμενων καλλιέργειας που περιέχουν Iturin A (Ambrico & Trupo, 2017), της δοκιμής εκχυλισμένων ενώσεων Iturins (Gong et al., 2014), μεταλλαγμάτων ανίκανων να παράξουν Iturin A (Arrebola et al., 2010) ή μοναδικής δραστηριότητας σε TLC bioautography (Calvo et al., 2019). Ωστόσο, έχει αναφερθεί και η ένωση Fengycin ως βασική στην καταπολέμηση παθογόνων μυκήτων *Monilinia* spp. στα ροδάκινα (Yáñez-Mendizábal et al., 2012). Στη μελέτη των Fan H. και συνεργατών (2017a), χρήση του μεταλλάγματος του στελέχους *B. subtilis* 9407 ανίκανο για παραγωγή Fengycin μείωσε την αποτελεσματικότητα έναντι του μύκητα *Botryosphaeria dothidea* στα μήλα περίπου στο μισό, υποδεικνύοντας την ύπαρξη και άλλων ενεργών αντιμυκητιακών ενώσεων ή και άλλου μηχανισμού δράσης. Σε άλλη μελέτη υπογραμμίστηκε η σημασία και των δύο οικογενειών λιποπεπτιδίων για τη μείωση της ασθένειας σε καρπούς tamarillo (Arroyave-Torro et al., 2017). Τα στελέχη Hil4, Hir139, Tel52 και Ter90 έχουν τη γενετική ικανότητα να παράγουν τους ισχυρούς αντιμυκητιακούς μεταβολίτες Iturins ή/και Fengycins, ενώ τα Hil4 και

Hir139 που εξετάστηκαν μπορούν να τα παράγουν ιδιοσυστατικά σε *in vitro* συνθήκες. Παρ'όλο που τα στελέχη Hir139 και Tel52 έχουν σχεδόν ίδιο γενετικό υπόβαθρο ικανότητας παραγωγής αντιμικροβιακών ενώσεων, το Hir139 έδειξε μεγαλύτερη ικανότητα παρεμπόδισης των φυτοπαθογόνων ακόμα και σε χαμηλότερο πληθυσμό. Το στέλεχος Tel34 δεν έχει την ικανότητα παραγωγής αντιμικροβιακών δευτερογενών μεταβολιτών και ίσως εκεί να οφείλεται η μειωμένη ανταγωνιστική του ικανότητα.

Ένας άλλος τρόπος καταπολέμησης των φυτοπαθογόνων στους καρπούς φαίνεται να είναι η επαγωγή της φυτικής άμυνας (Singh & Sharma, 2009; Haidar et al., 2016), η οποία πέρα από την επιτυχή βιολογική αντιμετώπιση οδηγεί και σε αυξημένο περιεχόμενο φαινολικών, φλαβονοειδών και άλλων ενώσεων ενισχύοντας το αντιοξειδωτικό δυναμικό των καρπών (Wang & Bi, 2021). Οι ενώσεις των οικογενειών Iturins, Surfactins και Fengycins λειτουργούν ως διεγέρτες της φυτικής άμυνας σε αποκομμένους καρπούς (Waewthongrak et al., 2014; Tunsagool et al., 2019a,b). Η εφαρμογή του στελέχους *B. subtilis* KLBC BS6 σε βατόμουρα αύξησε την δραστηριότητα των ενζύμων που σχετίζονται με την άμυνα, και συγκεκριμένα τα ένζυμα χιτινάση, περοξειδάση, οξειδάση των πολυφαινολών και αμμωνιακή λυάση της φαινυλαλανίνης (Lu et al., 2021). Το στέλεχος *B. amyloliquefaciens* L-1 αύξησε τη δραστηριότητα των ενζύμων περοξειδάση και καταλάση σε αχλάδια, μείωσε το επίπεδο MDA, ενώ αύξησε το ασκορβικό οξύ και το περιεχόμενο σε τιτλοδοτούμενα οξέα (Pingping et al., 2017). Υψηλή δραστηριότητα ενζύμων που σχετίζονται με τη φυτική άμυνα ανιχνεύθηκαν σε καρπούς φράουλας μετά τον εμβολιασμό του στελέχους *B. halotolerans* KLBC XJ-5, ενώ δεν παρατηρήθηκαν αλλαγές στην ποιότητα (Wang et al., 2021). Λιποπεπτίδια του στελέχους *B. velezensis* XT1 CECT 8661 προκάλεσαν αύξηση της αντιοξειδωτικής δραστηριότητας εκχυλισμάτων σταφυλιού (Torral et al., 2018). Στη μελέτη των Tunsagool και συνεργατών (2019b) παρατηρήθηκε πως απ'όλες τις κατηγορίες λιποπεπτιδίων του *B. subtilis* ABS-S14, η ένωση Iturin A έδειξε την πιο έντονη επαγωγή γονιδίων του JA/ET μονοπατιού σε μανταρίνια κατά του *Penicillium digitatum*. Στη μελέτη των Gkizi και συνεργατών (2021b), η εφαρμογή του στελέχους *Paenibacillus alvei* K165 σε καρπούς αμπέλου προκάλεσε την ενεργοποίηση της φυτικής άμυνας, όπως φάνηκε από την αύξηση της μεταγραφής των γονιδίων των PR (Pathogenesis related) πρωτεϊνών PR2, PR3, PR4, PR5. Ακόμη, άλλοι δευτερογενείς μεταβολίτες, ρυθμιστές προώθησης της ανάπτυξης, αλλά και τα ίδια τα βακτηριακά κύτταρα έχουν βρεθεί να επάγουν την άμυνα των φυτών (Fincheira & Quiroz, 2018; Stringlis et al., 2018a; Peng et al., 2019; Pršić & Ongena, 2020; Oukala et al., 2021; Portieles et al., 2021; Vanthana et al., 2021; Wang et al., 2021), οπότε ίσως να μπορούν να την επάγουν και στους καρπούς. Τα στελέχη της διατριβής έχουν τη γενετική ικανότητα ή έχει αποδειχθεί ότι μπορούν να παράξουν ιδιοσυστατικά *in vitro* πληθώρα αντιμικροβιακών μεταβολιτών που μπορεί να λειτουργούν ως επαγωγείς της φυτικής άμυνας. Σύμφωνα με την ανάλυση antiSMASH του στελέχους Tel34, έχει το μικρότερο γενετικό δυναμικό αντιμικροβιακών μεταβολιτών συγκριτικά με τα υπόλοιπα στελέχη, οπότε ίσως εκεί οφείλεται η μειωμένη δράση του.

Οι διεγέρτες των PGPB στις περισσότερες περιπτώσεις είναι ενεργοί σε επίπεδο συγκέντρωσης μM (micromolar), αλλά μόνο λίγες μελέτες αναφέρουν ότι αυτές οι συγκεντρώσεις μπορούν να επιτευχθούν στη ριζόσφαιρα, καθώς είναι δύσκολη ποσοτικοποίησή τους (Pršic & Ongena, 2020). Έχει διατυπωθεί η υπόθεση πως η παραγωγή αντιβιοτικών περιορίζεται σε συγκεκριμένες μικροπεριοχές (rockets) της ριζόσφαιρας, όπου απαντώνεται όλες οι σωστές συνθήκες και το κατώφλι συγκέντρωσης πληθυσμού που απαιτούνται, γεγονός που σημαίνει πως η συγκέντρωση αντιβιοτικών μπορεί να διαφέρει ακόμα και σε απόσταση λίγων χιλιοστών (Arseneault & Fillion, 2017). Στη μελέτη των Nifakos και συνεργατών (2021) προτείνεται πως τα βακτηριακά κύτταρα σχηματίζουν μικροαποικίες στους καρπούς, όπου βρίσκονται συγκεντρωμένα πολλά κύτταρα σε μία θέση, και έτσι μπορούν να παράξουν συγκεντρώσεις αντιμικροβιακών μεταβολιτών στην τάξη των μM οι οποίες είναι ικανές για αντιμικροβιακή δράση και επαγωγή της άμυνας.

Η συγκεκριμένη μελέτη αποτελεί μία προκαταρκτική αξιολόγηση αυτών των υποσχόμενων στελεχών για τη διερεύνηση της ικανότητας βιολογικής αντιμετώπισης στους καρπούς, χρησιμοποιώντας *in vitro* μεθόδους με τεχνητές συνθήκες. Έχει αναφερθεί πως η ικανότητα βιολογικής αντιμετώπισης μικροβιακών παραγόντων που έδειχναν υποσχόμενα αποτελέσματα στις μελέτες υπό εργαστηριακές συνθήκες μειώνεται ή χάνεται όταν δοκιμάζονται στο πεδίο, πιθανώς λόγω της δυσκολίας επιβίωσής τους σε αυτές τις περιβαλλοντικές συνθήκες (Calvo-Garrido et al., 2018). Τα πιο αποτελεσματικά στελέχη μπορούν να δοκιμαστούν μελλοντικά σε μη σε μη τραυματισμένους καρπούς σε συνθήκες *in vitro*, θερμοκηπίου και αγρού. Ακόμη, θα πρέπει να εξεταστεί η επιβίωση και η δράση τους πάνω στους καρπούς σε χαμηλή θερμοκρασία, προσομοιάζοντας τις συνθήκες μετασυλλεκτικής φύλαξης (Calvo et al., 2017).

5.8 Βακτηριακά στελέχη και μίγματα επάγουν τη διασυστηματική ανοχή φυτών τομάτας έναντι του *Botrytis cinerea*

Η διέγερση του σπόρου με χημικούς παράγοντες ή μικρόβια μπορεί να οδηγήσει στην ενεργοποίηση της φυτικής άμυνας σε πρώιμο στάδιο ώστε τα φυτά είναι προετοιμασμένα για μία πιο γρήγορη απόκριση σε επικείμενη πρόκληση. Οι παράγοντες που χρησιμοποιούνται θα πρέπει να είναι ασφαλείς για τον άνθρωπο και το περιβάλλον, οπότε βακτηριακοί μεταβολίτες ή στελέχη του γένους *Bacillus* spp. ικανοποιούν αυτά τα κριτήρια και φαίνεται να επάγουν μακροχρόνια ανθεκτικότητα έναντι των παθογόνων (Song et al., 2017). Στη μελέτη των Song και συνεργατών (2017) δευτερογενείς μεταβολίτες ανθεκτικοί στη θερμότητα από στελέχη *Bacillus* spp. χρησιμοποιήθηκαν για βιοδιέγερση σπόρων πιπεριάς και αγγουριού με σκοπό την επαγωγή της φυτικής άμυνας (seed defense biopriming, SDB) και παρατηρήθηκε η αύξηση της έκφρασης γονιδίων που εμπλέκονται στο μονοπάτι του αιθυλενίου, ιασμονικού οξέος και σαλικυλικού οξέος με πιθανό αιτιολογικό παράγοντα την παρουσία ενός κυκλοδιπεπτιδίου.

Σύμφωνα με πολλές μελέτες, τα PGPB και PGPBE είναι ικανά να ενεργοποιήσουν τη φυτική άμυνα είτε τοπικά είτε διασυστηματικά λειτουργώντας ως «εμβόλια», ώστε τα φυτά να είναι σε ετοιμότητα για πιθανή εισβολή παθογόνου (Pieterse et al., 2014; Kang et al., 2018; Pršic & Ongena, 2020). Στη μελέτη των Total και συνεργατών (2020), εφαρμογή του *B. velezensis* XT1 ως ριζοπότισμα μείωσε την ένταση και σοβαρότητα της ασθένειας του *B. cinerea* σε φυτά τομάτας, ενώ παρατηρήθηκε επαγωγή της εναπόθεσης καλλόζης στα φύλλα και αύξηση των επιπέδων των ορμονών αιθυλένιο, ιασημονικό οξύ και σαλικυλικό οξύ. Εφαρμογή του στελέχους *B. subtilis* MBI-600 σε ρίζες φυτών αγγουριών είχε μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα στη μείωση του εμβαδού της νεκρωτικής κηλίδας στα φύλλα λόγω του μύκητα *B. cinerea*, σε σχέση με την εφαρμογή του στα φύλλα (Samaras et al., 2021). Μίγματα βακτηρίων έχουν αναφερθεί ως πιο αποτελεσματικά στην επαγωγή της φυτικής άμυνας, όπως στη μελέτη των Berendsen και συνεργατών (2018), όπου το φυτό *A. thaliana* στρατολόγησε τρία βακτηριακά στελέχη που προκάλεσαν επαγωγή της φυτικής άμυνας εναντίον του παθογόνου *Hyaloperonospora arabidopsidis*, μόνο όταν βρίσκονταν σε συνδυασμό και όχι μεμονωμένα, ενώ προσέφεραν προστασία και στη δεύτερη γενιά φυτών.

Από τη δεκαετία του 1990 μελετάται η ενεργοποίηση της ISR από τα PGPB ως μία πιθανή εφαρμογή στις γεωργικές πρακτικές (Zhang et al., 1996). Έχει αναφερθεί πως είδη του γένους *Bacillus* μπορούν να ενεργοποιήσουν τη φυτική άμυνα μέσω της ενίσχυσης είτε του SA είτε του JA/ET είτε και των δύο μονοπατιών (Niu et al. 2011; Ongena & Jacques 2008). Έχει υποθεθεί πως και το μονοπάτι του SA και το μονοπάτι του JA/ET ενεργοποιείται αρχικά από ωφέλιμα βακτήρια, ωστόσο, το μονοπάτι του SA καταστέλλεται κατά την επίθεση του παθογόνου (Chowdhury et al., 2015). Σε άλλη μελέτη, χρήση αυξανόμενων συγκεντρώσεων του βακτηριακού στελέχους *B. subtilis* MBI600 έδειξε πως ο συνεργισμός ή ανταγωνισμός μεταξύ ISR και SAR εξαρτάται από την αφθονία των μικροβιακών διεγερτών που αντιλαμβάνεται το φυτό (Dimoroulou et al., 2019).

Η διερεύνηση της ικανότητας βιολογικής αντιμετώπισης μέσω ενεργοποίησης της άμυνας φυτών τομάτας πραγματοποιήθηκε με τον ίδιο πειραματικό σχεδιασμό της δοκιμής προώθησης της ανάπτυξης προσθέτοντας ένα επιπλέον ριζοπότισμα βακτηριακών καλλιεργειών στις 36 ημέρες. Ο εμβολιασμός του παθογόνου *B. cinerea* πραγματοποιήθηκε στις 37 ημέρες στο δεύτερο πραγματικό φύλλο, ενώ η έκταση της νεκρωτικής κηλίδας αξιολογήθηκε μετά από 5 ημέρες επώασης. Όλες οι μεταχειρίσεις μείωσαν την έκταση της κηλίδας από περίπου 40% έως και 75%, εκτός από τη μεταχείριση του στελέχους Tel34, η οποία πέτυχε μείωση περίπου 25%. Τα μεμονωμένα στελέχη τα οποία μείωσαν εξαιρετικά σημαντικά την έκταση της νεκρωτικής κηλίδας σε σύγκριση με το μάρτυρα (83.3 mm), ήταν τα Tel52 (16.3 mm), Ter90 (12.4 mm), Hir139 (8.5 mm), καθώς και το μίγμα Tel34-Hir139 (6.5 mm). Η μέση έκταση της νεκρωτικής κηλίδας στη μεταχείριση Hir4-Tel52 είναι παρόμοια με την τιμή της μεταχείρισης Hir4 και είναι κατά πολύ μεγαλύτερη της μεταχείρισης Tel52. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει πως υπάρχει ανταγωνισμός μεταξύ των στελεχών που είτε μειώνει τον πληθυσμό του στελέχους Tel52, είτε μειώνει την επίδοσή του, είτε το στέλεχος αναγκάζεται να αποικίσει άλλα σημεία της ριζόσφαιρας και δεν έχει τόσο άμεση επίδραση. Η μεταχείριση Tel34-

Ter90 παρουσίασε τιμές ενδιάμεσες των μεταχειρίσεων Tel34 και Ter90, κάτι που συμφωνεί με το πείραμα προώθησης της ανάπτυξης και συνάδει με τη μείωση του πληθυσμού του στελέχους Ter90 που παρατηρήθηκε σε εκείνο το πείραμα. Τέλος, η εφαρμογή του μίγματος Tel34-Hir139 είχε ως αποτέλεσμα την εξαιρετική μείωση της νεκρωτικής κηλίδας με μέση τιμή παρόμοια με τη μεταχείριση Hir139 από στατιστικής πλευράς, αν και αριθμητικά μικρότερη. Έτσι, παρά τη φαινομενική μείωση που υφίσταται ο πληθυσμός του Hir139 σύμφωνα με το πείραμα της προώθησης της φυτικής ανάπτυξης, φαίνεται πως ο υπάρχων πληθυσμός του ή οι δευτερογενείς μεταβολίτες που παράγει είναι σε ποσότητα ικανή να πυροδοτήσουν την ενεργοποίηση της φυτικής άμυνας.

Ως βακτηριακοί διεγέρτες της φυτικής άμυνας μπορούν να λειτουργήσουν τα ίδια τα βακτηριακά κύτταρα ή δομικές ενώσεις του κυττάρου (Stringlis et al., 2018a; Portieles et al., 2021; Oukala et al., 2021; Vanthema et al., 2021), ενώσεις του φυτικού κυτταρικού τοιχώματος που απελευθερώνονται μετά τη δράση λυτικών ενζύμων των ενδόφυτων (Wang et al., 2021), ρυθμιστές της φυτικής ανάπτυξης, όπως η ένωση Acetoin (Fincheira & Quiroz, 2018; Peng et al., 2019; Pršić & Ongena, 2020), και αντιμικροβιακοί ή άλλοι δευτερογενείς μεταβολίτες (Cecchini et al., 2018; Wu et al., 2018; Pršić & Ongena, 2020). Το λιποπεπτίδιο Surfactin έχει βρεθεί να επάγει τη διασυστηματική άμυνα των φυτών (Cawoy et al., 2014; Debois et al., 2015), με μία μελέτη να το αναφέρει ως το κύριο λιποπεπτίδιο που προκαλεί την επαγωγή της διασυστηματικής αντοχής (Garcia-Gutiérrez et al., 2013). Σε άλλη μελέτη, μέσω μεταλλαγμάτων του στελέχους *B. velezensis* GA1, αποδείχθηκε πως τα λιποπεπτίδια Fengycin και Iturin είναι απαραίτητα για να επάγουν ISR εναντίον του φυτοπαθογόνου μύκητα *Pyricularia oryzae* στο ρύζι (Lam et al., 2021). Τα λιποπεπτίδια Iturin και Surfactin που ανιχνεύθηκαν στο υπερκείμενο καλλιέργειας του στελέχους *B. amyloliquefaciens* S13-3 φαίνεται να ήταν υπεύθυνα για την ενεργοποίηση γονιδίων άμυνας σε φύλλα που είχαν δεχθεί μεταχείριση, αλλά και σε φύλλα που δεν είχαν δεχθεί μεταχείριση (διασυστηματική σηματοδότηση), μειώνοντας τη σοβαρότητα της ασθένειας από το φυτοπαθογόνο *Colletotrichum gloeosporioides* στη φράουλα (Yamamoto et al., 2015). Μεταλλαγμένα παράγωγα στελέχη του *B. velezensis* SQR9, ανέκανα να παράγουν έναν από τους δευτερογενείς μεταβολίτες Fengycin, Bacillomycin D, Surfactin, Bacillaene, Macrolactin, Difficidin, Bacilysin φάνηκε πως δεν είχαν την ικανότητα να επάγουν το ίδιο ισχυρά την άμυνα φυτών *A. thaliana* έναντι των παθογόνων *B. cinerea* και *P. syringae* pv. tomato DC300 σε σύγκριση με το στέλεχος αγρίου τύπου, ενώ η κάθε ένωση είχε επίδραση στην έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων επηρεάζοντας με αυτόν τον τρόπο έναντι ποιού παθογόνου αποκτά άμυνα το φυτό (Wu et al., 2018). Η ένωση Bacilysin φαίνεται να ήταν πολύ αποτελεσματική στην επαγωγή της άμυνας έναντι του *B. cinerea* (Wu et al., 2018).

Όλα τα επιλεγμένα στελέχη έχουν τη γενετική ικανότητα να παράγουν ρυθμιστές της φυτικής ανάπτυξης, αντιμικροβιακούς δευτερογενείς μεταβολίτες και λυτικά ένζυμα, ενώ κάποια από αυτά τα χαρακτηριστικά έχουν αποδειχθεί με *in vitro* δοκιμές. Το στέλεχος Tel34 δεν παράγει λιποπεπτίδια των οικογενειών Iturins και Fengycins σε αντίθεση με τα υπόλοιπα στελέχη, ενώ δεν παράγει και αντιμικροβιακές ενώσεις όπως Bacillaene, Subtilosin, Plantazolicin, Difficidin και Macrolactin. Όπως

στη διερεύνηση της ικανότητας παρεμπόδισης των μυκήτων στους καρπούς, έτσι και στο συγκεκριμένο πείραμα ίσως έγκειται εκεί η μειωμένη δράση του σε σχέση με τα υπόλοιπα στελέχη. Καθώς η ένωση Surfactin (Cawoy et al., 2014), αλλά και άλλες ενώσεις, όπως και τα ίδια τα βακτηριακά κύτταρα μπορούν να επάγουν τη διασυστηματική άμυνα, ίσως εκεί να οφείλεται η μικρή αποτελεσματικότητα που παρατηρείται στη μεταχείριση Tel34. Το στέλεχος Hir139 είχε ίδιο γενετικό υπόβαθρο με το στέλεχος Tel52, με δυνατότητα παραγωγής ισχυρών μεταβολιτών, ενώ το Hir139 φάνηκε να παράγει *in vitro* τους περισσότερους μεταβολίτες που προβλέφθηκαν από το antiSMASH, όπως και πολλές ομόλογες ενώσεις του ισχυρού λιποπεπτιδίου Bacillomycin D. Σε συνδυασμό με την επίτευξη του δεύτερου καλύτερου αποικισμού, είναι λογικό αυτό το στέλεχος να έχει τη μεγαλύτερη μείωση της νεκρωτικής κηλίδας. Παρά το παρόμοιο γενετικό δυναμικό του στελέχους Tel52, δεν πέτυχε ίδια μείωση της νεκρωτικής κηλίδας με το Hir139, ίσως λόγω του χαμηλότερου αποικισμού του. Το στέλεχος Ter90 παρ'όλο που έχει έλλειψη σε Iturins, έδειξε ισχυρή αντιμικροβιακή δράση *in vitro* και στις δοκιμές αποκομμένων καρπών, όπως και μεγάλη μείωση της νεκρωτικής κηλίδας. Το στέλεχος αυτό έδειξε τον καλύτερο αποικισμό απ'όλα τα στελέχη στη δοκιμή προώθησης της ανάπτυξης της τομάτας, γεγονός που ίσως βοήθησε και στην επαγωγή της φυτικής άμυνας.

Ακόμη, ελέγχθηκε η έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με την άμυνα των φυτών κατά τον εμβολιασμό με τα βακτηριακά στελέχη ως μεμονωμένα και μίγματα στελεχών. Δείγματα φύλλων ελήφθησαν πριν το πρώτο ριζοπότισμα των βακτηρίων με τη μόνη μεταχείριση να είναι η βιοδιέγερση των σπόρων (15 ημέρες μετά τη φύτευση), ενώ η δεύτερη δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε 24 ώρες μετά το πρώτο ριζοπότισμα (16 ημέρες μετά τη φύτευση). Ελέγχθηκαν συνολικά 11 γονίδια που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες εμπλεκόμενες στη SAR ή ISR (PR1, PR2, PR3, PR5, PI-II, TomloxA, TomloxC, ERF1, ACO1, Prosystemin).

Τα γονίδια που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες PR1, PR2, PR3, PR5, PI-II, TomloxA και TomloxC δεν εκφράστηκαν σε καμία μεταχείριση. Το γονίδιο της πρωτεΐνης Prosystemin φαίνεται να εκφράστηκε σε όλες τις μεταχειρίσεις, ωστόσο η χαμηλή απόδοση της αντίδρασης δεν επέτρεψε να γίνει περαιτέρω ανάλυση και σύγκριση των επιπέδων έκφρασης. Το γονίδιο της πρωτεΐνης ACO1 εκφράστηκε σε όλες τις μεταχειρίσεις και στις δύο χρονικές στιγμές, με τις μεταχειρίσεις Tel34-Ter90, Hir139, Tel34 να έχουν στατιστική διαφορά από το μάρτυρα στις 15 ημέρες και τις μεταχειρίσεις Hil4, Tel34, Tel52, Hil4-Tel52, Tel34-Ter90 να έχουν στατιστική διαφορά από το μάρτυρα στις 16 ημέρες. Έκφραση του γονιδίου *ERF1* στις 16 ημέρες ανιχνεύθηκε στις μεταχειρίσεις Hir139, Tel34, Tel52 και Ter90, με μεγαλύτερα επίπεδα έκφρασης να παρατηρούνται στη μεταχείριση Ter90.

Η έκφραση του γονιδίου *ACO1* (ACC oxidase) είναι απαραίτητη για την βιοσύνθεση του αιθυλενίου (Ethylene, ET) και οδηγεί στην επαγωγή της ISR εναντίον νεκροτροφικών παθογόνων, χωρίς απαραίτητα την αύξηση στα επίπεδα του ET (Wang et al., 2002). Λιποπεπτίδια των οικογενειών Iturins και Fengycins έχει βρεθεί πως ενισχύουν την έκφραση του γονιδίου *ACS1* (ACC synthase), που εμπλέκεται στο ίδιο μονοπάτι με το *ACO1*, σε φυτά ρυζιού (Chandler et al., 2015). Λιποπεπτίδια

φαίνεται να έχουν επίσης αυξήσει την έκφραση των γονιδίων *ACSI* και *ACOI* σε καρπούς μανταρινιού (Tunsagool et al., 2019b). Μετά από ριζοπότισμα φυταρίων τομάτας με υπερκείμενο καλλιέργειας του στελέχους MBI600 η έκφραση των γονιδίων *ERFI* και *ACOI* σταδιακά αυξήθηκε, με το τελευταίο να φτάνει στη μέγιστη έκφραση 24 ώρες μετά την εφαρμογή (Dimoroulou et al., 2019). Διαφαίνεται μία ασυνέπεια στα αποτελέσματα της real-time και θερμοκηπίου, καθώς παρατηρείται πιο έντονη έκφραση των γονιδίων *ACOI* και *ERFI* σε μεταχειρίσεις οι οποίες δεν έδειξαν μεγάλη μείωση της νεκρωτικής κηλίδας, όπως η Tel34, ενώ δεν παρατηρείται έκφραση σε μεταχειρίσεις οι οποίες έδειξαν τη μεγαλύτερη μείωση της κηλίδας, όπως η Tel34-Hir139. Ωστόσο, η δειγματοληψία για τη διερεύνηση έκφρασης γονιδίων πραγματοποιήθηκε αρκετά νωρίς (πριν και μετά το πρώτο ριζοπότισμα), ενώ η μελέτη καταστολής του φυτοπαθογόνου μέσω επαγωγής της διασυστηματικής αντοχής πραγματοποιήθηκε μετά το τρίτο ριζοπότισμα.

Όσον αφορά γονίδια που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες εμπλεκόμενες στη SAR, οι περισσότερες μελέτες εξετάζουν την αύξηση της έκφρασής τους σε φύλλα μετά την εφαρμογή βακτηρίων ή παραγόντων τους. Ωστόσο, έχει αναφερθεί η μεγαλύτερη έκφρασή τους στα φύλλα μετά από εμβολιασμό βακτηρίων ή βακτηριακών μεταβολιτών στη ρίζα, σε σχέση με το μάρτυρα (Niu et al., 2011; Debois et al., 2015; Takishita et al., 2018; Wu et al., 2018), αν και δεν παρατηρήθηκε κάτι τέτοιο στην παρούσα μελέτη στα συγκεκριμένα χρονικά σημεία των δειγματοληψιών. Κάποιες άλλες μελέτες έχουν παρατηρήσει μεγαλύτερη έκφραση των *PR* γονιδίων σε συνάρτηση με μόλυνση από κάποιο παθογόνο (Abdallah et al., 2017; Guo et al., 2019). Εφαρμογή λιποπεπτιδίων στα φύλλα έχει επίσης επιφέρει αύξηση της μεταγραφής *PR* πρωτεϊνών των φύλλων (Debois et al., 2015; Kawagoe et al., 2015; Park et al., 2016), ενώ κάτι αντίστοιχο έχει παρατηρηθεί και σε καρπούς (Tunsagool et al., 2019a,b). Ακόμη, έχει αναφερθεί και αύξηση της μεταγραφής των *PR* γονιδίων σε ρίζα καλαμποκιού μετά την εφαρμογή του ενδοφυτικού στελέχους *B. subtilis*, αλλά όχι των λιποπεπτιδίων του (Gond et al., 2015).

Φαίνεται πως όσον αφορά τα υπόλοιπα γονίδια που εμπλέκονται στο μονοπάτι JA/ET πέραν του *ACOI* και του *ERFI*, ίσως θα ήταν καταλληλότερη μια διαφορετική χρονική στιγμή δειγματοληψίας, στις 48 ώρες μετά το πρώτο ριζοπότισμα ή μετά το δεύτερο ή τρίτο ριζοπότισμα, όπου θα ήταν πιο κοντά και με τη μόλυνση του φυτοπαθογόνου και θα μπορούσε να συνδεθεί ο φαινότυπος με την έκφραση των γονιδίων. Στη μελέτη των Zhou και συνεργατών (2021) η προσθήκη της ένωσης Fengycin (20 μM) στο έδαφος είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της έκφρασης του γονιδίου *LoxD* σε φύλλα τομάτας, με μέγιστη έκφραση στις 24 ώρες μετά την εφαρμογή, κατά την εφαρμογή του βακτηρίου *B. cabrialesii* BH5, η έκφραση του *LoxD* δεν ανιχνεύθηκε στις 24 ώρες και ήταν μέγιστη στις 48 ώρες, ενώ το γονίδιο PI-II είχε μέγιστη έκφραση στις 48 ώρες και στις 2 μεταχειρίσεις, με μηδενική έκφραση του στη μεταχείριση BH5. Ακόμη, έχει αναφερθεί πως σε αντίθεση με τα φυτοπαθογόνα, οι ωφέλιμοι μικροοργανισμοί φαίνεται να πυροδοτούν ήπιες ανοσολογικές αποκρίσεις που δεν επηρεάζουν ιδιαίτερα το μεταγράφομα του φυτού (Wang et al., 2005; Beckers & Conrath, 2007; Lakshmanan et al., 2013; Dimoroulou et al., 2019). Για παράδειγμα, στη μελέτη των

Dimoroulou και συνεργατών (2019) το στέλεχος *B. subtilis* MBI600 προκάλεσε ήπια ενεργοποίηση της ανοσοποιητικής απόκρισης με αύξηση της έκφρασης των γονιδίων *pr1b1* και *loxD* 3 ημέρες μετά την εφαρμογή ως ριζοπότισμα σε φυτά τομάτας, ενώ δεν ανιχνεύθηκε έκφραση άλλων γονιδίων που εξετάστηκαν.

5.9 Υπάρχει συνάφεια μεταξύ *in vitro* και *in vivo* δράσης;

Χαρακτηριστικά των επιλεγμένων στελεχών όπως η ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου και η ομαδική κίνηση σε επιφάνειες φαίνεται να μεταφέρονται και σε συνθήκες εκτός εργαστηριακής μελέτης, όπως οι καρποί και η ριζόσφαιρα τομάτας, καθώς όλα τα στελέχη αποίκισαν αυτά τα περιβάλλοντα. Ωστόσο, παρ'όλο που το στέλεχος Tel34 έδειξε τη μεγαλύτερη ικανότητα ομαδικής κίνησης *in vitro*, είχε τις χαμηλότερες τιμές αποικισμού στη ριζόσφαιρα τομάτας αλλά και στους αποκομμένους καρπούς, γεγονός που ίσως συνδέεται και με τη χαμηλή ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου που παρατηρήθηκε *in vitro* ή την ανικανότητα να ανταγωνιστεί τον αυτόχθονα μικροβιακό πληθυσμό.

Όσον αφορά τη φυτική ανάπτυξη, στα *in vitro* πειράματα *A. thaliana* Col-0 τα επιλεγμένα στελέχη Hil4, Hir139, Tel52, Ter90 είχαν εντυπωσιακό φαινότυπο στη μικρότερη συγκέντρωση, ενώ το Tel34 είχε εντυπωσιακή επίδραση όταν εμβολιάστηκε σε μεγαλύτερη συγκέντρωση. Όταν εξετάστηκαν στην τομάτα σε *in vitro* συνθήκες όλες οι μεταχειρίσεις των στελεχών είχαν αυξημένα χαρακτηριστικά σε σχέση με το μάρτυρα, με τα στελέχη Hil4, Hir139 και Tel34 να ανήκουν στα καλύτερα στελέχη από όλα τα στελέχη που εξετάστηκαν. Ωστόσο, σε συνθήκες θερμοκηπίου, μόνο το στέλεχος Ter90 έδωσε καλά αποτελέσματα με στατιστικά σημαντική διαφορά από το μάρτυρα, ενώ τα στελέχη Hil4 και Tel34 είχαν από τις χαμηλότερες τιμές. Ωστόσο, το γεγονός αυτό ίσως να οφείλεται στη χαμηλότερη ικανότητα αποικισμού τους στο συγκεκριμένο υπόστρωμα και φυτικό είδος. Σε άλλη μία μελέτη έχει υπογραμμιστεί το γεγονός πως ικανά στελέχη μπορούν να εντοπιστούν μέσω δοκιμών σε γλάστρες σε διάφορα φυτά και υποστρώματα, καθώς οι *in vitro* δοκιμές προώθησης της ανάπτυξης των φυτών είναι αναξιόπιστες (Akinrinlola et al., 2018).

Όσον αφορά την παρεμπόδιση φυτοπαθογόνων μυκήτων, το στέλεχος Tel34 έδειχνε περισσότερο υποσχόμενο στις *in vitro* δοκιμές απ'ότι παρατηρήθηκε στις δοκιμές στους καρπούς. Κάτι ανάλογο παρατηρήθηκε και για το στέλεχος Hil4 που είχε ίδια ικανότητα με τα υπόλοιπα στελέχη στην *in vitro* παρεμπόδιση, αλλά ήταν λιγότερο ικανό στις δοκιμές των αποκομμένων καρπών σε σύγκριση με τα υπόλοιπα στελέχη.

5.10 Θα επιλεγόταν κάποιο μίγμα έναντι των μεμονωμένων βακτηριακών στελεχών;

Καλύτερο μίγμα από όλα τα μεμονωμένα στελέχη με στατιστικά σημαντική διαφορά από αυτά δεν παρατηρήθηκε σε κάποια από τις δοκιμές προώθησης της ανάπτυξης των φυτών ή βιολογικής

αντιμετώπισης, ωστόσο το μίγμα Hil4-Tel52 ήταν καλύτερο από μεμονωμένα στελέχη που το απαρτίζουν στις δοκιμές προώθησης της ανάπτυξης φυτών τομάτας και καταπολέμησης της τεφράς σήψης στα τοματίνια.

Όσον αφορά τα μεμονωμένα στελέχη το στέλεχος Ter90 φάνηκε πως ήταν το καλύτερο στέλεχος στη δοκιμή προώθησης της φυτικής ανάπτυξης, ενώ είχε καλά αποτελέσματα και στις δοκιμές βιολογικής αντιμετώπισης στους καρπούς, και στις δοκιμές βιολογικής αντιμετώπισης μέσω επαγωγής της φυτικής άμυνας. Το στέλεχος Hir139 φάνηκε να είναι το πιο δυνατό όσον αφορά την αντιμετώπιση των φυτοπαθογόνων μυκήτων, ενώ στη δοκιμή προώθησης της φυτικής ανάπτυξης είχε παρόμοιες τιμές με το μάρτυρα.

5.11 Η συμβατότητα σε *in vitro* δοκιμές προβλέπει τη συμβατότητα στους φυτικούς ιστούς και τη ριζόσφαιρα; Παρατηρήθηκε εξάρτηση συμβατότητας και επιτυχημένου μίγματος;

Μέσα από τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης μελέτης διαφάνηκε πως οι δοκιμές συμβατότητας σε *in vitro* συνθήκες δεν προβλέπουν πάντα τη συμβατότητα που θα έχει το μίγμα και σε συνθήκες εκτός εργαστηρίου, ενώ μπορεί διαφορετικές *in vitro* δοκιμές να δώσουν διαφορετικά αποτελέσματα. Ακόμη, οι ενδείξεις ανταγωνισμού μπορεί να διαφέρουν σε εφαρμογές *ex vivo* και *in planta*, καθώς και από φυτό σε φυτό. Στη συγκεκριμένη μελέτη διαφάνηκε πως η επιτυχία του μίγματος εξαρτάται από τον πληθυσμό του πιο ικανού στελέχους για το εκάστοτε χαρακτηριστικό, ενώ ισχυρός αποικισμός του εκάστοτε περιβάλλοντος μπορεί να οδηγήσει και σε αυξημένη ωφέλιμη δράση. Έτσι, μπορεί να χρειάζεται ο εμβολιασμός των στελεχών σε διαφορετική αναλογία από την 1:1 ώστε το πιο ικανό στέλεχος να βρίσκεται σε μεγαλύτερη ποσότητα, ανάλογα με την κάθε δοκιμή και το περιβάλλον όπου εμβολιάζονται.

5.11.1 Μίγμα Hil4-Tel52

Όσον αφορά το μίγμα Hil4-Tel52 φαίνεται πως τα αποτελέσματα *in vitro* συμβατότητας συνάδουν κατά μεγάλο ποσοστό με τα αποτελέσματα συμβατότητας στις δοκιμές σε καρπούς και φυτά. Σε *in vitro* συνθήκες εντοπίστηκε χαμηλή ανταγωνιστικότητα μεταξύ των στελεχών Hil4 και Tel52, με το Tel52 να είναι λίγο πιο επιθετικό. Στις δοκιμές αποικισμού ριζών *A. thaliana* Col-0 *in vitro*, πληγών σε αποκομμένα τοματίνια και αποικισμού ριζόσφαιρας φυτών τομάτας στο θερμοκήπιο δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση του πληθυσμού των στελεχών στο μίγμα σε σχέση με το μεμονωμένο εμβολιασμό τους. Μάλιστα, οι πληθυσμοί αυξήθηκαν όταν εμβολιάστηκαν σε φυτά τομάτας ως μίγμα. Αντίθετα, στα σταφύλια ο πληθυσμός του Tel52 μειώθηκε σε σχέση με το μεμονωμένο του εμβολιασμό, γεγονός που φανερώνει ανταγωνισμό.

Το μίγμα Hil4-Tel52 ήταν πιο αποτελεσματικό από την εφαρμογή των μεμονωμένων στελεχών στη δοκιμή που αφορούσε τα αποκομμένα τοματίνια με συγκέντρωση εφαρμογής 10^6 CFU/ml (απουσία ανταγωνισμού) ενώ είχε ενδιάμεση αποτελεσματικότητα στη δοκιμή με τα αποκομμένα σταφύλια (παρουσία ανταγωνισμού), υποδεικνύοντας πως η μείωση του πληθυσμού του Tel52 στο μίγμα είναι καθοριστική για τη δράση του. Επίσης πιο αποτελεσματικό από τα μεμονωμένα στελέχη ήταν στη δοκιμή αποικισμού ριζόσφαιρας τομάτας, όπου όχι μόνο δεν υπήρχε ανταγωνισμός, αλλά αυξήθηκαν και οι δύο πληθυσμοί, υποδηλώνοντας πως ίσως εκεί οφείλεται η καλύτερη δράση του μίγματος.

Στις δοκιμές όπου δεν προσδιορίστηκαν οι βακτηριακοί πληθυσμοί, δηλαδή στη δοκιμή που αφορούσε τα αποκομμένα τοματίνια με συγκέντρωση εμβολιασμού 10^8 CFU/ml και στη δοκιμή καταπολέμησης του μύκητα *B. cinerea* μέσω ενεργοποίησης της φυτικής άμυνας, παρατηρήθηκε πως οι τιμές του μίγματος ομοιάζαν με τις τιμές του στελέχους Hil4 εμφανίζοντας μικρότερη αποτελεσματικότητα από το Tel52. Έτσι, ίσως σε αυτές τις δοκιμές να υπήρξε μείωση του πληθυσμού του Tel52 σε συνύπαρξη με το Hil4.

5.11.2 Μίγμα Tel34-Ter90

Όσον αφορά το μίγμα Tel34-Ter90 η *in vitro* συμβατότητα δε φαίνεται να συνάδει με τη συμβατότητα των δοκιμών στους καρπούς και τη ριζόσφαιρα τομάτας. Τα στελέχη Tel34 και Ter90 δεν εμφάνισαν ανταγωνιστικότητα μεταξύ τους ούτε στις δοκιμές συμβατότητας που πραγματοποιήθηκαν, ούτε κατά τη διερεύνηση του αποικισμού σε ρίζες *A.thaliana*. Ανταγωνιστικότητα δεν εμφανίστηκε, επίσης, στη δοκιμή με τα αποκομμένα σταφύλια. Ωστόσο, στις δοκιμές με τα αποκομμένα τοματίνια και τον αποικισμό της ριζόσφαιρας φυτών τομάτας, ο πληθυσμός του Ter90 μειώθηκε κατά τη συνύπαρξή του με το Tel34.

Σε άλλες μελέτες έχει δειχθεί πως στέλεχος του είδους *B. safensis* ήταν ανταγωνιστικό ως προς στέλεχος *B. subtilis* όταν το τελευταίο στρώθηκε σε θρεπτικό μέσο (Lyons & Kolter, 2017), όπως και ότι η ένωση Safencin έδειξε αντιμικροβιακή δράση έναντι στελέχους *B. subtilis* (Romero-Severson et al., 2021), κάτι που θα εξηγούσε την ανταγωνιστική δράση του Tel34 προς το *B. subtilis* στις μελέτες αποικισμού. Ωστόσο στη συγκεκριμένη μελέτη δεν παρατηρήθηκε ανταγωνιστικότητα στις δοκιμές *in vitro*.

Στις περισσότερες δοκιμές η μεταχείριση του μίγματος Tel34-Ter90 έδειξε τιμές ενδιάμεσες των δύο μεμονωμένων στελεχών. Η μείωση του πληθυσμού του Ter90 στις δοκιμές της δράσης σε αποκομμένα τοματίνια και του αποικισμού σε ριζόσφαιρα τομάτας πιθανώς συντέλεσε στην ενδιάμεση αποτελεσματικότητα που παρατηρήθηκε στο μίγμα. Αντίθετα, στη δοκιμή της δράσης σε αποκομμένα σταφύλια, όπου δεν παρατηρήθηκε ανταγωνισμός, η αποτελεσματικότητα του μίγματος και του Ter90 ήταν παρόμοια. Παρόμοια ήταν και στη δοκιμή παρεμπόδισης της τεφράς σήψης σε τοματίνια με εφαρμογή συγκέντρωσης 10^8 CFU/ml, υποδεικνύοντας πως πιθανώς ούτε εκεί μειώθηκε ο πληθυσμός του Ter90. Ωστόσο, στη δοκιμή καταπολέμησης του *B. cinerea* μέσω επαγωγής της

διασυστηματικής αντοχής των φυτών η αποτελεσματικότητα του μίγματος ήταν ενδιάμεση των δύο μεμονωμένων στελεχών.

5.11.3 Μίγμα Tel34-Hir139

Όσον αφορά το μίγμα Tel34-Hir139 κατά τη δοκιμή *in vitro* συμβατότητας με το soft agar overlay assay παρατηρήθηκε ανταγωνιστικότητα του Hir139 προς το Tel34, ωστόσο κατά τη μέτρηση του αποικισμού σε ρίζες *A.thaliana* Col-0 *in vitro* παρατηρήθηκε το αντίθετο φαινόμενο όπου ο πληθυσμός του Hir139 μειώθηκε κατά μεγάλο ποσοστό σε σχέση με το μεμονωμένο εμβολιασμό του. Ο πληθυσμός του στελέχους Hir139 μειώθηκε στατιστικά σημαντικά σε σχέση με το μεμονωμένο εμβολιασμό του κατά τη δοκιμή παρεμπόδισης της τερφράς σήψης στα τοματίνια, αν και πάλι ήταν υψηλότερο σε πληθυσμό από το Tel34. Το ίδιο φαινόμενο παρατηρήθηκε και στο πείραμα προώθησης της ανάπτυξης στο θερμοκήπιο, όπου το στέλεχος Hir139 είχε στατιστικά σημαντικά μικρότερο πληθυσμό και από τη μεταχείριση του μεμονωμένου εμβολιασμού του και από το Tel34 στο μίγμα. Αντίθετα, στα αποκομμένα σταφύλια ο πληθυσμός του Hir139 αυξήθηκε, χωρίς στατιστικά σημαντική διαφορά, σε σχέση με το μεμονωμένο εμβολιασμό και χωρίς να επηρεάζει τον πληθυσμό του στελέχους Tel34. Έτσι, φαίνεται πως η μέθοδος soft agar overlay δε συμφωνεί με την πλειοψηφία των πειραμάτων, όπου ο πληθυσμός του Hir139 μειώνεται ως απόρροια του συνδυασμού του με το στέλεχος Tel34 στο μίγμα.

Ενώ στη μεγαλύτερη συγκέντρωση εμβολιασμού στα τοματίνια το μίγμα Tel34-Hir139 παρουσίασε τη μεγαλύτερη μείωση της έντασης της ασθένειας, παρόμοια με το στέλεχος Hir139, στη μικρότερη συγκέντρωση η μεταχείριση Tel34-Hir139 παρουσίασε ενδιάμεση αποτελεσματικότητα, κάτι που ίσως οφείλεται στην παρατηρούμενη μείωση του πληθυσμού του Hir139. Αντιθέτως, στα σταφύλια το μίγμα επέδειξε ίδιο αποτέλεσμα με το στέλεχος Hir139, που πιθανόν οφείλεται στο ότι ο πληθυσμός του Hir139 δεν επηρεάστηκε αρνητικά στο μίγμα. Στη δοκιμή προώθησης της ανάπτυξης στο θερμοκήπιο η μεταχείριση του μίγματος Tel34-Hir139 δεν παρουσίασε στατιστικά σημαντικές διαφορές σε σχέση με τις μεταχειρίσεις των μεμονωμένων στελεχών σχεδόν σε όλες τις παραμέτρους. Η μείωση του πληθυσμού του Hir139 πιθανώς να μην επηρέασε το αποτέλεσμα, καθώς οι μεταχειρίσεις των μεμονωμένων στελεχών είχαν παρόμοιες τιμές. Τέλος, η μεταχείριση Tel34-Hir139 εμφάνισε τιμές παρόμοιες με τη μεταχείριση Hir139, με εξαιρετικά μικρότερες τιμές από τη μεταχείριση Tel34 στην εξέταση ικανότητας βιολογικής αντιμετώπισης μέσω επαγωγής της διασυστηματικής αντοχής, υποδεικνύοντας ίσως πως ο ανταγωνισμός που παρατηρήθηκε στο πείραμα της προώθησης της φυτικής ανάπτυξης δεν επηρεάζει την ικανότητα του Hir139 να επάγει τη φυτική άμυνα.

6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η συγκεκριμένη διδακτορική διατριβή ανέδειξε ικανά βακτηριακά στελέχη που χρήζουν περαιτέρω έρευνας για χρήση ως παράγοντες προώθησης της ανάπτυξης των φυτών και βιολογικής αντιμετώπισης φυτοπαθολογών. Οι ενδοφυτικές βακτηριακές απομονώσεις εξετάστηκαν ως προς πληθώρα επιθυμητών χαρακτηριστικών σε *in vitro* συνθήκες για την επιλογή των καταλληλότερων στελεχών, ενώ τα τελικά επιλεγμένα στελέχη και τα μίγματά τους δοκιμάστηκαν σε αρκετές εφαρμογές που αφορούσαν την προώθηση της φυτικής ανάπτυξης και τη βιολογική αντιμετώπιση παθολογών μυκήτων. Η ενδεδειγμένη έρευνα και ο ευρύς χαρακτήρας των δοκιμών που πραγματοποιήθηκαν, καθώς και η εκτενής ανάλυση του γονιδιώματος των επιλεγμένων στελεχών ανοίγει το δρόμο για πιο στοχευμένες μελλοντικές έρευνες αυτών των στελεχών και διαφορετικούς συνδυασμούς τους σε πλήθος γεωργικών συστημάτων.

Ακολουθώντας την προτεινόμενη από τη βιβλιογραφία ροή εργασιών που οδηγεί στην επιλογή των κατάλληλων στελεχών, διαπιστώθηκε ότι οι *in vitro* ικανότητες δε μεταφράζονται πάντα σε ικανότητες στο θερμοκήπιο, γεγονός που πρέπει να λαμβάνεται υπ' όψιν σε μελλοντικές μελέτες. Μελετώντας τα μίγματα ζευγών βακτηρίων με βάση την προτεινόμενη ροή εργασιών διαπιστώθηκε πως το αποτέλεσμα μπορεί να εξαρτάται από το είδος της *in vitro* δοκιμής συμβατότητας, ενώ μπορεί να διαφέρει μεταξύ *in vitro* δοκιμών και δοκιμών σε αποκομμένους καρπούς ή στη ριζόσφαιρα. Επίσης, τονίζεται η σημασία της ικανότητας των βακτηριακών στελεχών να αποικίζουν τη ριζόσφαιρα ή τις πληγές των καρπών ώστε να μπορούν να έχουν ωφέλιμη δράση προς το φυτό.

Έμφαση πρέπει να δίνεται στο να πραγματοποιούνται θερμοκηπιακές δοκιμές μικρής κλίμακας στο φυτό ενδιαφέροντος ώστε να ανιχνεύονται τα πραγματικά ωφέλιμα στελέχη στο συγκεκριμένο σύστημα. Έχοντας μελετήσει αυτά τα στελέχη εκτενώς και γνωρίζοντας τις ιδιότητές τους, μελλοντικές έρευνες μπορούν να πραγματοποιηθούν με διαφορετικά φυτά και καρπούς, παθογόνα, και επιλογή συγκεκριμένου μεμονωμένου στελεχούς ή συνδυασμού στελεχών, ανάλογα με την επιθυμητή έκβαση. Από τη συγκεκριμένη μελέτη αναδείχθηκαν δύο πολύ σημαντικά βακτήρια, τα στελέχη Ter90 και Hir139, τα οποία θα μπορούσαν στο μέλλον να δοκιμαστούν ως μεμονωμένα και ως μίγμα σε ένα εύρος φυτών και συνθηκών για την εξέταση της ικανότητας προώθησης της φυτικής ανάπτυξης και τη βιολογική αντιμετώπιση ασθενειών.

Χρειάζονται περαιτέρω μελέτες και σε άλλα φυτικά συστήματα, καθώς και σε συνθήκες πεδίου, ώστε να μπορέσει να αναπτυχθεί ένα μικροβιακό σκεύασμα που δε θα παρουσιάζει ασυνέπεια δράσης μεταξύ διαφορετικών φυτών, υποστρωμάτων και περιβαλλοντικών συνθηκών, ενώ θα πρέπει να βελτιστοποιηθεί η συγκέντρωση του στελεχούς, τα χρονικά σημεία εφαρμογής, καθώς και ο τρόπος εφαρμογής. Ακόμη, θα μπορούσε να δοκιμαστεί η χρήση του στελεχούς ή του μίγματος στελεχών σε συνδυασμό με μειωμένη δόση φυτοπροστατευτικών προϊόντων ή σε διαδοχικές εφαρμογές.

7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abdallah RAB, Jabnoun-Khiareddine H, Nefzi A & Daami-Remadi M (2018) Evaluation of the growth-promoting potential of endophytic bacteria recovered from healthy tomato plants. *Journal of Horticulture* **5**: 1-10.
- Abdallah RAB, Stedel C, Garagounis C, Nefzi A, Jabnoun-Khiareddine H, Papadopoulou KK & Daami-Remadi M (2017) Involvement of lipopeptide antibiotics and chitinase genes and induction of host defense in suppression of *Fusarium* wilt by endophytic *Bacillus* spp. in tomato. *Crop Protection* **99**: 45-58.
- Abo Elsoud MM & El Kady E (2019) Current trends in fungal biosynthesis of chitin and chitosan. *Bulletin of the National Research Centre* **43**: 1-12.
- Acedo JZ, Chiorean S, Vederas JC & van Belkum MJ (2018) The expanding structural variety among bacteriocins from Gram-positive bacteria. *FEMS microbiology reviews* **42**: 805-828.
- Adesemoye AO & Kloepper JW (2009) Plant-microbes interactions in enhanced fertilizer-use efficiency. *Applied microbiology and biotechnology* **85**: 1-12.
- Aerts N, Pereira Mendes M & Van Wees SC (2021) Multiple levels of crosstalk in hormone networks regulating plant defense. *The Plant Journal* **105**: 489-504.
- Afzal I, Shinwari ZK, Sikandar S & Shahzad S (2019) Plant beneficial endophytic bacteria: mechanisms, diversity, host range and genetic determinants. *Microbiological research* **221**: 36-49.
- Agarwal H, Dowarah B, Baruah PM, Bordoloi KS, Krishnatreya DB & Agarwala N (2020) Endophytes from *Gnetum gnemon* L. can protect seedlings against the infection of phytopathogenic bacterium *Ralstonia solanacearum* as well as promote plant growth in tomato. *Microbiological Research* **238**: 126503.
- Agrawal T & Kotasthane AS (2012) Chitinolytic assay of indigenous *Trichoderma* isolates collected from different geographical locations of Chhattisgarh in Central India. *SpringerPlus* **1**: 1-10.
- Ahemad M & Kibret M (2014) Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: current perspective. *Journal of King saud University-science* **26**: 1-20.
- Ahmed E & Holmström SJ (2014) Siderophores in environmental research: roles and applications. *Microbial biotechnology* **7**: 196-208.
- Akinrinlola RJ, Yuen GY, Drijber RA & Adesemoye AO (2018) Evaluation of *Bacillus* strains for plant growth promotion and predictability of efficacy by *in vitro* physiological traits. *International journal of microbiology* **2018**.
- Aktar MW, Sengupta D & Chowdhury A (2009) Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards. *Interdisciplinary toxicology* **2**: 1.
- Al-Ali A, Deravel J, Krier F, Béchet M, Ongena M & Jacques P (2018) Biofilm formation is determinant in tomato rhizosphere colonization by *Bacillus velezensis* FZB42. *Environmental Science and Pollution Research* **25**: 29910-29920.
- Aleti G, Sessitsch A & Brader G (2015) Genome mining: prediction of lipopeptides and polyketides from *Bacillus* and related *Firmicutes*. *Computational and structural biotechnology journal* **13**: 192-203.
- AlGhuri A, Volski A, Cugini C, Walsh EM, Chistyakov VA, Mazanko MS, Bren AB, Dicks LM & Chikindas ML (2016) Safety properties and probiotic potential of *Bacillus subtilis* KATMIRA1933

and *Bacillus amyloliquefaciens* B-1895. *Advances in Microbiology* **6**: 432-452.

Ali J, Sharma DC, Bano A, Gupta A, Sharma S, Bajpai P & Pathak N (2019) Exploiting microbial enzymes for augmenting crop production. *Enzymes in Food Biotechnology*, p. pp. 503-519. Elsevier.

Alori ET, Glick BR & Babalola OO (2017) Microbial phosphorus solubilization and its potential for use in sustainable agriculture. *Frontiers in microbiology* **8**: 971.

Alreshidi M, Noumi E, Bouslama L, Ceylan O, Veettil VN, Adnan M, Danciu C, Elkahoui S, Badraoui R & Al-Motair KA (2020) Phytochemical screening, antibacterial, antifungal, antiviral, cytotoxic, and anti-quorum-sensing properties of *Teucrium polium* l. aerial parts methanolic extract. *Plants* **9**: 1418.

Alvarez F, Castro M, Principe A, Borioli G, Fischer S, Mori G & Jofre E (2012) The plant-associated *Bacillus amyloliquefaciens* strains MEP218 and ARP23 capable of producing the cyclic lipopeptides iturin or surfactin and fengycin are effective in biocontrol of sclerotinia stem rot disease. *Journal of applied microbiology* **112**: 159-174.

Alvin A, Miller KI & Neilan BA (2014) Exploring the potential of endophytes from medicinal plants as sources of antimycobacterial compounds. *Microbiological research* **169**: 483-495.

Amaya-Gómez CV, Porcel M, Mesa-Garriga L & Gómez-Álvarez MI (2020) A framework for the selection of plant growth-promoting rhizobacteria based on bacterial competence mechanisms. *Applied and environmental microbiology* **86**: e00760-00720.

Ambrico A & Trupo M (2017) Efficacy of cell free supernatant from *Bacillus subtilis* ET-1, an Iturin A producer strain, on biocontrol of green and gray mold. *Postharvest Biology and Technology* **134**: 5-10.

Andreolli M, Lampis S, Zapparoli G, Angelini E & Vallini G (2016) Diversity of bacterial endophytes in 3 and 15 year-old grapevines of *Vitis vinifera* cv. Corvina and their potential for plant growth promotion and phytopathogen control. *Microbiological research* **183**: 42-52.

Andrews M, Raven J & Lea P (2013) Do plants need nitrate? The mechanisms by which nitrogen form affects plants. *Annals of applied biology* **163**: 174-199.

Antoniou A, Tsolakidou M-D, Stringlis IA & Pantelides IS (2017) Rhizosphere microbiome recruited from a suppressive compost improves plant fitness and increases protection against vascular wilt pathogens of tomato. *Frontiers in plant science* **8**: 2022.

Arfaoui M, Vallance J, Bruez E, Rezgui A, Melki I, Chebil S, Sadfi-Zouaoui N & Rey P (2019) Isolation, identification and *in vitro* characterization of grapevine rhizobacteria to control ochratoxigenic *Aspergillus* spp. on grapes. *Biological Control* **129**: 201-211.

Arrebola E, Jacobs R & Korsten L (2010) Iturin A is the principal inhibitor in the biocontrol activity of *Bacillus amyloliquefaciens* PPCB004 against postharvest fungal pathogens. *Journal of Applied Microbiology* **108**: 386-395.

Arrigoni E, Antonielli L, Pindo M, Pertot I & Perazzolli M (2018) Tissue age and plant genotype affect the microbiota of apple and pear bark. *Microbiological research* **211**: 57-68.

Arroyave-Toro JJ, Mosquera S & Villegas-Escobar V (2017) Biocontrol activity of *Bacillus subtilis* EA-CB0015 cells and lipopeptides against postharvest fungal pathogens. *Biological control* **114**: 195-200.

Arseneault T & Fillion M (2017) Biocontrol through antibiosis: exploring the role played by subinhibitory concentrations of antibiotics in soil and their impact on plant pathogens. *Canadian Journal of Plant Pathology* **39**: 267-274.

Asari S, Tarkowská D, Rolčik J, Novák O, Palmero DV, Bejai S & Meijer J (2017) Analysis of plant

- growth-promoting properties of *Bacillus amyloliquefaciens* UCMB5113 using *Arabidopsis thaliana* as host plant. *Planta* **245**: 15-30.
- Ayan AK & Çirak C (2008) Hypericin and Pseudohypericin contents in some *Hypericum* species growing in Turkey. *Pharmaceutical biology* **46**: 288-291.
- Babasaki K, Takao T, Shimonishi Y & Kurahashi K (1985) Subtilosin A, a new antibiotic peptide produced by *Bacillus subtilis* 168: isolation, structural analysis, and biogenesis. *The Journal of Biochemistry* **98**: 585-603.
- Babu AN, Jogaiah S, Ito S-i, Nagaraj AK & Tran L-SP (2015) Improvement of growth, fruit weight and early blight disease protection of tomato plants by rhizosphere bacteria is correlated with their beneficial traits and induced biosynthesis of antioxidant peroxidase and polyphenol oxidase. *Plant Science* **231**: 62-73.
- Backer R, Rokem JS, Ilangumaran G, Lamont J, Praslickova D, Ricci E, Subramanian S & Smith DL (2018) Plant growth-promoting rhizobacteria: context, mechanisms of action, and roadmap to commercialization of biostimulants for sustainable agriculture. *Frontiers in plant science* **9**: 1473.
- Bacon CW, Hinton DM, Mitchell TR, Snook ME & Olubajo B (2012) Characterization of endophytic strains of *Bacillus mojavensis* and their production of surfactin isomers. *Biological Control* **62**: 1-9.
- Bailly A, Groenhagen U, Schulz S, Geisler M, Eberl L & Weisskopf L (2014) The inter- kingdom volatile signal indole promotes root development by interfering with auxin signalling. *The Plant Journal* **80**: 758-771.
- Bakker PA, Berendsen RL, Doornbos RF, Wintermans PC & Pieterse CM (2013) The rhizosphere revisited: root microbiomics. *Frontiers in plant science* **4**: 165.
- Bakker PA, Berendsen RL, Van Pelt JA, Vismans G, Yu K, Li E, Van Bentum S, Poppeliers SW, Gil JJS & Zhang H (2020) The soil-borne identity and microbiome-assisted agriculture: looking back to the future. *Molecular Plant* **13**: 1394-1401.
- Baldan E, Nigris S, Romualdi C, D'Alessandro S, Clocchiatti A, Zottini M, Stevanato P, Squartini A & Baldan B (2015) Beneficial bacteria isolated from grapevine inner tissues shape *Arabidopsis thaliana* roots. *PLoS One* **10**: e0140252.
- Balderas-Ruiz KA, Gómez-Guerrero CI, Trujillo-Roldán MA, Valdez-Cruz NA, Aranda-Ocampo S, Juárez AM, Leyva E, Galindo E & Serrano-Carreón L (2021) *Bacillus velezensis* 83 increases productivity and quality of tomato (*Solanum lycopersicum* L.): pre and postharvest assessment. *Current Research in Microbial Sciences* 100076.
- Balleza D, Alessandrini A & García MJB (2019) Role of lipid composition, physicochemical interactions, and membrane mechanics in the molecular actions of microbial cyclic lipopeptides. *The Journal of membrane biology* **252**: 131-157.
- Bargaz A, Lyamlouli K, Chtouki M, Zeroual Y & Dhiba D (2018) Soil microbial resources for improving fertilizers efficiency in an integrated plant nutrient management system. *Frontiers in microbiology* **9**: 1606.
- Barman D & Bhattacharjee K (2019) Endophytic bacteria associated with medicinal plants: the treasure trove of antimicrobial compounds. *Medically Important Plant Biomes: Source of Secondary Metabolites*, pp. 153-187. Springer.
- Bashan Y, Kloepper JW, de-Bashan LE & Nannipieri P (2016) A need for disclosure of the identity of microorganisms, constituents, and application methods when reporting tests with microbe-based or pesticide-based products. *Biology and Fertility of Soils* **52**: 283.

- Basu A, Prasad P, Das SN, Kalam S, Sayyed R, Reddy M & El Enshasy H (2021) Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) as green bioinoculants: recent developments, constraints, and prospects. *Sustainability* **13**: 1140.
- Batra P, Barkodia M, Ahlawat U, Sansanwal R & Wati L (2020) Effect of Compatible and Incompatible Endophytic Bacteria on Growth of Chickpea Plant.
- Beauregard PB, Chai Y, Vlamakis H, Losick R & Kolter R (2013) *Bacillus subtilis* biofilm induction by plant polysaccharides. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **110**: E1621-E1630.
- Béchet M, Caradec T, Hussein W, Abderrahmani A, Chollet M, Leclère V, Dubois T, Lereclus D, Pupin M & Jacques P (2012) Structure, biosynthesis, and properties of kurstakins, nonribosomal lipopeptides from *Bacillus* spp. *Applied microbiology and biotechnology* **95**: 593-600.
- Béchet M, Castéra-Guy J, Guez J-S, Chihib N-E, Coucheney F, Coutte F, Fickers P, Leclère V, Wathelet B & Jacques P (2013) Production of a novel mixture of mycosubtilins by mutants of *Bacillus subtilis*. *Bioresource technology* **145**: 264-270.
- Becker J, Eisenhauer N, Scheu S & Jousset A (2012) Increasing antagonistic interactions cause bacterial communities to collapse at high diversity. *Ecology Letters* **15**: 468-474.
- Beckers GJ & Conrath U (2007) Priming for stress resistance: from the lab to the field. *Current opinion in plant biology* **10**: 425-431.
- Belimov A, Dodd I, Safronova V, Hontzeas N & Davies W (2007) *Pseudomonas brassicacearum* strain Am3 containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase can show both pathogenic and growth-promoting properties in its interaction with tomato. *Journal of Experimental Botany* **58**: 1485-1495.
- Ben-Gad D & Gerchman Y (2017) Reclassification of *Brevibacterium halotolerans* DSM8802 as *Bacillus halotolerans* comb. nov. based on microbial and biochemical characterization and multiple gene sequence. *Current microbiology* **74**: 1-5.
- Berendsen RL, Pieterse CM & Bakker PA (2012) The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends in plant science* **17**: 478-486.
- Berendsen RL, Vismans G, Yu K, Song Y, de Jonge R, Burgman WP, Burmølle M, Herschend J, Bakker PA & Pieterse CM (2018) Disease-induced assemblage of a plant-beneficial bacterial consortium. *The ISME journal* **12**: 1496-1507.
- Berg M & Koskella B (2018) Nutrient-and dose-dependent microbiome-mediated protection against a plant pathogen. *Current Biology* **28**: 2487-2492. e2483.
- Berg G, Köberl M, Rybakova D, Müller H, Grosch R & Smalla K (2017) Plant microbial diversity is suggested as the key to future biocontrol and health trends. *FEMS microbiology ecology* **93**.
- Bergna A, Cernava T, Rändler M, Grosch R, Zachow C & Berg G (2018) Tomato seeds preferably transmit plant beneficial endophytes. *Phytobiomes Journal* **2**: 183-193.
- Berlec A (2012) Novel techniques and findings in the study of plant microbiota: search for plant probiotics. *Plant science* **193**: 96-102.
- Bertrand S, Schumpp O, Bohni N, Bujard A, Azzollini A, Monod M, Gindro K & Wolfender J-L (2013) Detection of metabolite induction in fungal co-cultures on solid media by high-throughput differential ultra-high pressure liquid chromatography–time-of-flight mass spectrometry fingerprinting. *Journal of chromatography A* **1292**: 219-228.
- Besson F, Peypoux F, Michel G & Delcambe L (1977) Structure de la bacillomycine L, antibiotique de *Bacillus subtilis*. *European Journal of Biochemistry* **77**: 61-67.

- Bianco C, Imperlini E, Calogero R, Senatore B, Pucci P & Defez R (2006) Indole-3-acetic acid regulates the central metabolic pathways in *Escherichia coli*. *Microbiology* **152**: 2421-2431.
- Bisen K, Keswani C, Mishra S, Saxena A, Rakshit A & Singh H (2015) Unrealized potential of seed biopriming for versatile agriculture. *Nutrient use efficiency: from basics to advances*, p. 193-206. Springer.
- Blin K, Shaw S, Steinke K, Villebro R, Ziemert N, Lee SY, Medema MH & Weber T (2019) antiSMASH 5.0: updates to the secondary metabolite genome mining pipeline. *Nucleic acids research* **47**: W81-W87.
- Bogino PC, Oliva MDIM, Sorroche FG & Giordano W (2013) The role of bacterial biofilms and surface components in plant-bacterial associations. *International journal of molecular sciences* **14**: 15838-15859.
- Bolívar-Anillo HJ, Garrido C & Collado IG (2020) Endophytic microorganisms for biocontrol of the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. *Phytochemistry Reviews* **19**: 721-740.
- Borah A, Das R, Mazumdar R & Thakur D (2019) Culturable endophytic bacteria of *Camellia* species endowed with plant growth promoting characteristics. *Journal of applied microbiology* **127**: 825-844.
- Bradáčová K, Florea AS, Bar-Tal A, Minz D, Yermiyahu U, Shawahna R, Kraut-Cohen J, Zolti A, Erel R & Dietel K (2019) Microbial consortia versus single-strain inoculants: an advantage in PGPM-assisted tomato production? *Agronomy* **9**: 105.
- Brandl M & Lindow S (1998) Contribution of indole-3-acetic acid production to the epiphytic fitness of *Erwinia herbicola*. *Applied and environmental microbiology* **64**: 3256-3263.
- Briat J-F, Dubos C & Gaymard F (2015) Iron nutrition, biomass production, and plant product quality. *Trends in Plant Science* **20**: 33-40.
- Brötz H, Bierbaum G, Leopold K, Reynolds PE & Sahl H-G (1998) The lantibiotic mersacidin inhibits peptidoglycan synthesis by targeting lipid II. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **42**: 154-160.
- Brown L, Wolf JM, Prados-Rosales R & Casadevall A (2015) Through the wall: extracellular vesicles in Gram-positive bacteria, mycobacteria and fungi. *Nature Reviews Microbiology* **13**: 620-630.
- Buchholz F, Kostić T, Sessitsch A & Mitter B (2018) The potential of plant microbiota in reducing postharvest food loss. Vol. 11 pp. 971-975. Wiley Online Library.
- Budding A, Ingham C, Bitter W, Vandenbroucke-Grauls C & Schneeberger P (2009) The Dienes phenomenon: competition and territoriality in swarming *Proteus mirabilis*. *Journal of bacteriology* **191**: 3892-3900.
- Busby PE, Soman C, Wagner MR, Friesen ML, Kremer J, Bennett A, Morsy M, Eisen JA, Leach JE & Dangl JL (2017) Research priorities for harnessing plant microbiomes in sustainable agriculture. *PLoS biology* **15**: e2001793.
- Butcher RA, Schroeder FC, Fischbach MA, Straight PD, Kolter R, Walsh CT & Clardy J (2007) The identification of bacillaene, the product of the PksX megacomplex in *Bacillus subtilis*. *Proceedings of the national academy of sciences* **104**: 1506-1509.
- Calvo H, Marco P, Blanco D, Oria R & Venturini M (2017) Potential of a new strain of *Bacillus amyloliquefaciens* BUZ-14 as a biocontrol agent of postharvest fruit diseases. *Food microbiology* **63**: 101-110.
- Calvo H, Mendiara I, Arias E, Blanco D & Venturini M (2019) The role of iturin A from *B.*

- amyloliquefaciens* BUZ-14 in the inhibition of the most common postharvest fruit rots. *Food microbiology* **82**: 62-69.
- Calvo H, Mendiara I, Arias E, Gracia AP, Blanco D & Venturini ME (2020) Antifungal activity of the volatile organic compounds produced by *Bacillus velezensis* strains against postharvest fungal pathogens. *Postharvest Biology and Technology* **166**: 111208.
- Calvo-Garrido C, Haidar R, Roudet J, Gautier T & Fermaud M (2018) Pre-selection in laboratory tests of survival and competition before field screening of antagonistic bacterial strains against *Botrytis* bunch rot of grapes. *Biological Control* **124**: 100-111.
- Calvo-Garrido C, Roudet J, Aveline N, Davidou L, Dupin S & Fermaud M (2019) Microbial antagonism toward *Botrytis* bunch rot of grapes in multiple field tests using one *Bacillus ginsengihumi* strain and formulated biological control products. *Frontiers in plant science* **10**: 105.
- Cao Y, Pi H, Chandransu P, Li Y, Wang Y, Zhou H, Xiong H, Helmann JD & Cai Y (2018) Antagonism of two plant-growth promoting *Bacillus velezensis* isolates against *Ralstonia solanacearum* and *Fusarium oxysporum*. *Scientific reports* **8**: 1-14.
- Cappuccino JG & Sherman N (2005) Microbiology: a laboratory manual.
- Card SD, Hume DE, Roodi D, McGill CR, Millner JP & Johnson RD (2015) Beneficial endophytic microorganisms of *Brassica*—A review. *Biological Control* **90**: 102-112.
- Cardoso V, Campos F, Santos A, Ottoni M, Rosa C, Almeida V & Grael C (2020) Biotechnological applications of the medicinal plant *Pseudobrickellia brasiliensis* and its isolated endophytic bacteria. *Journal of applied microbiology* **129**: 926-934.
- Carrión VJ, Perez-Jaramillo J, Cordovez V, Tracanna V, De Hollander M, Ruiz-Buck D, Mendes LW, Van Ijcken WF, Gomez-Exposito R & Elsayed SS (2019) Pathogen-induced activation of disease-suppressive functions in the endophytic root microbiome. *Science* **366**: 606-612.
- Carvalho FP (2017) Pesticides, environment, and food safety. *Food and energy security* **6**: 48-60.
- Castanheira NL, Dourado AC, Pais I, Semedo J, Scotti-Campos P, Borges N, Carvalho G, Crespo MTB & Fareleira P (2017) Colonization and beneficial effects on annual ryegrass by mixed inoculation with plant growth promoting bacteria. *Microbiological research* **198**: 47-55.
- Castiglione AM, Mannino G, Contartese V, Bertea CM & Ertani A (2021) Microbial Biostimulants as Response to Modern Agriculture Needs: Composition, Role and Application of These Innovative Products. *Plants* **10**: 1533.
- Castronovo LM, Vassallo A, Mengoni A, Miceli E, Bogani P, Firenzuoli F, Fani R & Maggini V (2021) Medicinal plants and their bacterial microbiota: a review on antimicrobial compounds production for plant and human health. *Pathogens* **10**: 106.
- Cawoy H, Bettiol W, Fickers P & Ongena M (2011) *Bacillus*-based biological control of plant diseases. *Pesticides in the modern world-pesticides use and management* 273-302.
- Cawoy H, Debois D, Franzil L, De Pauw E, Thonart P & Ongena M (2015) Lipopeptides as main ingredients for inhibition of fungal phytopathogens by *Bacillus subtilis/amyloliquefaciens*. *Microbial biotechnology* **8**: 281-295.
- Cawoy H, Mariutto M, Henry G, Fisher C, Vasilyeva N, Thonart P, Dommes J & Ongena M (2014) Plant defense stimulation by natural isolates of *Bacillus* depends on efficient surfactin production. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **27**: 87-100.
- Cecchini NM, Steffes K, Schläppi MR, Gifford AN & Greenberg JT (2015) *Arabidopsis* AZI1 family proteins mediate signal mobilization for systemic defence priming. *Nature communications* **6**: 1-12.

Cecchini NM, Roychoudhry S, Speed DJ, Steffes K, Tambe A, Zodrow K, Konstantinoff K, Jung HW, Engle NL & Tschaplinski TJ (2019) Underground Azelaic Acid–Conferred Resistance to *Pseudomonas syringae* in *Arabidopsis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **32**: 86-94.

Cernava T, Chen X, Krug L, Li H, Yang M & Berg G (2019) The tea leaf microbiome shows specific responses to chemical pesticides and biocontrol applications. *Science of the Total Environment* **667**: 33-40.

Chandler S, Van Hese N, Coutte F, Jacques P, Höfte M & De Vleeschauwer D (2015) Role of cyclic lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* in mounting induced immunity in rice (*Oryza sativa* L.). *Physiological and molecular plant pathology* **91**: 20-30.

Chaouachi M, Marzouk T, Jallouli S, Elkahoui S, Gentzittel L, Ben C & Djébali N (2021) Activity assessment of tomato endophytic bacteria bioactive compounds for the postharvest biocontrol of *Botrytis cinerea*. *Postharvest Biology and Technology* **172**: 111389.

Charron-Lamoureux V & Beauregard PB (2019) *Arabidopsis thaliana* seedlings influence *Bacillus subtilis* spore formation. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **32**: 1188-1195.

Chaube H & Singh U (1991) Plant disease management: principles and practices.

Chen X-H, Koumoutsi A, Scholz R & Borriss R (2009a) More than anticipated–production of antibiotics and other secondary metabolites by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Journal of molecular microbiology and biotechnology* **16**: 14-24.

Chen X, Wang Y, Gao Y, Gao T & Zhang D (2019) Inhibitory abilities of *Bacillus* isolates and their culture filtrates against the gray mold caused by *Botrytis cinerea* on postharvest fruit. *The plant pathology journal* **35**: 425.

Chen X-H, Scholz R, Borriss M, Junge H, Mögel G, Kunz S & Borriss R (2009b) Difficidin and bacilysin produced by plant-associated *Bacillus amyloliquefaciens* are efficient in controlling fire blight disease. *Journal of biotechnology* **140**: 38-44.

Chen X-H, Vater J, Piel Jr, Franke P, Scholz R, Schneider K, Koumoutsi A, Hitzeroth G, Grammel N & Strittmatter AW (2006) Structural and functional characterization of three polyketide synthase gene clusters in *Bacillus amyloliquefaciens* FZB 42. *Journal of bacteriology* **188**: 4024-4036.

Cheon HI, Yeo MS, Kim KM, Kang JS & Pyo J (2019) Determination of Siderophore from *Bacillus Mojavensis* Using Liquid Chromatography quadrupole Time-of-flight Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Life Science* **29**: 198-201.

Cheplick GP (2017) Persistence of endophytic fungi in cultivars of *Lolium perenne* grown from seeds stored for 22 years. *American journal of botany* **104**: 627-631.

Chiang K, Liu H & Bock C (2017) A discussion on disease severity index values. Part I: warning on inherent errors and suggestions to maximise accuracy. *Annals of Applied Biology* **171**: 139-154.

Chiellini C, Maida I, Emiliani G, Mengoni A, Mocali S, Fabiani A, Biffi S, Maggini V, Gori L & Vannacci A (2014) Endophytic and rhizospheric bacterial communities isolated from the medicinal plants *Echinacea purpurea* and *Echinacea angustifolia*. *Int Microbiol* **17**: 165-174.

Chowdhury SP, Uhl J, Grosch R, Alquéres S, Pittroff S, Dietel K, Schmitt-Kopplin P, Borriss R & Hartmann A (2015) Cyclic lipopeptides of *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* colonizing the lettuce rhizosphere enhance plant defense responses toward the bottom rot pathogen *Rhizoctonia solani*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **28**: 984-995.

Chu TN, Bui LV & Hoang MTT (2020) *Pseudomonas* PS01 isolated from maize rhizosphere alters root system architecture and promotes plant growth. *Microorganisms* **8**: 471.

Chun J, Oren A, Ventosa A, Christensen H, Arahal DR, da Costa MS, Rooney AP, Yi H, Xu X-W &

- De Meyer S (2018) Proposed minimal standards for the use of genome data for the taxonomy of prokaryotes. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* **68**: 461-466.
- Cob-Calan NN, Chi-Uluac LA, Ortiz-Chi F, Cerqueda-García D, Navarrete-Vázquez G, Ruiz-Sánchez E & Hernández-Núñez E (2019) Molecular docking and dynamics simulation of protein β -tubulin and antifungal cyclic lipopeptides. *Molecules* **24**: 3387.
- Cochrane SA & Vederas JC (2016) Lipopeptides from *Bacillus* and *Paenibacillus* spp.: a gold mine of antibiotic candidates. *Medicinal Research Reviews* **36**: 4-31.
- Colombo C, Palumbo G, He J-Z, Pinton R & Cesco S (2014) Review on iron availability in soil: interaction of Fe minerals, plants, and microbes. *Journal of soils and sediments* **14**: 538-548.
- Compant S, Clément C & Sessitsch A (2010) Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. *Soil Biology and Biochemistry* **42**: 669-678.
- Compant S, Samad A, Faist H & Sessitsch A (2019) A review on the plant microbiome: ecology, functions, and emerging trends in microbial application. *Journal of advanced research* **19**: 29-37.
- Compant S, Mitter B, Colli-Mull JG, Gangl H & Sessitsch A (2011) Endophytes of grapevine flowers, berries, and seeds: identification of cultivable bacteria, comparison with other plant parts, and visualization of niches of colonization. *Microbial ecology* **62**: 188-197.
- Compant S, Kaplan H, Sessitsch A, Nowak J, Ait Barka E & Clément C (2008) Endophytic colonization of *Vitis vinifera* L. by *Burkholderia phytofirmans* strain PsJN: from the rhizosphere to inflorescence tissues. *FEMS microbiology ecology* **63**: 84-93.
- Compant S, Cambon MC, Vacher C, Mitter B, Samad A & Sessitsch A (2021) The plant endosphere world—bacterial life within plants. *Environmental Microbiology* **23**: 1812-1829.
- Corral-Lugo A, Daddaoua A, Ortega A, Espinosa-Urgel M & Krell T (2016) Rosmarinic acid is a homoserine lactone mimic produced by plants that activates a bacterial quorum-sensing regulator. *Science Signaling* **9**: ra1-ra1.
- Correa OS, Montecchia MS, Berti MF, Ferrari MCF, Pucheu NL, Kerber NL & García AF (2009) *Bacillus amyloliquefaciens* BNM122, a potential microbial biocontrol agent applied on soybean seeds, causes a minor impact on rhizosphere and soil microbial communities. *Applied Soil Ecology* **41**: 185-194.
- Costa JH, Wassano CI, Angolini CFF, Scherlach K, Hertweck C & Fill TP (2019) Antifungal potential of secondary metabolites involved in the interaction between citrus pathogens. *Scientific reports* **9**: 1-11.
- Costa PBd, Granada CE, Ambrosini A, Moreira F, de Souza R, dos Passos JFM, Arruda L & Passaglia LM (2014) A model to explain plant growth promotion traits: a multivariate analysis of 2,211 bacterial isolates. *PLoS One* **9**: e116020.
- Cozzolino ME, Distel JS, García PA, Mascotti ML, Ayub MJ, Benazzi LM, Di Masi SN & Silva PG (2020) Control of postharvest fungal pathogens in pome fruits by lipopeptides from a *Bacillus* sp. isolate SL-6. *Scientia Horticulturae* **261**: 108957.
- Creus CM, Graziano M, Casanovas EM, Pereyra MA, Simontacchi M, Puntarulo S, Barassi CA & Lamattina L (2005) Nitric oxide is involved in the *Azospirillum brasilense*-induced lateral root formation in tomato. *Planta* **221**: 297-303.
- Daayf F, Adam L & Fernando W (2003) Comparative screening of bacteria for biological control of potato late blight (strain US-8), using *in vitro*, detached-leaves, and whole-plant testing systems. *Canadian Journal of Plant Pathology* **25**: 276-284.

Dahmani MA, Desrut A, Moumen B, Verdon J, Mermouri L, Kacem M, Coutos-Thévenot P, Kaid-Harche M, Bergès T & Vriet C (2020) Unearthing the plant growth-promoting traits of *Bacillus megaterium* RmBm31, an endophytic bacterium isolated from root nodules of *Retama monosperma*. *Frontiers in plant science* **11**: 124.

Danevčič T, Dragoš A, Spacapan M, Stefanic P, Dogsa I & Mandic-Mulec I (2021) Surfactin facilitates horizontal gene transfer in *Bacillus subtilis*. *Frontiers in Microbiology* **12**: 1000.

Dangl JL, Horvath DM & Staskawicz BJ (2013) Pivoting the plant immune system from dissection to deployment. *Science* **341**: 746-751.

Darbandi A, Asadi A, Mahdizade Ari M, Ohadi E, Talebi M, Halaj Zadeh M, Darb Emamie A, Ghanavati R & Kakanj M (2021) Bacteriocins: Properties and potential use as antimicrobials. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* e24093.

Darras A, Kotsiras A, Delis C, Nifakos K, Pavlakos E & Demopoulos V (2017) Reaction of the native Greek tomato varieties ‘Chondrokatsari Messinias’ and ‘Katsari Santorinis’ to *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* and *Rhizoctonia solani* infection. *Protection* **70**.

Dastogeer KM, Tumpa FH, Sultana A, Akter MA & Chakraborty A (2020) Plant microbiome—an account of the factors that shape community composition and diversity. *Current Plant Biology* 100161.

Dawood MG (2018) Stimulating plant tolerance against abiotic stress through seed priming. *Advances in seed priming*, pp. 147-183. Springer.

De Britto S, Joshi SM & Jogaiah S (2021) Trehalose: a mycogenic cell wall elicitor elicit resistance against leaf spot disease of broccoli and acts as a plant growth regulator. *Biotechnology Reports* e00690.

de Melo LHV, Rocha FYO, Vidal MS, de Medeiros Gitahy P, Arruda GM, Barreto CP, Alves PB, de Almeida Ramos ET, Rossi CN & Schwab S (2021) Diversity and biotechnological potential of endophytic *Bacillus* species originating from the stem apoplast fluid of sugarcane plants. *Applied Soil Ecology* **166**: 103985.

De Silva NI, Brooks S, Lumyong S & Hyde KD (2019) Use of endophytes as biocontrol agents. *Fungal Biology Reviews* **33**: 133-148.

De Simone N, Pace B, Grieco F, Chimienti M, Tyibilika V, Santoro V, Capozzi V, Colelli G, Spano G & Russo P (2020) *Botrytis cinerea* and table grapes: A review of the main physical, chemical, and bio-based control treatments in post-harvest. *Foods* **9**: 1138.

De Souza RSC, Armanhi JSL & Arruda P (2020) From microbiome to traits: designing synthetic microbial communities for improved crop resiliency. *Frontiers in Plant Science* **11**: 1179.

Debois D, Fernandez O, Franzil L, Jourdan E, De Brogniez A, Willems L, Clément C, Dorey S, De Pauw E & Ongena M (2015) Plant polysaccharides initiate underground crosstalk with bacilli by inducing synthesis of the immunogenic lipopeptide surfactin. *Environmental microbiology reports* **7**: 570-582.

del Carmen Orozco-Mosqueda M & Santoyo G (2021) Plant-microbial endophytes interactions: scrutinizing their beneficial mechanisms from genomic explorations. *Current Plant Biology* **25**: 100189.

del Carmen Orozco-Mosqueda M, del Carmen Rocha-Granados M, Glick BR & Santoyo G (2018) Microbiome engineering to improve biocontrol and plant growth-promoting mechanisms. *Microbiological research* **208**: 25-31.

Delcambe L (1950) Iturine, new antibiotic produced by *Bacillus subtilis*. *Comptes rendus des*

seances de la Societe de biologie et de ses filiales **144**: 1431-1434.

Deleu M, Paquot M & Nylander T (2005) Fengycin interaction with lipid monolayers at the air–aqueous interface—implications for the effect of fengycin on biological membranes. *Journal of Colloid and Interface Science* **283**: 358-365.

Deleu M, Paquot M & Nylander T (2008) Effect of fengycin, a lipopeptide produced by *Bacillus subtilis*, on model biomembranes. *Biophysical journal* **94**: 2667-2679.

Deleu M, Lorent J, Lins L, Brasseur R, Braun N, El Kirat K, Nylander T, Dufrêne YF & Mingeot-Leclercq M-P (2013) Effects of surfactin on membrane models displaying lipid phase separation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* **1828**: 801-815.

Deyett E & Rolshausen P (2020) Endophytic microbial assemblage in grapevine. *FEMS microbiology ecology* **96**: fiae053.

Dhouib H, Zouari I, Abdallah DB, Belbahri L, Taktak W, Triki MA & Tounsi S (2019) Potential of a novel endophytic *Bacillus velezensis* in tomato growth promotion and protection against *Verticillium* wilt disease. *Biological Control* **139**: 104092.

Di Benedetto NA, Campaniello D, Bevilacqua A, Cataldi MP, Sinigaglia M, Flagella Z & Corbo MR (2019) Isolation, screening, and characterization of plant-growth-promoting bacteria from durum wheat rhizosphere to improve N and P nutrient use efficiency. *Microorganisms* **7**: 541.

Dietel K, Beator B, Budiharjo A, Fan B & Borriss R (2013) Bacterial traits involved in colonization of *Arabidopsis thaliana* roots by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *The plant pathology journal* **29**: 59.

Dimkić I, Stanković S, Nišavić M, Petković M, Ristivojević P, Fira D & Berić T (2017) The profile and antimicrobial activity of *Bacillus* lipopeptide extracts of five potential biocontrol strains. *Frontiers in microbiology* **8**: 925.

Dimopoulou A, Theologidis I, Liebmann B, Kalantidis K, Vassilakos N & Skandalis N (2019) *Bacillus amyloliquefaciens* MBI600 differentially induces tomato defense signaling pathways depending on plant part and dose of application. *Scientific reports* **9**: 1-12.

Dimopoulou A, Theologidis I, Benaki D, Koukounia M, Zervakou A, Tzima A, Diallinas G, Hatzinikolaou DG & Skandalis N (2021a) Direct Antibiotic Activity of Bacillibactin Broadens the Biocontrol Range of *Bacillus amyloliquefaciens* MBI600. *Mosphere* **6**: e00376-00321.

Dimopoulou A, Theologidis I, Varympopi A, Papafotis D, Mermigka G, Tzima A, Panopoulos NJ & Skandalis N (2021b) Shifting Perspectives of Translational Research in Bio-Bactericides: Reviewing the *Bacillus amyloliquefaciens* Paradigm. *Biology* **10**: 1202.

Domingos DF, de Faria AF, de Souza Galaverna R, Eberlin MN, Greenfield P, Zucchi TD, Melo IS, Tran-Dinh N, Midgley D & de Oliveira VM (2015) Genomic and chemical insights into biosurfactant production by the mangrove-derived strain *Bacillus safensis* CCMA-560. *Applied microbiology and biotechnology* **99**: 3155-3167.

Donadio S, Staver MJ, McAlpine JB, Swanson SJ & Katz L (1991) Modular organization of genes required for complex polyketide biosynthesis. *Science* **252**: 675-679.

Dong C-J, Wang L-L, Li Q & Shang Q-M (2019) Bacterial communities in the rhizosphere, phyllosphere and endosphere of tomato plants. *PLoS One* **14**: e0223847.

Du Jardin P (2015) Plant biostimulants: definition, concept, main categories and regulation. *Scientia Horticulturae* **196**: 3-14.

Dunlap CA, Bowman MJ & Rooney AP (2019) Iturinic lipopeptide diversity in the *Bacillus subtilis* species group—important antifungals for plant disease biocontrol applications. *Frontiers in*

microbiology **10**: 1794.

Dunlap CA, Bowman MJ & Zeigler DR (2020) Promotion of *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum*, *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* and *Bacillus subtilis* subsp. *stercoris* to species status. *Antonie van Leeuwenhoek* **113**: 1-12.

Dunlap CA, Kim S-J, Kwon S-W & Rooney AP (2016a) *Bacillus velezensis* is not a later heterotypic synonym of *Bacillus amyloliquefaciens*; *Bacillus methylotrophicus*, *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* and '*Bacillus oryzicola*' are later heterotypic synonyms of *Bacillus velezensis* based on phylogenomics. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* **66**: 1212-1217.

Dunlap CA, Bowman MJ, Schisler DA & Rooney AP (2016b) Genome analysis shows *Bacillus axarquiensis* is not a later heterotypic synonym of *Bacillus mojavenensis*; reclassification of *Bacillus malacitensis* and *Brevibacterium halotolerans* as heterotypic synonyms of *Bacillus axarquiensis*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* **66**: 2438-2443.

Durham DR, Stewart DB & Stellwag E (1987) Novel alkaline- and heat-stable serine proteases from alkalophilic *Bacillus* sp. strain GX6638. *Journal of Bacteriology* **169**: 2762-2768.

Egamberdieva D, Wirth S, Behrendt U, Ahmad P & Berg G (2017) Antimicrobial activity of medicinal plants correlates with the proportion of antagonistic endophytes. *Frontiers in microbiology* **8**: 199.

Ehrlich PR & Harte J (2015) Opinion: To feed the world in 2050 will require a global revolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **112**: 14743-14744.

Eid AM, Fouda A, Abdel-Rahman MA, Salem SS, Elsaied A, Oelmüller R, Hijri M, Bhowmik A, Elkelish A & Hassan SE-D (2021) Harnessing Bacterial Endophytes for Promotion of Plant Growth and Biotechnological Applications: An Overview. *Plants* **10**: 935.

Eissenberger K, Drissner D, Walsh F, Weiss A & Schmidt H (2020) Plant variety and soil type influence *Escherichia coli* O104: H4 strain C227/11ϕcu adherence to and internalization into the roots of lettuce plants. *Food microbiology* **86**: 103316.

el Zahar Haichar F, Santaella C, Heulin T & Achouak W (2014) Root exudates mediated interactions belowground. *Soil Biology and Biochemistry* **77**: 69-80.

Eljounaidi K, Lee SK & Bae H (2016) Bacterial endophytes as potential biocontrol agents of vascular wilt diseases—review and future prospects. *Biological Control* **103**: 62-68.

Ellis JG (2017) Can plant microbiome studies lead to effective biocontrol of plant diseases? *Molecular Plant-Microbe Interactions* **30**: 190-193.

Elmer PA & Michailides TJ (2007) Epidemiology of *Botrytis cinerea* in orchard and vine crops. *Botrytis: biology, pathology and control*, pp. 243-272. Springer.

El-Mougy N & Abdel-Kader M (2008) Long-term activity of bio-priming seed treatment for biological control of faba bean root rot pathogens. *Australasian plant pathology* **37**: 464-471.

Elshaghabee FM, Rokana N, Gulhane RD, Sharma C & Panwar H (2017) *Bacillus* as potential probiotics: status, concerns, and future perspectives. *Frontiers in microbiology* **8**: 1490.

Espariz M, Zuljan FA, Esteban L & Magni C (2016) Taxonomic identity resolution of highly phylogenetically related strains and selection of phylogenetic markers by using genome-scale methods: the *Bacillus pumilus* group case. *PLoS One* **11**: e0163098.

Esposito-Polesi NP, de Abreu-Tarazi MF, de Almeida CV, Tsai SM & de Almeida M (2017) Investigation of endophytic bacterial community in supposedly axenic cultures of pineapple and orchids with evidence on abundant intracellular bacteria. *Current microbiology* **74**: 103-113.

Estendorfer J, Stempfhuber B, Haury P, Vestergaard G, Rillig MC, Joshi J, Schröder P & Schlöter M (2017) The influence of land use intensity on the plant-associated microbiome of *Dactylis glomerata* L. *Frontiers in plant science* **8**: 930.

Esteve-Turrillas FA, Agulló C, Abad-Somovilla A, Mercader JV & Abad-Fuentes A (2016) Fungicide multiresidue monitoring in international wines by immunoassays. *Food chemistry* **196**: 1279-1286.

Etcheagaray A, de Castro Bueno C, de Melo IS, Tsai SM, de Fátima Fiore M, Silva-Stenico ME, de Moraes LAB & Teschke O (2008) Effect of a highly concentrated lipopeptide extract of *Bacillus subtilis* on fungal and bacterial cells. *Archives of microbiology* **190**: 611-622.

European Commission (2009) Regulation (EC) No 1107/2009 of the European Parliament and of the Council of 21 October 2009 concerning the placing of plant protection products on the market and repealing Council Directives 79/117/EEC and 91/414/EEC. *Official Journal of the European Union* **309**: 1-50.

European Commission (2019) Regulation (EU) 2019/1009 of the European Parliament and of the Council of 5 June 2019 laying down rules on the making available on the market of EU fertilising products and amending Regulations (EC) No 1069/2009 and (EC) No 1107/2009 and repealing Regulation (EC) No 2003/2003. *Official Journal of the European Union* 1–114.

Ezeobiora CE, Igbokwe NH, Amin DH & Mendie UE (2021) Endophytic microbes from Nigerian ethnomedicinal plants: a potential source for bioactive secondary metabolites—a review. *Bulletin of the National Research Centre* **45**: 1-10.

Falade AO, Adewole KE & Ekundayo TC (2021) Aptitude of endophytic microbes for production of novel biocontrol agents and industrial enzymes towards agro-industrial sustainability. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences* **10**: 1-14.

Falardeau J, Wise C, Novitsky L & Avis TJ (2013) Ecological and mechanistic insights into the direct and indirect antimicrobial properties of *Bacillus subtilis* lipopeptides on plant pathogens. *Journal of chemical ecology* **39**: 869-878.

Fan B, Blom J, Klenk H-P & Borriss R (2017) *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus velezensis*, and *Bacillus siamensis* form an “operational group *B. amyloliquefaciens*” within the *B. subtilis* species complex. *Frontiers in microbiology* **8**: 22.

Fan H, Ru J, Zhang Y, Wang Q & Li Y (2017a) Fengycin produced by *Bacillus subtilis* 9407 plays a major role in the biocontrol of apple ring rot disease. *Microbiological Research* **199**: 89-97.

Fan H, Zhang Z, Li Y, Zhang X, Duan Y & Wang Q (2017b) Biocontrol of bacterial fruit blotch by *Bacillus subtilis* 9407 via surfactin-mediated antibacterial activity and colonization. *Frontiers in Microbiology* **8**: 1973.

Farace G, Fernandez O, Jacquens L, Coutte F, Krier F, Jacques P, Clément C, Barka EA, Jacquard C & Dorey S (2015) Cyclic lipopeptides from *Bacillus subtilis* activate distinct patterns of defence responses in grapevine. *Molecular plant pathology* **16**: 177-187.

Farris JS (1972) Estimating phylogenetic trees from distance matrices. *The American Naturalist* **106**: 645-668.

Fazle Rabbee M & Baek K-H (2020) Antimicrobial activities of lipopeptides and polyketides of *Bacillus velezensis* for agricultural applications. *Molecules* **25**: 4973.

Fedele G, Brischetto C & Rossi V (2020) Biocontrol of *Botrytis cinerea* on grape berries as influenced by temperature and humidity. *Frontiers in Plant Science* **11**: 1232.

Fedele G, González-Domínguez E, Deliere L, Díez-Navajas AM & Rossi V (2020) Consideration of

- latent infections improves the prediction of Botrytis bunch rot severity in vineyards. *Plant disease* **104**: 1291-1297.
- Fesel PH & Zuccaro A (2016) Dissecting endophytic lifestyle along the parasitism/mutualism continuum in *Arabidopsis*. *Current Opinion in Microbiology* **32**: 103-112.
- Fields FR, Carothers KE, Balsara RD, Ploplis VA, Castellino FJ & Lee SW (2018) Rational design of syn-safencin, a novel linear antimicrobial peptide derived from the circular bacteriocin safencin AS-48. *The Journal of antibiotics* **71**: 592-600.
- Fincheira P & Quiroz A (2018) Microbial volatiles as plant growth inducers. *Microbiological Research* **208**: 63-75.
- Fira D, Dimkić I, Berić T, Lozo J & Stanković S (2018) Biological control of plant pathogens by *Bacillus* species. *Journal of biotechnology* **285**: 44-55.
- Fischbach MA & Walsh CT (2006) Assembly-line enzymology for polyketide and nonribosomal peptide antibiotics: logic, machinery, and mechanisms. *Chemical reviews* **106**: 3468-3496.
- Franco-Sierra ND, Posada LF, Santa-María G, Romero-Tabarez M, Villegas-Escobar V & Álvarez JC (2020) *Bacillus subtilis* EA-CB0575 genome reveals clues for plant growth promotion and potential for sustainable agriculture. *Functional & integrative genomics* **20**: 575-589.
- Frank AC, Saldierna Guzmán JP & Shay JE (2017) Transmission of bacterial endophytes. *Microorganisms* **5**: 70.
- Frusciante L, Carli P, Ercolano MR, Pernice R, Di Matteo A, Fogliano V & Pellegrini N (2007) Antioxidant nutritional quality of tomato. *Molecular nutrition & food research* **51**: 609-617.
- Gabrielsen C, Brede DA, Nes IF & Diep DB (2014) Circular bacteriocins: biosynthesis and mode of action. *Applied and environmental microbiology* **80**: 6854-6862.
- Galambos N, Compant S, Wäckers F, Sessitsch A, Anfora G, Mazzoni V, Pertot I & Perazzolli M (2021) Beneficial Insects Deliver Plant Growth-Promoting Bacterial Endophytes between Tomato Plants. *Microorganisms* **9**: 1294.
- Gange AC & Gadhavre KR (2018) Plant growth-promoting rhizobacteria promote plant size inequality. *Scientific Reports* **8**: 1-10.
- Gao S, Wu H, Yu X, Qian L & Gao X (2016) Swarming motility plays the major role in migration during tomato root colonization by *Bacillus subtilis* SWR01. *Biological control* **98**: 11-17.
- Gao Z, Zhao X, Lee S, Li J, Liao H, Zhou X, Wu J & Qi G (2013) WH1fungin a surfactin cyclic lipopeptide is a novel oral immunoadjuvant. *Vaccine* **31**: 2796-2803.
- Garcia EC (2018) Contact-dependent interbacterial toxins deliver a message. *Current opinion in microbiology* **42**: 40-46.
- García- Gutiérrez L, Zerriouh H, Romero D, Cubero J, de Vicente A & Pérez- García A (2013) The antagonistic strain *Bacillus subtilis* UMAF 6639 also confers protection to melon plants against cucurbit powdery mildew by activation of jasmonate- and salicylic acid- dependent defence responses. *Microbial Biotechnology* **6**: 264-274.
- Germaine KJ, Liu X, Cabellos GG, Hogan JP, Ryan D & Dowling DN (2006) Bacterial endophyte-enhanced phytoremediation of the organochlorine herbicide 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid. *FEMS microbiology ecology* **57**: 302-310.
- Gilbert S, Xu J, Acosta K, Poulev A, Lebeis S & Lam E (2018) Bacterial production of indole related compounds reveals their role in association between duckweeds and endophytes. *Frontiers in chemistry* **6**: 265.

Gkizi D, González Gil A, Pardal AJ, Piquerez SJ, Sergaki C, Ntoulakis V & Tjamos SE (2021a) The bacterial biocontrol agent *Paenibacillus alvei* K165 confers inherited resistance to *Verticillium dahliae*. *Journal of experimental botany* **72**: 4565-4576.

Gkizi D, Poulaki EG & Tjamos SE (2021b) Towards Biological Control of *Aspergillus carbonarius* and *Botrytis cinerea* in Grapevine Berries and Transcriptomic Changes of Genes Encoding Pathogenesis-Related (PR) Proteins. *Plants* **10**: 970.

Glassner H, Zchori-Fein E, Compant S, Sessitsch A, Katzir N, Portnoy V & Yaron S (2015) Characterization of endophytic bacteria from cucurbit fruits with potential benefits to agriculture in melons (*Cucumis melo* L.). *FEMS Microbiology Ecology* **91**.

Glick BR (2014) Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. *Microbiological research* **169**: 30-39.

Gold S, Blacutt A, Meinersmann R & Bacon C (2014) Whole-genome shotgun sequence of *Bacillus mojavensis* strain RRC101, an endophytic bacterium antagonistic to the mycotoxigenic endophytic fungus *Fusarium verticillioides*. *Genome announcements* **2**: e01090-01014.

Gond SK, Bergen MS, Torres MS & White Jr JF (2015) Endophytic *Bacillus* spp. produce antifungal lipopeptides and induce host defence gene expression in maize. *Microbiological Research* **172**: 79-87.

Gong Q, Zhang C, Lu F, Zhao H, Bie X & Lu Z (2014) Identification of bacillomycin D from *Bacillus subtilis* fmbJ and its inhibition effects against *Aspergillus flavus*. *Food Control* **36**: 8-14.

González-Jaramillo LM, Aranda FJ, Teruel JA, Villegas-Escobar V & Ortiz A (2017) Antimycotic activity of fengycin C biosurfactant and its interaction with phosphatidylcholine model membranes. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **156**: 114-122.

Gopikrishna T, Kumar HKS, Perumal K & Elangovan E (2021) Impact of *Bacillus* in fermented soybean foods on human health. *Annals of Microbiology* **71**: 1-16.

Goswami D, Thakker JN & Dhandhukia PC (2015a) Simultaneous detection and quantification of indole-3-acetic acid (IAA) and indole-3-butyric acid (IBA) produced by rhizobacteria from l-tryptophan (Trp) using HPTLC. *Journal of microbiological methods* **110**: 7-14.

Goswami D, Patel K, Parmar S, Vaghela H, Muley N, Dhandhukia P & Thakker JN (2015b) Elucidating multifaceted urease producing marine *Pseudomonas aeruginosa* BG as a cogent PGPR and bio-control agent. *Plant growth regulation* **75**: 253-263.

Gotor-Vila A, Teixidó N, Di Francesco A, Usall J, Ugolini L, Torres R & Mari M (2017) Antifungal effect of volatile organic compounds produced by *Bacillus amyloliquefaciens* CPA-8 against fruit pathogen decays of cherry. *Food microbiology* **64**: 219-225.

Gouda S, Kerry RG, Das G, Paramithiotis S, Shin H-S & Patra JK (2018) Revitalization of plant growth promoting rhizobacteria for sustainable development in agriculture. *Microbiological research* **206**: 131-140.

Grafakou M-E, Diamanti A, Antaloudaki E, Kypriotakis Z, Ćirić A, Soković M & Skaltsa H (2020) Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of three closely related hypericum species growing wild on the island of Crete, Greece. *Applied Sciences* **10**: 2823.

Griffiths SM, Galambao M, Rowntree J, Goodhead I, Hall J, O'Brien D, Atkinson N & Antwis RE (2020) Complex associations between cross- kingdom microbial endophytes and host genotype in ash dieback disease dynamics. *Journal of Ecology* **108**: 291-309.

Gu Q, Yang Y, Yuan Q, Shi G, Wu L, Lou Z, Huo R, Wu H, Borriss R & Gao X (2017) Bacillomycin D produced by *Bacillus amyloliquefaciens* is involved in the antagonistic interaction

with the plant-pathogenic fungus *Fusarium graminearum*. *Applied and environmental microbiology* **83**: e01075-01017.

Guo Q, Dong W, Li S, Lu X, Wang P, Zhang X, Wang Y & Ma P (2014) Fengycin produced by *Bacillus subtilis* NCD-2 plays a major role in biocontrol of cotton seedling damping-off disease. *Microbiological Research* **169**: 533-540.

Gupta S & Pandey S (2019) ACC deaminase producing bacteria with multifarious plant growth promoting traits alleviates salinity stress in French bean (*Phaseolus vulgaris*) plants. *Frontiers in Microbiology* **10**: 1506.

Haggag W & Timmusk S (2008) Colonization of peanut roots by biofilm- forming *Paenibacillus polymyxa* initiates biocontrol against crown rot disease. *Journal of applied microbiology* **104**: 961-969.

Haidar R, Calvo-Garrido C, Roudet J, Gautier T, Deschamps A & Fermaud M (2015) *In vitro* and *in vivo* screening of antagonistic bacterial strains from vineyards to control *Botrytis cinerea* in grapevine tissues. pp. 85-92.

Haidar R, Fermaud M, Calvo-Garrido C, Roudet J & Deschamps A (2016) Modes of action for biological control of *Botrytis cinerea* by antagonistic bacteria. *Phytopathologia Mediterranea* 301-322.

Han X & Kahmann R (2019) Manipulation of phytohormone pathways by effectors of filamentous plant pathogens. *Frontiers in Plant Science* 822.

Han X, Shen D, Xiong Q, Bao B, Zhang W, Dai T, Zhao Y, Borriss R & Fan B (2021) The Plant-Beneficial Rhizobacterium *Bacillus velezensis* FZB42 Controls the Soybean Pathogen *Phytophthora sojae* Due to Bacilysin Production. *Applied and Environmental Microbiology* **87**: e01601-01621.

Hanano A, Harba M, Al- Ali M & Ammouneh H (2014) Silencing of *E. rwinia amylovora* sy69 AHL- quorum sensing by a *Bacillus simplex* AHL- inducible *aiiA* gene encoding a zinc- dependent N- acyl- homoserine lactonase. *Plant pathology* **63**: 773-783.

Hardoim PR, Van Overbeek LS, Berg G, Pirttilä AM, Compant S, Campisano A, Döring M & Sessitsch A (2015) The hidden world within plants: ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **79**: 293-320.

Harel YM, Mehari ZH, Rav-David D & Elad Y (2014) Systemic resistance to gray mold induced in tomato by benzothiadiazole and *Trichoderma harzianum* T39. *Phytopathology* **104**: 150-157.

Hartmann A, Rothballer M & Schmid M (2008) Lorenz Hiltner, a pioneer in rhizosphere microbial ecology and soil bacteriology research. *Plant and Soil* **312**: 7-14.

Haruna E, Zin NM, Kerfahi D & Adams JM (2018) Extensive overlap of tropical rainforest bacterial endophytes between soil, plant parts, and plant species. *Microbial ecology* **75**: 88-103.

Harwood CR, Mouillon J-M, Pohl S & Arnau J (2018) Secondary metabolite production and the safety of industrially important members of the *Bacillus subtilis* group. *FEMS microbiology reviews* **42**: 721-738.

Hashmi I, Paul C, Al-Dourobi A, Sandoz F, Deschamps P, Junier T, Junier P & Bindschedler S (2019) Comparison of the plant growth-promotion performance of a consortium of *Bacilli* inoculated as endospores or as vegetative cells. *FEMS microbiology ecology* **95**: fuz147.

Hassan SE-D (2017) Plant growth-promoting activities for bacterial and fungal endophytes isolated from medicinal plant of *Teucrium polium* L. *Journal of advanced research* **8**: 687-695.

Hassani MA, Durán P & Hacquard S (2018) Microbial interactions within the plant holobiont.

Microbiome **6**: 1-17.

He Y, Pantigoso HA, Wu Z & Vivanco JM (2019) Co- inoculation of *Bacillus* sp. and *Pseudomonas putida* at different development stages acts as a biostimulant to promote growth, yield and nutrient uptake of tomato. *Journal of applied microbiology* **127**: 196-207.

Hegemann JD, Süßmuth RD (2020) Matters of class: coming of age of class III and IV lanthipeptides. *RSC Chemical Biology* **1** (3):110-127

Heo J, Kim S-J, Kim J-S, Hong S-B & Kwon S-W (2019) Complete genome sequence of *Bacillus halotolerans* F41-3 isolated from wild flower in Korea. *The Microbiological Society of Korea* **55**: 306-308.

Herrera SD, Grossi C, Zawoznik M & Groppa MD (2016) Wheat seeds harbour bacterial endophytes with potential as plant growth promoters and biocontrol agents of *Fusarium graminearum*. *Microbiological research* **186**: 37-43.

Hohmann P, Schlaeppli K & Sessitsch A (2020) miCROPe 2019—emerging research priorities towards microbe-assisted crop production. *FEMS microbiology ecology* **96**: fiae177.

Horowitz S, Gilbert J & Griffin WM (1990) Isolation and characterization of a surfactant produced by *Bacillus licheniformis* 86. *Journal of industrial microbiology* **6**: 243-248.

Hossain MT, Khan A, Harun-Or-Rashid M & Chung YR (2019) A volatile producing endophytic *Bacillus siamensis* YC7012 promotes root development independent on auxin or ethylene/jasmonic acid pathway. *Plant and Soil* **439**: 309-324.

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.

Huang P, Xu J & Kloepper JW (2020) Plant–microbe–soil fertility interaction impacts performance of a *Bacillus*- containing bioproduct on bell pepper. *Journal of basic microbiology* **60**: 27-36.

Huang XF, Zhou D, Guo J, Manter D, Reardon K & Vivanco J (2015) *Bacillus* spp. from rainforest soil promote plant growth under limited nitrogen conditions. *Journal of Applied Microbiology* **118**: 672-684.

Huang R, Feng H, Xu Z, Zhang N, Liu Y, Shao J, Shen Q-r & Zhang R (2021) Identification of adhesins in plant beneficial rhizobacteria *Bacillus velezensis* SQR9 and their effect on root colonization. *Molecular Plant-Microbe Interactions*.

Hussein W (2019) Fengycin or plipastatin? A confusing question in *Bacilli*. *BioTechnologia Journal of Biotechnology Computational Biology and Bionanotechnology* **100**.

Im SM, Yu NH, Joen HW, Kim SO, Park HW, Park AR & Kim J-C (2020) Biological control of tomato bacterial wilt by oxydifficidin and difficidin-producing *Bacillus methylotrophicus* DR-08. *Pesticide biochemistry and physiology* **163**: 130-137.

Inès M & Dhouha G (2015) Lipopeptide surfactants: production, recovery and pore forming capacity. *Peptides* **71**: 100-112.

International Biocontrol Manufacturers' Association (2018) White paper: New EU regulatory framework for bioprotection agents (<https://www.ibma-globa l.org/uploa d/attac h-docum ent/ibma-white -paper -web-final -a5-sprea ds.pdf>)

Jain A, Singh A, Chaudhary A, Singh S & Singh HB (2014) Modulation of nutritional and antioxidant potential of seeds and pericarp of pea pods treated with microbial consortium. *Food research international* **64**: 275-282.

Janek T, Drzymala K & Dobrowolski A (2020) *In vitro* efficacy of the lipopeptide biosurfactant surfactin-C15 and its complexes with divalent counterions to inhibit *Candida albicans* biofilm and hyphal formation. *Biofouling* **36**: 210-221.

Janisiewicz W (1988) Biocontrol of postharvest diseases of apples with antagonist mixtures. *Phytopathology* **78**: 194-198.

Jasim B, Joseph AA, John CJ, Mathew J & Radhakrishnan E (2014) Isolation and characterization of plant growth promoting endophytic bacteria from the rhizome of *Zingiber officinale*. *3 Biotech* **4**: 197-204.

Javvadi SG, Cescutti P, Rizzo R, Lonzarich V, Navarini L, Licastro D, Guarnaccia C & Venturi V (2018) The spent culture supernatant of *Pseudomonas syringae* contains azelaic acid. *BMC microbiology* **18**: 1-11.

Jayakumara A, Kumara VP, Josepha M, Nairb IC, Remakanthan A & Radhakrishnan E (2020) Plant growth-promoting mechanisms of endophytes. *Microbial Endophytes*, pp. 57-74. Woodhead Publishing.

Jia C, Zhang L, Liu L, Wang J, Li C & Wang Q (2013) Multiple phytohormone signalling pathways modulate susceptibility of tomato plants to *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici*. *Journal of experimental botany* **64**: 637-650.

Jiang C-H, Xie Y-S, Zhu K, Wang N, Li Z-J, Yu G-J & Guo J-H (2019) Volatile organic compounds emitted by *Bacillus* sp. JC03 promote plant growth through the action of auxin and strigolactone. *Plant Growth Regulation* **87**: 317-328.

Jiang J, Gao L, Bie X, Lu Z, Liu H, Zhang C, Lu F & Zhao H (2016) Identification of novel surfactin derivatives from NRPS modification of *Bacillus subtilis* and its antifungal activity against *Fusarium moniliforme*. *BMC microbiology* **16**: 1-14.

Jiao R, Cai Y, He P, Munir S, Li X, Wu Y, Wang J, Xia M, He P & Wang G (2021) *Bacillus amyloliquefaciens* YN201732 produces lipopeptides with promising biocontrol activity against fungal pathogen *Erysiphe cichoracearum*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* **11**.

Jiménez-Gómez A, Celador-Lera L, Fradejas-Bayón M & Rivas R (2017) Plant probiotic bacteria enhance the quality of fruit and horticultural crops. *AIMS microbiology* **3**: 483.

Jin P, Wang H, Tan Z, Xuan Z, Dahar GY, Li QX, Miao W & Liu W (2020) Antifungal mechanism of bacillomycin D from *Bacillus velezensis* HN-2 against *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. *Pesticide biochemistry and physiology* **163**: 102-107.

Jin H, Yang X-Y, Yan Z-Q, Liu Q, Li X-Z, Chen J-X, Zhang D-H, Zeng L-M & Qin B (2014) Characterization of rhizosphere and endophytic bacterial communities from leaves, stems and roots of medicinal *Stellera chamaejasme* L. *Systematic and Applied Microbiology* **37**: 376-385.

Joly P, Calteau A, Wauquier A, Dumas R, Beuvin M, Vallenet D, Crovadore J, Cochard B, Lefort F & Berthon J-Y (2021) From Strain Characterization to Field Authorization: Highlights on *Bacillus velezensis* Strain B25 Beneficial Properties for Plants and Its Activities on Phytopathogenic Fungi. *Microorganisms* **9**: 1924.

Kalamara M, Spacapan M, Mandic- Mulec I & Stanley- Wall NR (2018) Social behaviours by *Bacillus subtilis*: quorum sensing, kin discrimination and beyond. *Molecular microbiology* **110**: 863-878.

Kang X, Zhang W, Cai X, Zhu T, Xue Y & Liu C (2018) *Bacillus velezensis* CC09: A potential 'vaccine' for controlling wheat diseases. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **31**: 623-632.

Kapulnik Y, Okon Y & Henis Y (1985) Changes in root morphology of wheat caused by

Azospirillum inoculation. Canadian Journal of Microbiology **31**: 881-887.

Kasfi K, Taheri P, Jafarpour B & Tarighi S (2018) Identification of epiphytic yeasts and bacteria with potential for biocontrol of grey mold disease on table grapes caused by *Botrytis cinerea*. *Spanish journal of agricultural research* **16**: 23.

Kaspar F, Neubauer P, Gimpel M (2019) Bioactive secondary metabolites from *Bacillus subtilis*: a comprehensive review. *Journal of natural products* **82** (7):2038-2053

Kawagoe Y, Shiraishi S, Kondo H, Yamamoto S, Aoki Y & Suzuki S (2015) Cyclic lipopeptide iturin A structure-dependently induces defense response in *Arabidopsis* plants by activating SA and JA signaling pathways. *Biochemical and biophysical research communications* **460**: 1015-1020.

Kazan K & Manners JM (2008) Jasmonate signaling: toward an integrated view. *Plant physiology* **146**: 1459-1468.

Keswani C, Prakash O, Bharti N, Vilchez JI, Sansinenea E, Lally RD, Borriss R, Singh SP, Gupta VK & Fraceto LF (2019) Re-addressing the biosafety issues of plant growth promoting rhizobacteria. *Science of the Total Environment* **690**: 841-852.

Keswani C, Singh SP, Cueto L, García-Estrada C, Mezaache-Aichour S, Glare TR, Borriss R, Singh SP, Blázquez MA & Sansinenea E (2020) Auxins of microbial origin and their use in agriculture. *Applied Microbiology and Biotechnology* 1-17.

Khakimov B, Jespersen BM & Engelsens SB (2014) Comprehensive and comparative metabolomic profiling of wheat, barley, oat and rye using gas chromatography-mass spectrometry and advanced chemometrics. *Foods* **3**: 569-585.

Khalid S, Asghar HN, Akhtar MJ, Aslam A & Zahir ZA (2015) Biofortification of iron in chickpea by plant growth promoting rhizobacteria. *Pak J Bot* **47**: 1191-1194.

Khalid F, Khalid A, Fu Y, Hu Q, Zheng Y, Khan S & Wang Z (2021) Potential of *Bacillus velezensis* as a probiotic in animal feed: A review. *Journal of Microbiology* **59**: 627-633.

Khan A, Singh J, Upadhyay VK, Singh AV & Shah S (2019) Microbial biofortification: a green technology through plant growth promoting microorganisms. *Sustainable green technologies for environmental management*, p. 255-269. Springer.

Khan AL, Halo BA, Elyassi A, Ali S, Al-Hosni K, Hussain J, Al-Harrasi A & Lee I-J (2016) Indole acetic acid and ACC deaminase from endophytic bacteria improves the growth of *Solanum lycopersicum*. *Electronic Journal of Biotechnology* **21**: 58-64.

Khedher SB, Mejdoub-Trabelsi B & Tounsi S (2021) Biological potential of *Bacillus subtilis* V26 for the control of *Fusarium* wilt and tuber dry rot on potato caused by *Fusarium* species and the promotion of plant growth. *Biological Control* **152**: 104444.

Khedher SB, Boukedi H, Laarif A & Tounsi S (2020) Biosurfactant produced by *Bacillus subtilis* V26: a potential biological control approach for sustainable agriculture development. *Organic Agriculture* **10**: 117-124.

Kiesewalter HT, Lozano-Andrade CN, Wibowo M, Strube ML, Maróti G, Snyder D, Jørgensen TS, Larsen TO, Cooper VS & Weber T (2021) Genomic and chemical diversity of *Bacillus subtilis* secondary metabolites against plant pathogenic fungi. *Msystems* **6**: e00770-00720.

Kilani-Feki O, Khedher SB, Dammak M, Kamoun A, Jabnoun-Khiareddine H, Daami-Remadi M & Tounsi S (2016) Improvement of antifungal metabolites production by *Bacillus subtilis* V26 for biocontrol of tomato postharvest disease. *Biological control* **95**: 73-82.

Kim YS, Balaraju K & Jeon Y (2016) Effects of rhizobacteria *Paenibacillus polymyxa* APEC136 and *Bacillus subtilis* APEC170 on biocontrol of postharvest pathogens of apple fruits. *Journal of*

Zhejiang University-*SCIENCE B* **17**: 931-940.

Kim Y-H, Choi Y, Oh YY, Ha N-C & Song J (2019) Plant growth-promoting activity of beta-propeller protein YxaL secreted from *Bacillus velezensis* strain GH1-13. *PloS one* **14**: e0207968.

Kim Y, Tsuda K, Igarashi D, Hillmer RA, Sakakibara H, Myers CL & Katagiri F (2014) Mechanisms underlying robustness and tunability in a plant immune signaling network. *Cell host & microbe* **15**: 84-94.

Kimura K & Yokoyama S (2019) Trends in the application of *Bacillus* in fermented foods. *Current opinion in biotechnology* **56**: 36-42.

Koevoets IT, Venema JH, Elzenga JT & Testerink C (2016) Roots withstanding their environment: exploiting root system architecture responses to abiotic stress to improve crop tolerance. *Frontiers in plant science* **7**: 1335.

Köhl J, Postma J, Nicot P, Ruocco M & Blum B (2011) Stepwise screening of microorganisms for commercial use in biological control of plant-pathogenic fungi and bacteria. *Biological control* **57**: 1-12.

Kõiv V, Arbo K, Maiväli Ü, Kisand V, Roosaare M, Remm M & Tenson T (2019) Endophytic bacterial communities in peels and pulp of five root vegetables. *PLoS One* **14**: e0210542.

Kong HG, Kim JC, Choi GJ, Lee KY, Kim HJ, Hwang EC, Moon BJ & Lee SW (2010) Production of surfactin and iturin by *Bacillus licheniformis* N1 responsible for plant disease control activity. *The Plant Pathology Journal* **26**: 170-177.

Koul S & Kalia VC (2016) Comparative genomics reveals biomarkers to identify *Lactobacillus* species. *Indian journal of microbiology* **56**: 265-276.

Kraigher B, Butolen M, Stefanic P & Mandic Mulec I (2021) Kin discrimination drives territorial exclusion during *Bacillus subtilis* swarming and restrains exploitation of surfactin. *The ISME Journal* **1**-9.

Kramer J, Özkaya Ö & Kümmerli R (2020) Bacterial siderophores in community and host interactions. *Nature Reviews Microbiology* **18**: 152-163.

Kumar M, Karthikeyan N & Prasanna R (2016a) Priming of Plant Defense and Plant Growth in Disease-Challenged Crops Using Microbial Consortia. *Microbial-mediated Induced Systemic Resistance in Plants*, p. 39-56. Springer.

Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C & Tamura K (2018) MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular biology and evolution* **35**: 1547-1549.

Kumar M, Mishra S, Dixit V, Kumar M, Agarwal L, Chauhan PS & Nautiyal CS (2016b) Synergistic effect of *Pseudomonas putida* and *Bacillus amyloliquefaciens* ameliorates drought stress in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Plant signaling & behavior* **11**: e1071004.

Kumawat K, Sharma P, Sirari A, Singh I, Gill B, Singh U & Saharan K (2019) Synergism of *Pseudomonas aeruginosa* (LSE-2) nodule endophyte with *Bradyrhizobium* sp.(LSBR-3) for improving plant growth, nutrient acquisition and soil health in soybean. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **35**: 1-17.

Kurata A, Yamaguchi T, Kira M & Kishimoto N (2019) Characterization and heterologous expression of an antimicrobial peptide from *Bacillus amyloliquefaciens* CMW1. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* **33**: 886-893.

Kurniawan O, Wilson K, Mohamed R & Avis TJ (2018) *Bacillus* and *Pseudomonas* spp. provide antifungal activity against gray mold and *Alternaria* rot on blueberry fruit. *Biological Control* **126**: 136-141.

- Kusari P, Kusari S, Eckelmann D, Zühlke S, Kayser O & Spiteller M (2016) Cross-species biosynthesis of maytansine in *Maytenus serrata*. *RSC advances* **6**: 10011-10016.
- Lakshmanan V, Castaneda R, Rudrappa T & Bais HP (2013) Root transcriptome analysis of *Arabidopsis thaliana* exposed to beneficial *Bacillus subtilis* FB17 rhizobacteria revealed genes for bacterial recruitment and plant defense independent of malate efflux. *Planta* **238**: 657-668.
- Lam VB, Meyer T, Arias AA, Ongena M, Oni FE & Höfte M (2021) Bacillus Cyclic Lipopeptides Iturin and Fengycin Control Rice Blast Caused by *Pyricularia oryzae* in Potting and Acid Sulfate Soils by Direct Antagonism and Induced Systemic Resistance. *Microorganisms* **9**: 1441.
- Lamichhane JR, Dachbrodt-Saaydeh S, Kudsk P & Messéan A (2016) Toward a reduced reliance on conventional pesticides in European agriculture. *Plant Disease* **100**: 10-24.
- Lastochkina O, Seifikalhor M, Aliniaiefard S, Baymiev A, Pusenkova L, Garipova S, Kulabuhova D & Maksimov I (2019) *Bacillus* spp.: efficient biotic strategy to control postharvest diseases of fruits and vegetables. *Plants* **8**: 97.
- Lastochkina O, Baymiev A, Shayahmetova A, Garshina D, Koryakov I, Shpirnaya I, Pusenkova L, Mardanshin Id, Kasnak C & Palamutoglu R (2020a) Effects of endophytic *Bacillus subtilis* and salicylic acid on postharvest diseases (*Phytophthora infestans*, *Fusarium oxysporum*) development in stored potato tubers. *Plants* **9**: 76.
- Lastochkina O, Pusenkova L, Garshina D, Yuldashev R, Shpirnaya I, Kasnak C, Palamutoglu R, Mardanshin I, Garipova S & Sobhani M (2020b) The effect of endophytic bacteria *Bacillus subtilis* and salicylic acid on some resistance and quality traits of stored *Solanum tuberosum* L. tubers infected with fusarium dry rot. *Plants* **9**: 738.
- Le Cocq K, Gurr SJ, Hirsch PR & Mauchline TH (2017) Exploitation of endophytes for sustainable agricultural intensification. *Molecular Plant Pathology* **18**: 469-473.
- Lee N-K, Kim W-S & Paik H-D (2019) *Bacillus* strains as human probiotics: characterization, safety, microbiome, and probiotic carrier. *Food science and biotechnology* **28**: 1297-1305.
- Lee S, Trinh CS, Lee WJ, Jeong CY, Truong HA, Chung N, Kang C-S & Lee H (2020) *Bacillus subtilis* strain L1 promotes nitrate reductase activity in *Arabidopsis* and elicits enhanced growth performance in *Arabidopsis*, lettuce, and wheat. *Journal of plant research* **133**: 231-244.
- Lefort V, Desper R & Gascuel O (2015) FastME 2.0: a comprehensive, accurate, and fast distance-based phylogeny inference program. *Molecular biology and evolution* **32**: 2798-2800.
- Levitz SM & Diamond RD (1985) A rapid colorimetric assay of fungal viability with the tetrazolium salt MTT. *Journal of Infectious Diseases* **152**: 938-945.
- Li T, Huang Y, Xu Z-S, Wang F & Xiong A-S (2019) Salicylic acid-induced differential resistance to the Tomato yellow leaf curl virus among resistant and susceptible tomato cultivars. *BMC plant biology* **19**: 1-14.
- Li B, Li Q, Xu Z, Zhang N, Shen Q & Zhang R (2014) Responses of beneficial *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 to different soilborne fungal pathogens through the alteration of antifungal compounds production. *Frontiers in microbiology* **5**: 636.
- Li X, Yang H, Zhang D, Li X, Yu H & Shen Z (2015) Overexpression of specific proton motive force-dependent transporters facilitate the export of surfactin in *Bacillus subtilis*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **42**: 93-103.
- Li X, Zhang M, Qi D, Zhou D, Qi C, Li C, Liu S, Xiang D, Zhang L & Xie J (2021) Biocontrol Ability and Mechanism of a Broad-Spectrum Antifungal Strain *Bacillus safensis* sp. QN1NO-4 Against Strawberry Anthracnose Caused by *Colletotrichum fragariae*. *Frontiers in microbiology* **12**.

Lin HF, Chen TH & Da Liu S (2011) The antifungal mechanism of *Bacillus subtilis* against *Pestalotiopsis eugeniae* and its development for commercial applications against wax apple infection. *African Journal of Microbiology Research* **5**: 1723-1728.

Lin Y, Watts DB, Kloepper JW, Adesemoye AO & Feng Y (2019) Effect of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria at Various Nitrogen Rates on Corn Growth. *Agricultural Sciences* **10**: 1542-1565.

Liu Y, Lai Q & Shao Z (2018) Genome analysis-based reclassification of *Bacillus weihenstephanensis* as a later heterotypic synonym of *Bacillus mycoides*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* **68**: 106-112.

Liu J, Ridgway H & Jones EE (2020) Apple endophyte community is shaped by tissue type, cultivar and site and has members with biocontrol potential against *Neonectria ditissima*. *Journal of applied microbiology* **128**: 1735-1753.

Liu K, McInroy JA, Hu C-H & Kloepper JW (2018) Mixtures of plant-growth-promoting rhizobacteria enhance biological control of multiple plant diseases and plant-growth promotion in the presence of pathogens. *Plant Disease* **102**: 67-72.

Liu J, Hagberg I, Novitsky L, Hadj-Moussa H & Avis TJ (2014) Interaction of antimicrobial cyclic lipopeptides from *Bacillus subtilis* influences their effect on spore germination and membrane permeability in fungal plant pathogens. *Fungal biology* **118**: 855-861.

Liu J, Zhou T, He D, Li X-z, Wu H, Liu W & Gao X (2011) Functions of lipopeptides bacillomycin D and fengycin in antagonism of *Bacillus amyloliquefaciens* C06 towards *Monilinia fructicola*. *Journal of molecular microbiology and biotechnology* **20**: 43-52.

Liu H, Carvalhais LC, Crawford M, Singh E, Dennis PG, Pieterse CM & Schenk PM (2017) Inner plant values: diversity, colonization and benefits from endophytic bacteria. *Frontiers in microbiology* **8**: 2552.

Liu Z, Budiharjo A, Wang P, Shi H, Fang J, Borriss R, Zhang K & Huang X (2013) The highly modified microcin peptide plantazolicin is associated with nematicidal activity of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Applied microbiology and biotechnology* **97**: 10081-10090.

Liu D, Yang Q, Ge K, Hu X, Qi G, Du B, Liu K & Ding Y (2017) Promotion of iron nutrition and growth on peanut by *Paenibacillus illinoisensis* and *Bacillus* sp. strains in calcareous soil. *Brazilian journal of microbiology* **48**: 656-670.

Livak KJ & Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods* **25**: 402-408.

Lombard V, Golaconda Ramulu H, Drula E, Coutinho PM & Henrissat B (2014) The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic acids research* **42**: D490-D495.

Loper J & Schroth M (1986) Influence of bacterial sources of indole-3-acetic acid on root elongation of sugar beet. *Phytopathology* **76**: 386-389.

López SMY, Pastorino GN, Franco MEE, Medina R, Lucentini CG, Saparrat MCN & Balatti PA (2018) Microbial endophytes that live within the seeds of two tomato hybrids cultivated in Argentina. *Agronomy* **8**: 136.

López-Bucio J, Campos-Cuevas JC, Hernández-Calderón E, Velásquez-Becerra C, Farías-Rodríguez R, Macías-Rodríguez LI, Valencia-Cantero E (2007) *Bacillus megaterium* rhizobacteria promote growth and alter root-system architecture through an auxin-and ethylene-independent signaling mechanism in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **20** (2):207-217

Lopez-Fuentes E, Ruiz-Valdiviezo V, Martinez-Romero E, Gutierrez-Miceli F, Dendooven L &

- Rincon-Rosales R (2012) Bacterial community in the roots and rhizosphere of *Hypericum silenoides* Juss. 1804. *African Journal of Microbiology Research* **6**: 2704-2711.
- López-González RC, Juárez-Campusano YS, Rodríguez-Chávez JL, Delgado-Lamas G, Medrano SMA, Martínez-Peniche RÁ & Pacheco-Aguilar JR (2021) Antagonistic activity of bacteria isolated from apple in different fruit development stages against blue mold caused by *Penicillium expansum*. *The plant pathology journal* **37**: 24.
- Lu Y, Ma D, He X, Wang F, Wu J, Liu Y, Jiao J & Deng J (2021) *Bacillus subtilis* KLBC BS6 induces resistance and defence-related response against *Botrytis cinerea* in blueberry fruit. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **114**: 101599.
- Luna E, Bruce TJ, Roberts MR, Flors V & Ton J (2012) Next-generation systemic acquired resistance. *Plant physiology* **158**: 844-853.
- Luo C, Liu X, Zhou H, Wang X & Chen Z (2015a) Nonribosomal peptide synthase gene clusters for lipopeptide biosynthesis in *Bacillus subtilis* 916 and their phenotypic functions. *Applied and environmental microbiology* **81**: 422-431.
- Luo C, Zhou H, Zou J, Wang X, Zhang R, Xiang Y & Chen Z (2015b) Bacillomycin L and surfactin contribute synergistically to the phenotypic features of *Bacillus subtilis* 916 and the biocontrol of rice sheath blight induced by *Rhizoctonia solani*. *Applied microbiology and biotechnology* **99**: 1897-1910.
- Luo D, Langendries S, Mendez SG, De Ryck J, Liu D, Beirinckx S, Willems A, Russinova E, Debode J & Goormachtig S (2019) Plant growth promotion driven by a novel *Caulobacter* strain. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **32**: 1162-1174.
- Lyons NA & Kolter R (2017) *Bacillus subtilis* protects public goods by extending kin discrimination to closely related species. *MBio* **8**: e00723-00717.
- Lyons NA, Kraigher B, Stefanic P, Mandic-Mulec I & Kolter R (2016) A combinatorial kin discrimination system in *Bacillus subtilis*. *Current Biology* **26**: 733-742.
- Ma Z & Hu J (2014) Production and characterization of iturinic lipopeptides as antifungal agents and biosurfactants produced by a marine *Pinctada martensii*-derived *Bacillus mojavensis* B0621A. *Applied biochemistry and biotechnology* **173**: 705-715.
- Ma Z, Wang N, Hu J & Wang S (2012) Isolation and characterization of a new iturinic lipopeptide, mojavensin A produced by a marine-derived bacterium *Bacillus mojavensis* B0621A. *The Journal of antibiotics* **65**: 317-322.
- Mácha H, Marešová H, Juříková T, Švecová M, Benada O, Škríba A, Baránek M, Novotný Č & Palyzová A (2021) Killing Effect of *Bacillus velezensis* FZB42 on a *Xanthomonas campestris* pv. *Campestris* (Xcc) Strain Newly Isolated from Cabbage *Brassica oleracea* Convar. *Capitata* (L.): A Metabolomic Study. *Microorganisms* **9**: 1410.
- Maget-Dana R, Thimon L, Peypoux F & Ptak M (1992) Surfactin/iturin A interactions may explain the synergistic effect of surfactin on the biological properties of iturin A. *Biochimie* **74**: 1047-1051.
- Magnin-Robert M, Quantinet D, Couderchet M, Aziz A & Trotel-Aziz P (2013) Differential induction of grapevine resistance and defense reactions against *Botrytis cinerea* by bacterial mixtures in vineyards. *BioControl* **58**: 117-131.
- Mahato NK, Gupta V, Singh P, Kumari R, Verma H, Tripathi C, Rani P, Sharma A, Singhvi N & Sood U (2017) Microbial taxonomy in the era of OMICS: application of DNA sequences, computational tools and techniques. *Antonie Van Leeuwenhoek* **110**: 1357-1371.
- Malerba M & Cerana R (2016) Chitosan effects on plant systems. *International journal of molecular sciences* **17**: 996.

- Mandic-Mulec I, Stefanic P & Van Elsas JD (2015) Ecology of bacillaceae. *Microbiology spectrum* **3**: 3.2. 16.
- Manno MAT, Repizo GD, Magni C, Dunlap CA & Espariz M (2020) The assessment of leading traits in the taxonomy of the *Bacillus cereus* group. *Antonie van Leeuwenhoek* **113**: 2223-2242.
- Maqueda M, Sánchez-Hidalgo M, Fernández M, Montalbán-López M, Valdivia E & Martínez-Bueno M (2008) Genetic features of circular bacteriocins produced by Gram-positive bacteria. *FEMS microbiology reviews* **32**: 2-22.
- Marian M, Morita A, Koyama H, Suga H & Shimizu M (2019) Enhanced biocontrol of tomato bacterial wilt using the combined application of *Mitsuaria* sp. TWR114 and nonpathogenic *Ralstonia* sp. TCR112. *Journal of General Plant Pathology* **85**: 142-154.
- Martí R, Roselló S & Cebolla-Cornejo J (2016) Tomato as a source of carotenoids and polyphenols targeted to cancer prevention. *Cancers* **8**: 58.
- Martínez-Medina A, Fernández I, Sánchez-Guzmán MJ, Jung SC, Pascual JA & Pozo MJ (2013) Deciphering the hormonal signalling network behind the systemic resistance induced by *Trichoderma harzianum* in tomato. *Frontiers in Plant Science* **4**: 206.
- Masmoudi F, Khedher SB, Kamoun A, Zouari N, Tounsi S & Trigui M (2017) Combinatorial effect of mutagenesis and medium component optimization on *Bacillus amyloliquefaciens* antifungal activity and efficacy in eradicating *Botrytis cinerea*. *Microbiological research* **197**: 29-38.
- Matilla MA, Daddaoua A, Chini A, Morel B & Krell T (2018) An auxin controls bacterial antibiotics production. *Nucleic acids research* **46**: 11229-11238.
- Maximillian J, Brusseau M, Glenn E & Matthias A (2019) Pollution and environmental perturbations in the global system. *Environmental and Pollution Science*, pp. 457-476. Elsevier.
- Mayer FL & Kronstad JW (2017) Disarming fungal pathogens: *Bacillus safensis* inhibits virulence factor production and biofilm formation by *Cryptococcus neoformans* and *Candida albicans*. *MBio* **8**: e01537-01517.
- Mayer E, Dörr de Quadros P & Fulthorpe R (2019) *Plantibacter flavus*, *Curtobacterium herbarum*, *Paenibacillus taichungensis*, and *Rhizobium selenitireducens* endophytes provide host-specific growth promotion of *Arabidopsis thaliana*, basil, lettuce, and bok choy plants. *Applied and environmental microbiology* **85**: e00383-00319.
- McDevitt S (2009) Methyl red and voges-proskauer test protocols. *American Society for Microbiology* **8**.
- McKinney H (1923) Influence of soil temperature and moisture on infection of wheat seedlings by *Helminthosporium sativum*.
- Medema MH, de Rond T & Moore BS (2021) Mining genomes to illuminate the specialized chemistry of life. *Nature Reviews Genetics* 1-19.
- Medema MH, Kottmann R, Yilmaz P, Cummings M, Biggins JB, Blin K, De Bruijn I, Chooi YH, Claesen J & Coates RC (2015) Minimum information about a biosynthetic gene cluster. *Nature chemical biology* **11**: 625-631.
- Medeot DB, Fernandez M, Morales GM & Jofré E (2020) Fengycins from *Bacillus amyloliquefaciens* MEP218 exhibit antibacterial activity by producing alterations on the cell surface of the pathogens *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* and *Pseudomonas aeruginosa* PA01. *Frontiers in microbiology* **10**: 3107.
- Meena KR & Kanwar SS (2015) Lipopeptides as the antifungal and antibacterial agents: applications in food safety and therapeutics. *BioMed research international* **2015**.

- Meier-Kolthoff JP, Auch AF, Klenk H-P & Göker M (2013) Genome sequence-based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions. *BMC bioinformatics* **14**: 1-14.
- Meier-Kolthoff JP, Carbasse JS, Peinado-Olarte RL & Göker M (2022) TYGS and LPSN: a database tandem for fast and reliable genome-based classification and nomenclature of prokaryotes. *Nucleic acids research* **50**: D801-D807.
- Mena-Violante HG & Olalde-Portugal V (2007) Alteration of tomato fruit quality by root inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): *Bacillus subtilis* BEB-13bs. *Scientia Horticulturae* **113**: 103-106.
- Mendes R, Garbeva P & Raaijmakers JM (2013) The rhizosphere microbiome: significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms. *FEMS microbiology reviews* **37**: 634-663.
- Menéndez E & Paço A (2020) Is the application of plant probiotic bacterial consortia always beneficial for plants? Exploring synergies between rhizobial and non-rhizobial bacteria and their effects on agro-economically valuable crops. *Life* **10**: 24.
- Meng Q, Jiang H & Hao JJ (2016) Effects of *Bacillus velezensis* strain BAC03 in promoting plant growth. *Biological Control* **98**: 18-26.
- Miljaković D, Marinković J & Balešević-Tubić S (2020) The significance of *Bacillus* spp. in disease suppression and growth promotion of field and vegetable crops. *Microorganisms* **8**: 1037.
- Mine A, Nobori T, Salazar- Rondon MC, Winkelmüller TM, Anver S, Becker D & Tsuda K (2017) An incoherent feed- forward loop mediates robustness and tunability in a plant immune network. *EMBO reports* **18**: 464-476.
- Miotto-Vilanova L, Jacquard C, Courteaux B, Wortham L, Michel J, Clément C, Barka EA & Sanchez L (2016) *Burkholderia phytofirmans* PsJN confers grapevine resistance against *Botrytis cinerea* via a direct antimicrobial effect combined with a better resource mobilization. *Frontiers in plant science* **7**: 1236.
- Misganaw G, Simachew A & Gessesse A (2019) Endophytes of finger millet (*Eleusine coracana*) seeds. *Symbiosis* **78**: 203-213.
- Mishra P, Mishra J, Dwivedi S & Arora NK (2020) 10 Microbial Enzymes in Biocontrol of Phytopathogens. *Microbial Enzymes: Roles and Applications in Industries* **11**: 259.
- Mitra D, Mondal R, Khoshru B, Shadangi S, Mohapatra PKD & Panneerselvam P (2021) Rhizobacteria mediated seed bio-priming triggers the resistance and plant growth for sustainable crop production. *Current Research in Microbial Sciences* **2**: 100071.
- Mnif I & Ghribi D (2015) Potential of bacterial derived biopesticides in pest management. *Crop Protection* **77**: 52-64.
- Molina-Favero C, Creus CM, Simontacchi M, Puntarulo S & Lamattina L (2008) Aerobic nitric oxide production by *Azospirillum brasilense* Sp245 and its influence on root architecture in tomato. *Molecular plant-microbe interactions* **21**: 1001-1009.
- Molina-Romero D, Baez A, Quintero-Hernández V, Castañeda-Lucio M, Fuentes-Ramírez LE, Bustillos-Cristales MdR, Rodríguez-Andrade O, Morales-García YE, Munive A & Muñoz-Rojas J (2017) Compatible bacterial mixture, tolerant to desiccation, improves maize plant growth. *PloS one* **12**: e0187913.
- Molohon KJ, Saint-Vincent PM, Park S, Doroghazi JR, Maxson T, Hershfield JR, Flatt KM, Schroeder NE, Ha T & Mitchell DA (2015) Plantazolicin is an ultranarrow-spectrum antibiotic that targets the *Bacillus anthracis* membrane. *ACS infectious diseases* **2**: 207-220.

Mora I, Cabrefiga J & Montesinos E (2015) Cyclic lipopeptide biosynthetic genes and products, and inhibitory activity of plant-associated *Bacillus* against phytopathogenic bacteria. *PLoS One* **10**: e0127738.

Moral J, Bouhmidi K & Trapero A (2008) Influence of fruit maturity, cultivar susceptibility, and inoculation method on infection of olive fruit by *Colletotrichum acutatum*. *Plant disease* **92**: 1421-1426.

Morales-Cedeno LR, del Carmen Orozco-Mosqueda M, Loeza-Lara PD, Parra-Cota FI, de Los Santos-Villalobos S & Santoyo G (2021) Plant growth-promoting bacterial endophytes as biocontrol agents of pre-and post-harvest diseases: Fundamentals, methods of application and future perspectives. *Microbiological Research* **242**: 126612.

Morris EC, Griffiths M, Golebiowska A, Mairhofer S, Burr-Hersey J, Goh T, Von Wangenheim D, Atkinson B, Sturrock CJ & Lynch JP (2017) Shaping 3D root system architecture. *Current Biology* **27**: R919-R930.

Mousa WK, Shearer C, Limay-Rios V, Ettinger CL, Eisen JA & Raizada MN (2016) Root-hair endophyte stacking in finger millet creates a physicochemical barrier to trap the fungal pathogen *Fusarium graminearum*. *Nature microbiology* **1**: 1-12.

Müller S, Strack SN, Hoefler BC, Straight PD, Kearns DB & Kirby JR (2014) Bacillaene and sporulation protect *Bacillus subtilis* from predation by *Myxococcus xanthus*. *Applied and environmental microbiology* **80**: 5603-5610.

Mullins AJ, Li Y, Qin L, Hu X, Xie L, Gu C, Mahenthiralingam E, Liao X & Webster G (2020) Reclassification of the biocontrol agents *Bacillus subtilis* BY-2 and Tu-100 as *Bacillus velezensis* and insights into the genomic and specialized metabolite diversity of the species. *Microbiology* **166**: 1121.

Mülner P, Schwarz E, Dietel K, Junge H, Herfort S, Weydmann M, Lasch P, Cernava T, Berg G & Vater J (2020) Profiling for bioactive peptides and volatiles of plant growth promoting strains of the *bacillus subtilis* complex of industrial relevance. *Frontiers in Microbiology* **11**: 1432.

Myresiotis CK, Karaoglanidis GS, Vryzas Z & Papadopoulou- Mourkidou E (2012) Evaluation of plant- growth- promoting rhizobacteria, acibenzolar- S- methyl and hymexazol for integrated control of *Fusarium* crown and root rot on tomato. *Pest management science* **68**: 404-411.

Naruse N, Tenmyo O, Kobaru S, Kamei H, Miyaki T, Konishi M & Oki T (1990) Pumilacidin, a complex of new antiviral antibiotics production, isolation, chemical properties, structure and biological activity. *The Journal of antibiotics* **43**: 267-280.

Nasfi Z, Busch H, Kehraus S, Linares-Otoya L, König GM, Schäberle TF & Bachoual R (2018) Soil bacteria isolated from Tunisian arid areas show promising antimicrobial activities against gram-negatives. *Frontiers in microbiology* **9**: 2742.

Nelson EB (2018) The seed microbiome: origins, interactions, and impacts. *Plant and Soil* **422**: 7-34.

Nelson R, Wiesner-Hanks T, Wissner R & Balint-Kurti P (2018) Navigating complexity to breed disease-resistant crops. *Nature Reviews Genetics* **19**: 21-33.

Newton R, Amstutz J & Patrick JE (2020) Biofilm formation by *Bacillus subtilis* is altered in the presence of pesticides. *Access microbiology* **2**.

Ngalimat MS, Yahaya RSR, Baharudin MMA-a, Yaminudin SM, Karim M, Ahmad SA & Sabri S (2021) A review on the biotechnological applications of the operational group *Bacillus amyloliquefaciens*. *Microorganisms* **9**: 614.

Nguyen Q-M, Iswanto ABB, Son GH & Kim SH (2021) Recent advances in effector-triggered

immunity in plants: new pieces in the puzzle create a different paradigm. *International Journal of Molecular Sciences* **22**: 4709.

Nicolopoulou-Stamati P, Maipas S, Kotampasi C, Stamatis P & Hens L (2016) Chemical pesticides and human health: the urgent need for a new concept in agriculture. *Frontiers in public health* **4**: 148.

Nicot PC, Stewart A, Bardin M & Elad Y (2016) Biological control and biopesticide suppression of *Botrytis*-incited diseases. *Botrytis—the fungus, the pathogen and its management in agricultural systems*, pp. 165-187. Springer.

Nifakos K, Tsalgatidou PC, Thomloui E-E, Skagia A, Kotopoulis D, Baira E, Delis C, Papadimitriou K, Markellou E & Venieraki A (2021) Genomic Analysis and Secondary Metabolites Production of the Endophytic *Bacillus velezensis* Bvel1: A Biocontrol Agent against *Botrytis cinerea* Causing Bunch Rot in Post-Harvest Table Grapes. *Plants* **10**: 1716.

Niu D-D, Liu H-X, Jiang C-H, Wang Y-P, Wang Q-Y, Jin H-L & Guo J-H (2011) The plant growth-promoting rhizobacterium *Bacillus cereus* AR156 induces systemic resistance in *Arabidopsis thaliana* by simultaneously activating salicylate- and jasmonate/ethylene-dependent signaling pathways. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **24**: 533-542.

Niu B, Wang W, Yuan Z, Sederoff RR, Sederoff H, Chiang VL & Borriss R (2020) Microbial interactions within multiple-strain biological control agents impact soil-borne plant disease. *Frontiers in Microbiology* **11**: 2452.

Noll KS, Sinko PJ & Chikindas ML (2011) Elucidation of the molecular mechanisms of action of the natural antimicrobial peptide subtilisin against the bacterial vaginosis-associated pathogen *Gardnerella vaginalis*. *Probiotics and antimicrobial proteins* **3**: 41-47.

O'Callaghan M (2016) Microbial inoculation of seed for improved crop performance: issues and opportunities. *Applied microbiology and biotechnology* **100**: 5729-5746.

Ogran A, Yardeni EH, Keren-Paz A, Bucher T, Jain R, Gilhar O & Kolodkin-Gal I (2019) The plant host induces antibiotic production to select the most-beneficial colonizers. *Applied and environmental microbiology* **85**: e00512-00519.

Olishevskaya S, Nickzad A & Déziel E (2019) *Bacillus* and *Paenibacillus* secreted polyketides and peptides involved in controlling human and plant pathogens. *Applied microbiology and biotechnology* **103**: 1189-1215.

On A, Wong F, Ko Q, Tweddell RJ, Antoun H, Avis TJ (2015) Antifungal effects of compost tea microorganisms on tomato pathogens. *Biological Control* **80**:63-69

Ongena M & Jacques P (2008) *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends in microbiology* **16**: 115-125.

Ongena M, Jourdan E, Adam A, Paquot M, Brans A, Joris B, Arpigny JL & Thonart P (2007) Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. *Environmental microbiology* **9**: 1084-1090.

Orozco-Mosqueda M, Duan J, DiBernardo M, Zetter E, Campos-García J, Glick BR & Santoyo G (2019) The production of ACC deaminase and trehalose by the plant growth promoting bacterium *Pseudomonas* sp. UW4 synergistically protect tomato plants against salt stress. *Frontiers in microbiology* **10**: 1392.

Ortiz-Castro R, Díaz-Pérez C, Martínez-Trujillo M, Rosa E, Campos-García J & López-Bucio J (2011) Transkingdom signaling based on bacterial cyclodipeptides with auxin activity in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108**: 7253-7258.

Ortiz-Castro R, Pelagio-Flores R, Méndez-Bravo A, Ruiz-Herrera LF, Campos-García J & López-

Bucio J (2014) Pyocyanin, a virulence factor produced by *Pseudomonas aeruginosa*, alters root development through reactive oxygen species and ethylene signaling in *Arabidopsis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **27**: 364-378.

O'Toole GA (2011) Microtiter dish biofilm formation assay. *Journal of visualized experiments: JoVE*.

Oukala N, Aissat K & Pastor V (2021) Bacterial Endophytes: The Hidden Actor in Plant Immune Responses against Biotic Stress. *Plants* **10**: 1012.

Palazzini JM, Dunlap CA, Bowman MJ & Chulze SN (2016) *Bacillus velezensis* RC 218 as a biocontrol agent to reduce *Fusarium* head blight and deoxynivalenol accumulation: genome sequencing and secondary metabolite cluster profiles. *Microbiological research* **192**: 30-36.

Palmieri D, Vitullo D, De Curtis F & Lima G (2017) A microbial consortium in the rhizosphere as a new biocontrol approach against *fusarium* decline of chickpea. *Plant and soil* **412**: 425-439.

Pande A, Mun B-G, Lee D-S, Khan M, Lee G-M, Hussain A & Yun B-W (2021) NO Network for Plant-Microbe Communication Underground: A Review. *Frontiers in Plant Science* **12**: 431.

Pandin C, Le Coq D, Canette A, Aymerich S & Briandet R (2017) Should the biofilm mode of life be taken into consideration for microbial biocontrol agents? *Microbial Biotechnology* **10**: 719-734.

Paparella S, Araújo S, Rossi G, Wijayasinghe M, Carbonera D & Balestrazzi A (2015) Seed priming: state of the art and new perspectives. *Plant cell reports* **34**: 1281-1293.

Papik J, Folkmanova M, Polivkova M, Suman J & Uhlik O (2020) The invisible life inside plants: Deciphering the riddles of endophytic bacterial diversity. *Biotechnology advances* 107614.

Parafati L, Vitale A, Restuccia C & Cirvilleri G (2015) Biocontrol ability and action mechanism of food-isolated yeast strains against *Botrytis cinerea* causing post-harvest bunch rot of table grape. *Food microbiology* **47**: 85-92.

Parikh L & Adesemoye A (2018) Impact of delivery method on the efficacy of biological control agents and the virulence of *Fusarium* root rot pathogens in the greenhouse. *Biocontrol Science and Technology* **28**: 1191-1202.

Park K, Park Y-S, Ahamed J, Dutta S, Ryu H, Lee S-H, Balaraju K, Manir M & Moon S-S (2016) Elicitation of induced systemic resistance of chili pepper by iturin A analogs derived from *Bacillus vallismortis* EXTN-1. *Canadian Journal of Plant Science* **96**: 564-570.

Parker JB & Walsh CT (2013) Action and timing of BacC and BacD in the late stages of biosynthesis of the dipeptide antibiotic bacilysin. *Biochemistry* **52**: 889-901.

Partida-Martinez LPP & Heil M (2011) The microbe-free plant: fact or artifact? *Frontiers in plant science* **2**: 100.

Patra P, Vassallo CN, Wall D & Igoshin OA (2017) Mechanism of kin-discriminatory demarcation line formation between colonies of swarming bacteria. *Biophysical journal* **113**: 2477-2486.

Patten CL & Glick BR (2002) Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. *Applied and environmental microbiology* **68**: 3795-3801.

Patten CL, Blakney AJ & Coulson TJ (2013) Activity, distribution and function of indole-3-acetic acid biosynthetic pathways in bacteria. *Critical reviews in microbiology* **39**: 395-415.

Paul D & Sinha SN (2017) Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacterium *Pseudomonas aeruginosa* KUPSB12 with antibacterial potential from river Ganga, India. *Annals of Agrarian Science* **15**: 130-136.

Paungfoo-Lonhienne C, Rentsch D, Robatzek S, Webb RI, Sagulenko E, Näsholm T, Schmidt S &

- Lonhienne TG (2010) Turning the table: plants consume microbes as a source of nutrients. *PLOS one* **5**: e11915.
- Pečenková T, Janda M, Ortmannová J, Hajná V, Stehlíková Z & Žárský V (2017) Early *Arabidopsis* root hair growth stimulation by pathogenic strains of *Pseudomonas syringae*. *Annals of botany* **120**: 437-446.
- Pel MJ & Pieterse CM (2013) Microbial recognition and evasion of host immunity. *Journal of experimental botany* **64**: 1237-1248.
- Peng G, Zhao X, Li Y, Wang R, Huang Y & Qi G (2019) Engineering *Bacillus velezensis* with high production of acetoin primes strong induced systemic resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Microbiological research* **227**: 126297.
- Péret B, Desnos T, Jost R, Kanno S, Berkowitz O & Nussaume L (2014) Root architecture responses: in search of phosphate. *Plant physiology* **166**: 1713-1723.
- Perez RH, Zendo T & Sonomoto K (2018) Circular and leaderless bacteriocins: biosynthesis, mode of action, applications, and prospects. *Frontiers in microbiology* **9**: 2085.
- Persello-Cartieaux F, David P, Sarrobert C, Thibaud M-C, Achouak W, Robaglia C & Nussaume L (2001) Utilization of mutants to analyze the interaction between *Arabidopsis thaliana* and its naturally root-associated *Pseudomonas*. *Planta* **212**: 190-198.
- Pertot I, Alabouvette C, Esteve E & Franca S (2015) The use of microbial biocontrol agents against soil-borne diseases. Retrieved from European Commission EIPAGRI Focus Group.: https://ec.europa.eu/eip/agriculture/sites/agrieip/files/8_eip_sbd_mp_biocontrol_final.pdf.
- Pertot I, Giovannini O, Benanchi M, Caffi T, Rossi V & Mugnai L (2017) Combining biocontrol agents with different mechanisms of action in a strategy to control *Botrytis cinerea* on grapevine. *Crop Protection* **97**: 85-93.
- Peypoux F, Bonmatin J & Wallach J (1999) Recent trends in the biochemistry of surfactin. *Applied microbiology and biotechnology* **51**: 553-563.
- Peypoux F, Besson F, Michel G & Delcambe L (1981) Structure of bacillomycin D, a new antibiotic of the iturin group. *European journal of biochemistry* **118**: 323-327.
- Peypoux F, Besson F, Michel G, LENZEN C, DIERICKX L & DELCAMBE L (1980) Characterization of a new antibiotic of iturin group: Bacillomycin D. *The Journal of Antibiotics* **33**: 1146-1149.
- Peypoux F, Pommier M, Marion D, Ptak M, Das B & Michel G (1986) Revised structure of mycosubtilin, a peptidolipid antibiotic from *Bacillus subtilis*. *The Journal of Antibiotics* **39**: 636-641.
- Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research* **29**: e45-e45.
- Philippot L, Raaijmakers JM, Lemanceau P & Van Der Putten WH (2013) Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. *Nature Reviews Microbiology* **11**: 789-799.
- Pieterse CM, Van der Does D, Zamioudis C, Leon-Reyes A & Van Wees SC (2012) Hormonal modulation of plant immunity. *Annual review of cell and developmental biology* **28**: 489-521.
- Pieterse CM, Zamioudis C, Berendsen RL, Weller DM, Van Wees SC & Bakker PA (2014) Induced systemic resistance by beneficial microbes. *Annual review of phytopathology* **52**: 347-375.
- Pii Y, Mimmo T, Tomasi N, Terzano R, Cesco S & Crecchio C (2015) Microbial interactions in the rhizosphere: beneficial influences of plant growth-promoting rhizobacteria on nutrient acquisition process. A review. *Biology and fertility of soils* **51**: 403-415.

Pikovskaya R (1948) Mobilization of phosphorus in soil in connection with the vital activity of some microbial species, *Mikrobiologiya* 17, 362–370. *the text*.

Pingping S, Jianchao C, Xiaohui J & Wenhui W (2017) Isolation and characterization of *Bacillus amyloliquefaciens* L-1 for biocontrol of pear ring rot. *Horticultural Plant Journal* 3: 183-189.

Pirttilä AM, Mohammad Parast Tabas H, Baruah N & Koskimäki JJ (2021) Biofertilizers and Biocontrol Agents for Agriculture: How to Identify and Develop New Potent Microbial Strains and Traits. *Microorganisms* 9: 817.

Pliego C, De Weert S, Lamers G, De Vicente A, Bloemberg G, Cazorla FM & Ramos C (2008) Two similar enhanced root- colonizing *Pseudomonas* strains differ largely in their colonization strategies of avocado roots and *Rosellinia necatrix* hyphae. *Environmental Microbiology* 10: 3295-3304.

Portieles R, Xu H, Yue Q, Zhao L, Zhang D, Du L, Gao X, Gao J, Gonzalez NP & Bermudez RS (2021) Heat-killed endophytic bacterium induces robust plant defense responses against important pathogens. *Scientific Reports* 11: 1-14.

Poupin MJ, Greve M, Carmona V & Pinedo I (2016) A complex molecular interplay of auxin and ethylene signaling pathways is involved in *Arabidopsis* growth promotion by *Burkholderia phytofirmans* PsJN. *Frontiers in plant science* 7: 492.

Poupin MJ, Timmermann T, Vega A, Zuñiga A & González B (2013) Effects of the plant growth-promoting bacterium *Burkholderia phytofirmans* PsJN throughout the life cycle of *Arabidopsis thaliana*. *PLoS One* 8: e69435.

Prabhu N, Borkar S & Garg S (2019) Phosphate solubilization by microorganisms: overview, mechanisms, applications and advances. *Advances in Biological Science Research* 161-176.

Prakash J & Arora NK (2020) Development of *Bacillus safensis*-based liquid bioformulation to augment growth, stevioside content, and nutrient uptake in *Stevia rebaudiana*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 36: 1-13.

Prieto P, Schilirò E, Maldonado-González MM, Valderrama R, Barroso-Albarracín JB & Mercado-Blanco J (2011) Root hairs play a key role in the endophytic colonization of olive roots by *Pseudomonas* spp. with biocontrol activity. *Microbial ecology* 62: 435-445.

Pršić J & Ongena M (2020) Elicitors of plant immunity triggered by beneficial bacteria. *Frontiers in Plant Science* 11.

Pueyo MT, Mutafci BA, Soto-Arriaza MA, Di Mascio P & Carmona-Ribeiro AM (2014) The self-assembly of a cyclic lipopeptides mixture secreted by a *B. megaterium* strain and its implications on activity against a sensitive *Bacillus* species. *Plos one* 9: e97261.

Qi G, Zhu F, Du P, Yang X, Qiu D, Yu Z, Chen J & Zhao X (2010) Lipopeptide induces apoptosis in fungal cells by a mitochondria-dependent pathway. *Peptides* 31: 1978-1986.

Qiao J, Yu X, Liang X, Liu Y, Borriss R & Liu Y (2017) Addition of plant-growth-promoting *Bacillus subtilis* PTS-394 on tomato rhizosphere has no durable impact on composition of root microbiome. *BMC microbiology* 17: 1-12.

Quach NT, Vu THN, Nguyen NA, Bui TL, Ky SC, Le TL, Hoang H, Ngo CC, Le TTM & Nguyen TN (2021) Phenotypic features and analysis of genes supporting probiotic action unravel underlying perspectives of *Bacillus velezensis* VTX9 as a potential feed additive for swine. *Annals of Microbiology* 71: 1-14.

Quesada-Moraga E, López-Díaz C & Landa BB (2014) The hidden habit of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*: first demonstration of vertical plant transmission. *PLoS One* 9: e89278.

Quinet M, Angosto T, Yuste-Lisbona FJ, Blanchard-Gros R, Bigot S, Martinez J-P & Lutts S (2019)

Tomato fruit development and metabolism. *Frontiers in plant science* **10**: 1554.

Raaijmakers JM, De Bruijn I, Nybroe O & Ongena M (2010) Natural functions of lipopeptides from *Bacillus* and *Pseudomonas*: more than surfactants and antibiotics. *FEMS microbiology reviews* **34**: 1037-1062.

Rafi MM, Krishnaveni M & Charyulu P (2019) Phosphate-solubilizing microorganisms and their emerging role in sustainable agriculture. *Recent Developments in Applied Microbiology and Biochemistry* 223-233.

Rahmouni F, Saoudi M & Rebai T (2021) Therapeutics studies and biological properties of *Teucrium polium* (Lamiaceae). *BioFactors*.

Rais A, Jabeen Z, Shair F, Hafeez FY & Hassan MN (2017) *Bacillus* spp., a bio-control agent enhances the activity of antioxidant defense enzymes in rice against *Pyricularia oryzae*. *PLoS One* **12**: e0187412.

Ramakers C, Ruijter JM, Deprez RHL & Moorman AF (2003) Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neuroscience letters* **339**: 62-66.

Rana A, Joshi M, Prasanna R, Shivay YS & Nain L (2012) Biofortification of wheat through inoculation of plant growth promoting rhizobacteria and cyanobacteria. *European Journal of Soil Biology* **50**: 118-126.

Raymaekers K, Ponet L, Holtappels D, Berckmans B & Cammue BP (2020) Screening for novel biocontrol agents applicable in plant disease management—a review. *Biological Control* **144**: 104240.

Recena R, Díaz I & Delgado A (2017) Estimation of total plant available phosphorus in representative soils from Mediterranean areas. *Geoderma* **297**: 10-18.

Reimer JM, Haque AS, Tarry MJ & Schmeing TM (2018) Piecing together nonribosomal peptide synthesis. *Current opinion in structural biology* **49**: 104-113.

Remans R, Beebe S, Blair M, Manrique G, Tovar E, Rao I, Croonenborghs A, Torres-Gutierrez R, El-Howeity M & Michiels J (2008) Physiological and genetic analysis of root responsiveness to auxin-producing plant growth-promoting bacteria in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant and soil* **302**: 149-161.

Rendueles O, Zee PC, Dinkelacker I, Amherd M, Wielgoss S & Velicer GJ (2015) Rapid and widespread de novo evolution of kin discrimination. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **112**: 9076-9081.

Reva ON, Swanevelder DZ, Mwita LA, Mwakilili AD, Muzondiwa D, Joubert M, Chan WY, Lutz S, Ahrens CH & Avdeeva LV (2019) Genetic, epigenetic and phenotypic diversity of four *Bacillus velezensis* strains used for plant protection or as probiotics. *Frontiers in microbiology* **10**: 2610.

Reva ON, Larisa SA, Mwakilili AD, Tibuhwa D, Lyantagaye S, Chan WY, Lutz S, Ahrens CH, Vater J & Borriss R (2020) Complete genome sequence and epigenetic profile of *Bacillus velezensis* UCMB5140 used for plant and crop protection in comparison with other plant-associated *Bacillus* strains. *Applied Microbiology and Biotechnology* **104**: 7643-7656.

Reyes-Estebanez M, Sanmartin P, Camacho-Chab JC, Susana C, Chan-Bacab MJ, Águila-Ramírez RN, Carrillo-Villanueva F, De la Rosa-Escalante E, Arteaga-Garma JL & Serrano M (2020) Characterization of a native *Bacillus velezensis*-like strain for the potential biocontrol of tropical fruit pathogens. *Biological Control* **141**: 104127.

Rieusset L, Rey M, Muller D, Vacheron J, Gerin F, Dubost A, Comte G & Prigent-Combaret C (2020) Secondary metabolites from plant-associated *Pseudomonas* are overproduced in biofilm. *Microbial biotechnology* **13**: 1562-1580.

Riquelme-Toledo D, Valdés-Gómez H, Fermaud M & Zoffoli JP (2020) Postharvest Incidence of Stem End Rot in ‘Hayward’Kiwifruit Is Related to Preharvest *Botrytis cinerea* Colonization of Floral Parts and Latent Infection. *Plant disease* **104**: 823-832.

Robertson GP & Vitousek PM (2009) Nitrogen in agriculture: balancing the cost of an essential resource. *Annual review of environment and resources* **34**: 97-125.

Rodríguez J, Tonelli M, Figueredo M, Ibáñez F & Fabra A (2018) The lipopeptide surfactin triggers induced systemic resistance and priming state responses in *Arachis hypogaea* L. *European Journal of Plant Pathology* **152**: 845-851.

Romanazzi G, Smilanick JL, Feliziani E & Droby S (2016) Integrated management of postharvest gray mold on fruit crops. *Postharvest Biology and Technology* **113**: 69-76.

Romero D, de Vicente A, Rakotoaly RH, Dufour SE, Veening J-W, Arrebola E, Cazorla FM, Kuipers OP, Paquot M & Pérez-García A (2007) The iturin and fengycin families of lipopeptides are key factors in antagonism of *Bacillus subtilis* toward *Podosphaera fusca*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **20**: 430-440.

Romero-Severson J, Moran TE, Shrader DG, Fields FR, Pandey-Joshi S, Thomas CL, Palmer EC, Shroud JD, Pfrender ME & Lee SW (2021) A Seed-Endophytic *Bacillus safensis* Strain With Antimicrobial Activity Has Genes for Novel Bacteriocin-Like Antimicrobial Peptides. *Frontiers in microbiology* **12**.

Rooney AP, Price NP, Ehrhardt C, Swezey JL & Bannan JD (2009) Phylogeny and molecular taxonomy of the *Bacillus subtilis* species complex and description of *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum* subsp. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* **59**: 2429-2436.

Rotenberg D, Thompson TS, German TL & Willis DK (2006) Methods for effective real-time RT-PCR analysis of virus-induced gene silencing. *Journal of virological methods* **138**: 49-59.

Rotolo C, De Miccolis Angelini RM, Dongiovanni C, Pollastro S, Fumarola G, Di Carolo M, Perrelli D, Natale P & Faretra F (2018) Use of biocontrol agents and botanicals in integrated management of *Botrytis cinerea* in table grape vineyards. *Pest management science* **74**: 715-725.

Rouphael Y & Colla G (2020) Biostimulants in agriculture. *Frontiers in plant science* **11**: 40.

Roy T, Bandopadhyay A, Sonawane PJ, Majumdar S, Mahapatra NR, Alam S & Das N (2018) Bio-effective disease control and plant growth promotion in lentil by two pesticide degrading strains of *Bacillus* sp. *Biological Control* **127**: 55-63.

Rudrappa T, Biedrzycki ML, Kunjeti SG, Donofrio NM, Czymmek KJ, Paul W P & Bais HP (2010) The rhizobacterial elicitor acetoin induces systemic resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Communicative & Integrative Biology* **3**: 130-138.

Rudrappa T, Czymmek KJ, Paré PW, Bais HP (2008) Root-secreted malic acid recruits beneficial soil bacteria. *Plant physiology* **148** (3):1547-1556.

Ruffel S, Krouk G, Ristova D, Shasha D, Birnbaum KD & Coruzzi GM (2011) Nitrogen economics of root foraging: transitive closure of the nitrate–cytokinin relay and distinct systemic signaling for N supply vs. demand. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108**: 18524-18529.

Rungsirivanich P, Parlindungan E, O’Connor P, Field D, Mahony J, Thongwai N & van Sinderen D (2021) Simultaneous Production of Multiple Antimicrobial Compounds by *Bacillus velezensis* ML122-2 Isolated From Assam Tea Leaf [*Camellia sinensis* var. *assamica* (JW Mast.) Kitam.]. *Frontiers in microbiology* **12**.

Ryu C-M, Hu C-H, Locy RD & Kloepper JW (2005) Study of mechanisms for plant growth

promotion elicited by rhizobacteria in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Soil* **268**: 285-292.

Ryu C-M, Farag MA, Hu C-H, Reddy MS, Wei H-X, Paré PW & Kloepper JW (2003) Bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **100**: 4927-4932.

Saggese A, Culurciello R, Casillo A, Corsaro MM, Ricca E & Baccigalupi L (2018) A marine isolate of *Bacillus pumilus* secretes a pumilacidin active against *Staphylococcus aureus*. *Marine drugs* **16**: 180.

Sagredo-Beltrán J, De La Cruz-Rodríguez Y, Alvarado-Rodríguez M, Vega-Arreguín J, Rodríguez-Guerra R, Alvarado-Gutiérrez A & Fraire-Velázquez S (2018) Genome sequence of *Bacillus halotolerans* strain MS50-18A with antifungal activity against phytopathogens, isolated from saline soil in San Luis Potosí, Mexico. *Genome announcements* **6**: e00135-00118.

Saitou N & Nei M (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular biology and evolution* **4**: 406-425.

Salehin A, Puri RR, Hafiz MHR & Itoh K (2021) Effect of Co-Inoculation of *Bacillus* sp. Strain with Bacterial Endophytes on Plant Growth and Colonization in Tomato Plant (*Solanum lycopersicum*). *Microbiology Research* **12**: 480-490.

Salvatierra- Martinez R, Arancibia W, Araya M, Aguilera S, Olalde V, Bravo J & Stoll A (2018) Colonization ability as an indicator of enhanced biocontrol capacity—An example using two *Bacillus amyloliquefaciens* strains and *Botrytis cinerea* infection of tomatoes. *Journal of Phytopathology* **166**: 601-612.

Samaras A, Karaoglanidis GS & Tzelepis G (2021) Insights into the multitrophic interactions between the biocontrol agent *Bacillus subtilis* MBI 600, the pathogen *Botrytis cinerea* and their plant host. *Microbiological Research* **248**: 126752.

Sami F, Faizan M, Faraz A, Siddiqui H, Yusuf M & Hayat S (2018) Nitric oxide-mediated integrative alterations in plant metabolism to confer abiotic stress tolerance, NO crosstalk with phytohormones and NO-mediated post translational modifications in modulating diverse plant stress. *Nitric Oxide* **73**: 22-38.

Samuel SO, Suzuki K, Asiloglu R & Harada N (2022) Soil-root interface influences the assembly of the endophytic bacterial community in rice plants. *Biology and Fertility of Soils* **58**: 35-48.

Santoyo G (2021) How plants recruit their microbiome? New insights into beneficial interactions. *Journal of Advanced Research*.

Santoyo G, Moreno-Hagelsieb G, del Carmen Orozco-Mosqueda M & Glick BR (2016) Plant growth-promoting bacterial endophytes. *Microbiological research* **183**: 92-99.

Santoyo G, Guzmán-Guzmán P, Parra-Cota FI, Santos-Villalobos Sdl, Orozco-Mosqueda M & Glick BR (2021) Plant Growth Stimulation by Microbial Consortia. *Agronomy* **11**: 219.

Sarkar J, Chakraborty U & Chakraborty B (2018) Induced defense response in wheat plants against *Bipolaris sorokiniana* following application of *Bacillus safensis* and *Ochrobactrum pseudogrignonense*. *Indian Phytopathology* **71**: 49-58.

Sarma BK, Yadav SK, Singh S & Singh HB (2015) Microbial consortium-mediated plant defense against phytopathogens: readdressing for enhancing efficacy. *Soil Biology and Biochemistry* **87**: 25-33.

Sarwar A, Hassan MN, Imran M, Iqbal M, Majeed S, Brader G, Sessitsch A & Hafeez FY (2018) Biocontrol activity of surfactin A purified from *Bacillus* NH-100 and NH-217 against rice bakanae disease. *Microbiological research* **209**: 1-13.

Satomi M, La Duc MT & Venkateswaran K (2006) *Bacillus safensis* sp. nov., isolated from spacecraft and assembly-facility surfaces. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* **56**: 1735-1740.

Savci S (2012) An agricultural pollutant: chemical fertilizer. *International Journal of Environmental Science and Development* **3**: 73.

Schlemper TR, Leite MF, Lucheta AR, Shimels M, Bouwmeester HJ, van Veen JA & Kuramae EE (2017) Rhizobacterial community structure differences among sorghum cultivars in different growth stages and soils. *FEMS microbiology ecology* **93**.

Schmidt W (1999) Mechanisms and regulation of reduction-based iron uptake in plants. *The New Phytologist* **141**: 1-26.

Schneider K, Chen X-H, Vater J, Franke P, Nicholson G, Borriss R & Süssmuth RD (2007) Macrolactin is the polyketide biosynthesis product of the pks2 cluster of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Journal of natural products* **70**: 1417-1423.

Scholz R, Molohon KJ, Nachtigall J, Vater J, Markley AL, Süssmuth RD, Mitchell DA & Borriss R (2011) Plantazolicin, a novel microcin B17/streptolysin S-like natural product from *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Journal of bacteriology* **193**: 215-224.

Scholz R, Vater J, Budiharjo A, Wang Z, He Y, Dietel K, Schwecke T, Herfort S, Lasch P & Borriss R (2014) Amylocyclicin, a novel circular bacteriocin produced by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Journal of Bacteriology* **196**: 1842-1852.

Schütz L, Gattinger A, Meier M, Müller A, Boller T, Mäder P & Mathimaran N (2018) Improving crop yield and nutrient use efficiency via biofertilization—A global meta-analysis. *Frontiers in Plant Science* **8**: 2204.

Schwyn B & Neilands J (1987) Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical biochemistry* **160**: 47-56.

Selim K, El-Beih A, Abdel-Rahman T & El-Diwany A (2011) Biodiversity and antimicrobial activity of endophytes associated with Egyptian medicinal plants. *Mycosphere* **2**: 669-678.

Semighini CP & Harris SD (2010) Methods to detect apoptotic-like cell death in filamentous fungi. *Molecular and Cell Biology Methods for Fungi*, pp. 269-279. Springer.

Seo D-J, Lee J-H, Song Y-S, Park R-D & Jung W-J (2014) Expression patterns of chitinase and chitosanase produced from *Bacillus cereus* in suppression of phytopathogen. *Microbial pathogenesis* **73**: 31-36.

Sessitsch A & Mitter B (2015) 21st century agriculture: integration of plant microbiomes for improved crop production and food security. *Microbial biotechnology* **8**: 32.

Sessitsch A, Pfaffenbichler N & Mitter B (2019) Microbiome applications from lab to field: facing complexity. *Trends in plant science* **24**: 194-198.

Shade A, Jacques M-A & Barret M (2017) Ecological patterns of seed microbiome diversity, transmission, and assembly. *Current opinion in microbiology* **37**: 15-22.

Shahzad R, Khan AL, Bilal S, Asaf S & Lee I-J (2018) What is there in seeds? Vertically transmitted endophytic resources for sustainable improvement in plant growth. *Frontiers in plant science* **9**: 24.

Sharma R, Singh D & Singh R (2009) Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: A review. *Biological control* **50**: 205-221.

Sharma SB, Sayyed RZ, Trivedi MH & Gobi TA (2013) Phosphate solubilizing microbes:

sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. *SpringerPlus* **2**: 1-14.

Shaw MW, Emmanuel CJ, Emilda D, Terhem RB, Shafia A, Tsamaidi D, Emblow M & Van Kan JA (2016) Analysis of cryptic, systemic *Botrytis* infections in symptomless hosts. *Frontiers in Plant Science* **7**: 625.

Shehata HR, Lyons EM, Jordan KS & Raizada MN (2016) Relevance of in vitro agar based screens to characterize the anti-fungal activities of bacterial endophyte communities. *BMC microbiology* **16**: 1-7.

Shelake RM, Pramanik D & Kim J-Y (2019) Exploration of plant-microbe interactions for sustainable agriculture in CRISPR era. *Microorganisms* **7**: 269.

Shelburne CE, An FY, Dholpe V, Ramamoorthy A, Lopatin DE & Lantz MS (2007) The spectrum of antimicrobial activity of the bacteriocin subtilosin A. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **59**: 297-300.

Shi C-L, Park H-B, Lee JS, Ryu S & Ryu C-M (2010) Inhibition of primary roots and stimulation of lateral root development in *Arabidopsis thaliana* by the rhizobacterium *Serratia marcescens* 90–166 is through both auxin-dependent and-independent signaling pathways. *Molecules and cells* **29**: 251-258.

Shi X-C, Wang S-Y, Duan X-C, Wang Y-Z, Liu F-Q, Laborda P (2021) Biocontrol strategies for the management of *Colletotrichum* species in postharvest fruits. *Crop Protection* **141**:105454

Shweta S, Bindu JH, Raghu J, Suma H, Manjunatha B, Kumara PM, Ravikanth G, Nataraja K, Ganeshiah K & Shaanker RU (2013) Isolation of endophytic bacteria producing the anti-cancer alkaloid camptothecine from *Miquelia dentata* Bedd.(*Icacinaceae*). *Phytomedicine* **20**: 913-917.

Siedler S, Balti R & Neves AR (2019) Bioprotective mechanisms of lactic acid bacteria against fungal spoilage of food. *Current opinion in biotechnology* **56**: 138-146.

Silambarasan S, Logeswari P, Cornejo P & Kannan VR (2019) Role of plant growth-promoting rhizobacterial consortium in improving the *Vigna radiata* growth and alleviation of aluminum and drought stresses. *Environmental Science and Pollution Research* **26**: 27647-27659.

Silva C, Vitorino L, Mendonça M, Araújo W, Dourado M, Albuquerque L, Soares M & Souchie E (2020) Screening of plant growth-promoting endophytic bacteria from the roots of the medicinal plant *Aloe vera*. *South African Journal of Botany* **134**: 3-16.

Singh D & Sharma R (2018) Postharvest diseases of fruits and vegetables and their management. *Postharvest disinfection of fruits and vegetables*, pp. 1-52. Elsevier.

Singh U, Walvekar VA & Sharma S (2020) Microbiome as Sensitive Markers for Risk Assessment of Pesticides. *Pesticides in Crop Production: Physiological and Biochemical Action* 89-108.

Slama HB, Cherif-Silini H, Chenari Bouket A, Qader M, Silini A, Yahiaoui B, Alenezi FN, Luptakova L, Triki MA & Vallat A (2019) Screening for *Fusarium* antagonistic bacteria from contrasting niches designated the endophyte *Bacillus halotolerans* as plant warden against *Fusarium*. *Frontiers in microbiology* **9**: 3236.

Slomka S, Françoise I, Hornung G, Asraf O, Biniashvili T, Pilpel Y & Dahan O (2020) Experimental evolution of *bacillus subtilis* reveals the evolutionary dynamics of horizontal gene transfer and suggests adaptive and neutral effects. *Genetics* **216**: 543-558.

Snook ME, Mitchell T, Hinton DM & Bacon CW (2009) Isolation and characterization of Leu7-surfactin from the endophytic bacterium *Bacillus mojavensis* RRC 101, a biocontrol agent for *Fusarium verticillioides*. *Journal of agricultural and food chemistry* **57**: 4287-4292.

Song GC, Choi HK, Kim YS, Choi JS & Ryu C-M (2017) Seed defense bioprimering with bacterial cyclodipeptides triggers immunity in cucumber and pepper. *Scientific reports* **7**: 1-15.

- Song S, Guo Y, Kim J-S, Wang X & Wood TK (2019) Phages mediate bacterial self-recognition. *Cell reports* **27**: 737-749. e734.
- Soto JO (2021) Feed intake improvement, gut microbiota modulation and pathogens control by using *Bacillus* species in shrimp aquaculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **37**: 1-7.
- Sowley EN, Dewey FM & Shaw MW (2010) Persistent, symptomless, systemic, and seed-borne infection of lettuce by *Botrytis cinerea*. *European Journal of Plant Pathology* **126**: 61-71.
- Spaepen S, Vanderleyden J & Remans R (2007) Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS microbiology reviews* **31**: 425-448.
- Spaepen S, Bossuyt S, Engelen K, Marchal K & Vanderleyden J (2014) Phenotypical and molecular responses of *Arabidopsis thaliana* roots as a result of inoculation with the auxin-producing bacterium *Azospirillum brasilense*. *New Phytologist* **201**: 850-861.
- Stefanic P, Kraigher B, Lyons NA, Kolter R & Mandic-Mulec I (2015) Kin discrimination between sympatric *Bacillus subtilis* isolates. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **112**: 14042-14047.
- Stefanic P, Belcijan K, Kraigher B, Kostanjšek R, Nesme J, Madsen JS, Kovac J, Sørensen SJ, Vos M & Mandic-Mulec I (2021) Kin discrimination promotes horizontal gene transfer between unrelated strains in *Bacillus subtilis*. *Nature communications* **12**: 1-11.
- Steinke K, Mohite OS, Weber T & Kovács ÁT (2021) Phylogenetic Distribution of Secondary Metabolites in the *Bacillus subtilis* Species Complex. *Msystems* **6**: e00057-00021.
- Stempler O, Baidya AK, Bhattacharya S, Mohan GBM, Tzipilevich E, Sinai L, Mamou G & Ben-Yehuda S (2017) Interspecies nutrient extraction and toxin delivery between bacteria. *Nature communications* **8**: 1-9.
- Stenberg JA, Sundh I, Becher PG, Björkman C, Dubey M, Egan PA, Friberg H, Gil JF, Jensen DF & Jonsson M (2021) When is it biological control? A framework of definitions, mechanisms, and classifications. *Journal of Pest Science* 1-12.
- Stockwell V, Johnson K, Sugar D & Loper J (2011) Mechanistically compatible mixtures of bacterial antagonists improve biological control of fire blight of pear. *Phytopathology* **101**: 113-123.
- Stojanovic G, Dordevic A & Smelcerovic A (2013) Do other *Hypericum* species have medical potential as St. John's wort (*Hypericum perforatum*)? *Current medicinal chemistry* **20**: 2273-2295.
- Stoll A, Salvatierra-Martínez R, González M & Araya M (2021) The Role of Surfactin Production by *Bacillus velezensis* on Colonization, Biofilm Formation on Tomato Root and Leaf Surfaces and Subsequent Protection (ISR) against *Botrytis cinerea*. *Microorganisms* **9**: 2251.
- Stringlis IA, Proietti S, Hickman R, Van Verk MC, Zamioudis C & Pieterse CM (2018a) Root transcriptional dynamics induced by beneficial rhizobacteria and microbial immune elicitors reveal signatures of adaptation to mutualists. *The Plant Journal* **93**: 166-180.
- Stringlis IA, Zhang H, Pieterse CM, Bolton MD & de Jonge R (2018b) Microbial small molecules—weapons of plant subversion. *Natural Product Reports* **35**: 410-433.
- Sudhakar T, Dash S, Rao R, Srinivasan R, Zacharia S, Atmanand M, Subramaniam B & Nayak S (2013) Do endophytic fungi possess pathway genes for plant secondary metabolites. *Curr Sci* **104**: 178.
- Sukumar P, Legue V, Vayssieres A, Martin F, Tuskan GA & Kalluri UC (2013) Involvement of auxin pathways in modulating root architecture during beneficial plant–microorganism interactions. *Plant, cell & environment* **36**: 909-919.

Sun J, Chang M, Li H, Zhang Z, Chen Q, Chen Y, Yao Y, Pan A, Shi C & Wang C (2019) Endophytic bacteria as contributors to theanine production in *Camellia sinensis*. *Journal of agricultural and food chemistry* **67**: 10685-10693.

Sundaramoorthy S, Raguchander T, Ragupathi N & Samiyappan R (2012) Combinatorial effect of endophytic and plant growth promoting rhizobacteria against wilt disease of *Capsicum annum* L. caused by *Fusarium solani*. *Biological Control* **60**: 59-67.

Sur S, Romo TD & Grossfield A (2018) Selectivity and mechanism of fengycin, an antimicrobial lipopeptide, from molecular dynamics. *The Journal of Physical Chemistry B* **122**: 2219-2226.

Syed S & Tollamadugu NP (2019) Role of plant growth-promoting microorganisms as a tool for environmental sustainability. *Recent Developments in Applied Microbiology and Biochemistry*, p. pp. 209-222. Elsevier.

Tahir HA, Gu Q, Wu H, Raza W, Hanif A, Wu L, Colman MV & Gao X (2017) Plant growth promotion by volatile organic compounds produced by *Bacillus subtilis* SYST2. *Frontiers in Microbiology* **8**: 171.

Takishita Y, Charron J-B & Smith DL (2018) Biocontrol rhizobacterium *Pseudomonas* sp. 23S induces systemic resistance in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) against bacterial canker *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Frontiers in microbiology* 2119.

Talhinhas P, Loureiro A & Oliveira H (2018) Olive anthracnose: a yield- and oil quality- degrading disease caused by several species of *Colletotrichum* that differ in virulence, host preference and geographical distribution. *Molecular plant pathology* **19**: 1797-1807.

Tan RX & Zou WX (2001) Endophytes: a rich source of functional metabolites. *Natural product reports* **18**: 448-459.

Tan Y, Cui Y, Li H, Kuang A, Li X, Wei Y & Ji X (2017) Diversity and composition of rhizospheric soil and root endogenous bacteria in *Panax notoginseng* during continuous cropping practices. *Journal of basic microbiology* **57**: 337-344.

Tanaka K, Amaki Y, Ishihara A & Nakajima H (2015) Synergistic effects of [Ile7] surfactin homologues with bacillomycin D in suppression of gray mold disease by *Bacillus amyloliquefaciens* biocontrol strain SD-32. *Journal of agricultural and food chemistry* **63**: 5344-5353.

Tanaka N, Kato M, Tomioka R, Kurata R, Fukao Y, Aoyama T & Maeshima M (2014) Characteristics of a root hair-less line of *Arabidopsis thaliana* under physiological stresses. *Journal of Experimental Botany* **65**: 1497-1512.

Tang Q, Bie X, Lu Z, Lv F, Tao Y & Qu X (2014) Effects of fengycin from *Bacillus subtilis* fmbJ on apoptosis and necrosis in *Rhizopus stolonifer*. *Journal of Microbiology* **52**: 675-680.

Tao Y, Bie X-m, Lv F-x, Zhao H-z & Lu Z-x (2011) Antifungal activity and mechanism of fengycin in the presence and absence of commercial surfactin against *Rhizopus stolonifer*. *The Journal of Microbiology* **49**: 146-150.

Teixeira PJP, Colaianni NR, Fitzpatrick CR & Dangl JL (2019) Beyond pathogens: microbiota interactions with the plant immune system. *Current opinion in microbiology* **49**: 7-17.

Telagam N, Kandasamy N & Arun Kumar M (2021) Review on Smart Farming and Smart Agriculture for Society: Post-pandemic Era. *Green Technological Innovation for Sustainable Smart Societies*, pp. 233-256. Springer.

Théâtre A, Cano-Prieto C, Bartolini M, Laurin Y, Deleu M, Niehren J, Fida T, Gerbinet S, Alanjary M & Medema MH (2021) The surfactin-like lipopeptides from *Bacillus* spp.: natural biodiversity and synthetic biology for a broader application range. *Frontiers in bioengineering and biotechnology* **9**:

Thennarasu S, Lee D-K, Poon A, Kawulka KE, Vederas JC & Ramamoorthy A (2005) Membrane permeabilization, orientation, and antimicrobial mechanism of subtilisin A. *Chemistry and physics of lipids* **137**: 38-51.

Thomas P & Reddy KM (2013) Microscopic elucidation of abundant endophytic bacteria colonizing the cell wall-plasma membrane peri-space in the shoot-tip tissue of banana. *AoB Plants* **5**.

Thomas P & Sekhar AC (2014) Live cell imaging reveals extensive intracellular cytoplasmic colonization of banana by normally non-cultivable endophytic bacteria. *AoB Plants* **6**.

Thomloundi E-E, Tsalgatidou P, Douka D, Spantidos T-N, Dimou M, Venieraki A & Katinakis P (2019) Multistrain versus single-strain plant growth promoting microbial inoculants-The compatibility issue. *Hellenic Plant Protection Journal* **12**: 61-77.

Tian T, Sun B, Shi H, Gao T, He Y, Li Y, Liu Y, Li X, Zhang L & Li S (2021) Sucrose triggers a novel signaling cascade promoting *Bacillus subtilis* rhizosphere colonization. *The ISME Journal* 1-15.

Timmusk S, Behers L, Muthoni J, Muraya A & Aronsson A-C (2017) Perspectives and challenges of microbial application for crop improvement. *Frontiers in plant science* **8**: 49.

Tiwari P & Bae H (2020) Horizontal gene transfer and endophytes: An implication for the acquisition of novel traits. *Plants* **9**: 305.

Tocci N, Perenzoni D, Iamonico D, Fava F, Weil T & Mattivi F (2018) Extracts From *Hypericum hircinum* subsp. *majus* Exert Antifungal Activity Against a Panel of Sensitive and Drug-Resistant Clinical Strains. *Frontiers in pharmacology* **9**: 382.

Toju H, Peay KG, Yamamichi M, Narisawa K, Hiruma K, Naito K, Fukuda S, Ushio M, Nakaoka S & Onoda Y (2018) Core microbiomes for sustainable agroecosystems. *Nature Plants* **4**: 247-257.

Toral L, Rodríguez M, Béjar V & Sampedro I (2018) Antifungal activity of lipopeptides from *Bacillus* XT1 CECT 8661 against *Botrytis cinerea*. *Frontiers in Microbiology* **9**: 1315.

Toral L, Rodríguez M, Béjar V & Sampedro I (2020) Crop protection against *Botrytis cinerea* by rhizosphere biological control agent *Bacillus velezensis* XT1. *Microorganisms* **8**: 992.

Torres M, Llamas I, Torres B, Toral L, Sampedro I & Béjar V (2020) Growth promotion on horticultural crops and antifungal activity of *Bacillus velezensis* XT1. *Applied Soil Ecology* **150**: 103453.

Touré Y, Ongena M, Jacques P, Guiro A & Thonart P (2004) Role of lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* GA1 in the reduction of grey mould disease caused by *Botrytis cinerea* on apple. *Journal of applied microbiology* **96**: 1151-1160.

Townsley L, Yannarell SM, Huynh TN, Woodward JJ & Shank EA (2018) Cyclic di-AMP acts as an extracellular signal that impacts *Bacillus subtilis* biofilm formation and plant attachment. *MBio* **9**: e00341-00318.

Tran PN, Yen M-R, Chiang C-Y, Lin H-C & Chen P-Y (2019) Detecting and prioritizing biosynthetic gene clusters for bioactive compounds in bacteria and fungi. *Applied microbiology and biotechnology* **103**: 3277-3287.

Tripathi A, Awasthi A, Singh S, Sah K, Maji D, Patel VK, Verma RK & Kalra A (2020) Enhancing artemisinin yields through an ecologically functional community of endophytes in *Artemisia annua*. *Industrial Crops and Products* **150**: 112375.

Truyens S, Weyens N, Cuypers A & Vangronsveld J (2015) Bacterial seed endophytes: genera, vertical transmission and interaction with plants. *Environmental Microbiology Reports* **7**: 40-50.

Tsalgatidou PC, Thomloui E-E, Baira E, Papadimitriou K, Skagia A, Venieraki A, Katinakis P (2022) Integrated Genomic and Metabolomic Analysis Illuminates Key Secreted Metabolites Produced by the Novel Endophyte *Bacillus halotolerans* Cal.1.30 Involved in Diverse Biological Control Activities. *Microorganisms* **10** (2):399

Tsolakidou M-D, Stringlis IA, Fanega-Sleziak N, Papageorgiou S, Tsalakou A & Pantelides IS (2019) Rhizosphere-enriched microbes as a pool to design synthetic communities for reproducible beneficial outputs. *FEMS microbiology ecology* **95**: fiz138.

Tsuge K, Inoue S, Ano T, Itaya M & Shoda M (2005) Horizontal transfer of iturin A operon, itu, to *Bacillus subtilis* 168 and conversion into an iturin A producer. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **49**: 4641-4648.

Tucci M, Ruocco M, De Masi L, De Palma M & Lorito M (2011) The beneficial effect of *Trichoderma* spp. on tomato is modulated by the plant genotype. *Molecular Plant Pathology* **12**: 341-354.

Tunsagool P, Jutidamrongphan W, Phaonakrop N, Jaresitthikunchai J, Roytrakul S & Leelasuphakul W (2019a) Insights into stress responses in mandarins triggered by *Bacillus subtilis* cyclic lipopeptides and exogenous plant hormones upon *Penicillium digitatum* infection. *Plant cell reports* **38**: 559-575.

Tunsagool P, Leelasuphakul W, Jaresitthikunchai J, Phaonakrop N, Roytrakul S & Jutidamrongphan W (2019b) Targeted transcriptional and proteomic studies explicate specific roles of *Bacillus subtilis* iturin A, fengycin, and surfactin on elicitation of defensive systems in mandarin fruit during stress. *Plos one* **14**: e0217202.

Turner TR, James EK & Poole PS (2013) The plant microbiome. *Genome biology* **14**: 1-10.

Tyc O, Song C, Dickschat JS, Vos M & Garbeva P (2017) The ecological role of volatile and soluble secondary metabolites produced by soil bacteria. *Trends in microbiology* **25**: 280-292.

Tzec-Interián JA, Desgarenes D, Carrión G, Monribot-Villanueva JL, Guerrero-Analco JA, Ferrera-Rodríguez O, Santos-Rodríguez DL, Liahut-Guin N, Caballero-Reyes GE & Ortiz-Castro R (2020) Characterization of plant growth-promoting bacteria associated with avocado trees (*Persea americana* Miller) and their potential use in the biocontrol of *Scirtothrips perseae* (avocado thrips). *PloS one* **15**: e0231215.

Uhl P & Brühl CA (2019) The impact of pesticides on flower- visiting insects: A review with regard to European risk assessment. *Environmental toxicology and chemistry* **38**: 2355-2370.

Vacheron J, Desbrosses G, Renoud S, Padilla R, Walker V, Muller D & Prigent-Combaret C (2018) Differential contribution of plant-beneficial functions from *Pseudomonas kilonensis* F113 to root system architecture alterations in *Arabidopsis thaliana* and *Zea mays*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **31**: 212-223.

Vacheron J, Desbrosses G, Bouffaud M-L, Touraine B, Moënné-Loccoz Y, Muller D, Legendre L, Wisniewski-Dyé F & Prigent-Combaret C (2013) Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning. *Frontiers in plant science* **4**: 356.

van der Wolf J, Kastelein P, da Silva Júnior TAF, Lelis FV & van der Zouwen P (2019) Colonization of siliques and seeds of rapid cycling *Brassica oleracea* plants by *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* after spray-inoculation of flower clusters. *European Journal of Plant Pathology* **154**: 445-461.

van Heel AJ, Montalban-Lopez M, Oliveau Q & Kuipers OP (2017) Genome-guided identification of novel head-to-tail cyclized antimicrobial peptides, exemplified by the discovery of pumilarin. *Microbial genomics* **3**.

Van Vliet S, Kronberg SL & Provenza FD (2020) Plant-based meats, human health, and climate

change. *Frontiers in Sustainable Food Systems* **4**: 128.

Vandenkoornhuysen P, Quaiser A, Duhamel M, Le Van A & Dufresne A (2015) The importance of the microbiome of the plant holobiont. *New Phytologist* **206**: 1196-1206.

Vanthana M, Nakkeeran S, Malathi V, Renukadevi P, Vinodkumar S, Sivakumar U & Suganthi A (2021) Flagellin and elongation factor of *Bacillus velezensis* (VB7) reprogramme the immune response in tomato towards the management of GBNV infection. *Journal of Virological Methods* **114438**.

Venieraki A, Dimou M & Katinakis P (2017) Endophytic fungi residing in medicinal plants have the ability to produce the same or similar pharmacologically active secondary metabolites as their hosts. *Hellenic Plant Protection Journal* **10**: 51-66.

Venieraki A, Tsalgaidou PC, Georgakopoulos D, Dimou M & Katinakis P (2016) Swarming motility in plant-associated bacteria. *Hell Plant Prot J* **9**: 16-27.

Verbon EAH & Liberman LM (2016) Beneficial microbes affect endogenous mechanisms controlling root development. *Trends in plant science* **21**: 218-229.

Verma SK, Kharwar RN & White JF (2019) The role of seed-vectored endophytes in seedling development and establishment. *Symbiosis* **78**: 107-113.

Verma SK, Kingsley K, Irizarry I, Bergen M, Kharwar R & White Jr J (2017) Seed- vectored endophytic bacteria modulate development of rice seedlings. *Journal of Applied Microbiology* **122**: 1680-1691.

Vieira R, Paula Júnior T, Teixeira H & de S. Carneiro J (2010) White mold management in common bean by increasing within-row distance between plants. *Plant disease* **94**: 361-367.

Villaverde JJ, Sevilla- Morán B, Sandín- España P, López- Goti C & Alonso- Prados JL (2014) Biopesticides in the framework of the European Pesticide Regulation (EC) No. 1107/2009. *Pest management science* **70**: 2-5.

Villegas-Escobar V, Ceballos I, Mira JJ, Argel LE, Orduz Peralta S & Romero-Tabarez M (2013) Fengycin C produced by *Bacillus subtilis* EA-CB0015. *Journal of natural products* **76**: 503-509.

Vlot AC, Sales JH, Lenk M, Bauer K, Brambilla A, Sommer A, Chen Y, Wenig M & Nayem S (2021) Systemic propagation of immunity in plants. *New Phytologist* **229**: 1234-1250.

Vryzas Z (2016) The plant as metaorganism and research on next-generation systemic pesticides—prospects and challenges. *Frontiers in microbiology* **7**: 1968.

Waewthongrak W, Leelasuphakul W & McCollum G (2014) Cyclic lipopeptides from *Bacillus subtilis* ABS-S14 elicit defense-related gene expression in citrus fruit. *PloS one* **9**: e109386.

Waewthongrak W, Pisuchpen S & Leelasuphakul W (2015) Effect of *Bacillus subtilis* and chitosan applications on green mold (*Penicillium digitatum* Sacc.) decay in citrus fruit. *Postharvest Biology and Technology* **99**: 44-49.

Wall D (2016) Kin recognition in bacteria. *Annual review of microbiology* **70**: 143-160.

Walsh CT (2014) Blurring the lines between ribosomal and nonribosomal peptide scaffolds. *ACS chemical biology* **9**: 1653-1661.

Wang B & Bi Y (2021) The role of signal production and transduction in induced resistance of harvested fruits and vegetables. *Food Quality and Safety* **5**.

Wang KL-C, Li H & Ecker JR (2002) Ethylene biosynthesis and signaling networks. *The plant cell* **14**: S131-S151.

Wang Y, Ohara Y, Nakayashiki H, Tosa Y & Mayama S (2005) Microarray analysis of the gene

- expression profile induced by the endophytic plant growth-promoting rhizobacteria, *Pseudomonas fluorescens* FPT9601-T5 in *Arabidopsis*. *Molecular plant-microbe interactions* **18**: 385-396.
- Wang C, Wang C, Gao Y-L, Wang Y-P & Guo J-H (2016) A consortium of three plant growth-promoting rhizobacterium strains acclimates *Lycopersicon esculentum* and confers a better tolerance to chilling stress. *Journal of plant growth regulation* **35**: 54-64.
- Wang F, Xiao J, Zhang Y, Li R, Liu L & Deng J (2021) Biocontrol ability and action mechanism of *Bacillus halotolerans* against *Botrytis cinerea* causing grey mould in postharvest strawberry fruit. *Postharvest Biology and Technology* **174**: 111456.
- Wang Q-Y, Lin Q-L, Peng K, Cao J-Z, Yang C & Xu D (2017) Surfactin variants from *Bacillus subtilis* natto CSUF5 and their antifungal properties against *Aspergillus niger*. *Journal of Biobased Materials and Bioenergy* **11**: 210-215.
- Wang T, Liu X-h, Wu M-B, Ge S (2018) Molecular insights into the antifungal mechanism of bacilysin. *Journal of Molecular Modeling* **24** (5):1-9
- Wang Y, Zhang C, Liang J, Wu L, Gao W & Jiang J (2020a) Iturin A Extracted From *Bacillus subtilis* WL-2 Affects *Phytophthora infestans* via Cell Structure Disruption, Oxidative Stress, and Energy Supply Dysfunction. *Frontiers in microbiology* **11**: 2205.
- Wang Y, Zhang C, Liang J, Wang L, Gao W, Jiang J & Chang R (2020b) Surfactin and fengycin B extracted from *Bacillus pumilus* W-7 provide protection against potato late blight via distinct and synergistic mechanisms. *Applied Microbiology and Biotechnology* **104**: 7467-7481.
- Wang Y, Wang C, Gu Y, Wang P, Song W, Ma J & Yang X (2020c) The variability of bacterial communities in both the endosphere and ectosphere of different niches in Chinese chives (*Allium tuberosum*). *PloS one* **15**: e0227671.
- Wang J, Xing J, Lu J, Sun Y, Zhao J, Miao S, Xiong Q, Zhang Y & Zhang G (2019) Complete genome sequencing of *Bacillus velezensis* WRN014, and comparison with genome sequences of other *Bacillus velezensis* strains.
- Wang D, Xu Z, Zhang G, Xia L, Dong X, Li Q, Liles MR, Shao J, Shen Q & Zhang R (2019) A genomic island in a plant beneficial rhizobacterium encodes novel antimicrobial fatty acids and a self- protection shield to enhance its competition. *Environmental microbiology* **21**: 3455-3471.
- Wei Z, Gu Y, Friman V-P, Kowalchuk GA, Xu Y, Shen Q & Jousset A (2019) Initial soil microbiome composition and functioning predetermine future plant health. *Science advances* **5**: eaaw0759.
- Wei Y, Zhao Y, Shi M, Cao Z, Lu Q, Yang T, Fan Y & Wei Z (2018) Effect of organic acids production and bacterial community on the possible mechanism of phosphorus solubilization during composting with enriched phosphate-solubilizing bacteria inoculation. *Bioresource Technology* **247**: 190-199.
- White JF, Kingsley KL, Verma SK & Kowalski KP (2018) Rhizophagy cycle: an oxidative process in plants for nutrient extraction from symbiotic microbes. *Microorganisms* **6**: 95.
- White JF, Torres MS, Verma SK, Elmore MT, Kowalski KP & Kingsley KL (2019) Evidence for widespread microbivory of endophytic bacteria in roots of vascular plants through oxidative degradation in root cell periplasmic spaces. *PGPR amelioration in sustainable agriculture*, pp. 167-193. Elsevier.
- Wicaksono WA, Jones EE, Casonato S, Monk J & Ridgway HJ (2018) Biological control of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (Psa), the causal agent of bacterial canker of kiwifruit, using endophytic bacteria recovered from a medicinal plant. *Biological control* **116**: 103-112.

- Wielbo J, Kuske J, Marek-Kozaczuk M & Skorupska A (2010) The competition between *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* strains progresses until late stages of symbiosis. *Plant and soil* **337**: 125-135.
- Williamson B, Tudzynski B, Tudzynski P & Van Kan JA (2007) *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. *Molecular plant pathology* **8**: 561-580.
- Wise C, Falardeau J, Hagberg I & Avis TJ (2014) Cellular lipid composition affects sensitivity of plant pathogens to fengycin, an antifungal compound produced by *Bacillus subtilis* strain CU12. *Phytopathology* **104**: 1036-1041.
- Wu S, Liu G, Zhou S, Sha Z & Sun C (2019) Characterization of antifungal lipopeptide biosurfactants produced by marine bacterium *Bacillus* sp. CS30. *Marine drugs* **17**: 199.
- Wu L, Wu H, Chen L, Yu X, Borriss R & Gao X (2015) Difficidin and bacilysin from *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 have antibacterial activity against *Xanthomonas oryzae* rice pathogens. *Scientific reports* **5**: 1-9.
- Wu G, Liu Y, Xu Y, Zhang G, Shen Q & Zhang R (2018) Exploring elicitors of the beneficial rhizobacterium *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 to induce plant systemic resistance and their interactions with plant signaling pathways. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **31**: 560-567.
- Wu W, Chen W, Liu S, Wu J, Zhu Y, Qin L & Zhu B (2021) Beneficial Relationships Between Endophytic Bacteria and Medicinal Plants. *Frontiers in Plant Science* **12**: 758.
- Wu T, Xu J, Liu J, Guo W-H, Li X-B, Xia J-B, Xie W-J, Yao Z-G, Zhang Y-M & Wang R-Q (2019) Characterization and initial application of endophytic *Bacillus safensis* strain ZY16 for improving phytoremediation of oil-contaminated saline soils. *Frontiers in microbiology* **10**: 991.
- Wu X, Wu H, Wang R, Wang Z, Zhang Y, Gu Q, Farzand A, Yang X, Semenov M & Borriss R (2021) Genomic Features and Molecular Function of a Novel Stress-Tolerant *Bacillus halotolerans* Strain Isolated from an Extreme Environment. *Biology* **10**: 1030.
- Wyss C (1989) *Campylobacter-Wolinella* group organisms are the only oral bacteria that form arylsulfatase-active colonies on a synthetic indicator medium. *Infection and immunity* **57**: 1380-1383.
- Xiao J, Guo X, Qiao X, Zhang X, Chen X & Zhang D (2021) Activity of fengycin and iturin A isolated from *Bacillus subtilis* Z-14 on *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* and soil microbial diversity. *Frontiers in microbiology* **12**.
- Xie S-S, Wu H-J, Zang H-Y, Wu L-M, Zhu Q-Q & Gao X-W (2014) Plant growth promotion by spermidine-producing *Bacillus subtilis* OKB105. *Molecular plant-microbe interactions* **27**: 655-663.
- Xie S, Vallet M, Sun C, Kunert M, David A, Zhang X, Chen B, Lu X, Boland W & Shao Y (2020) Biocontrol potential of a novel endophytic bacterium from mulberry (*Morus*) tree. *Frontiers in bioengineering and biotechnology* **7**: 488.
- Xiu P, Liu R, Zhang D & Sun C (2017) Pumilacidin-like lipopeptides derived from marine bacterium *Bacillus* sp. strain 176 suppress the motility of *Vibrio alginolyticus*. *Applied and environmental microbiology* **83**: e00450-00417.
- Xu T, Zhu T & Li S (2016) β -1, 3-1, 4-glucanase gene from *Bacillus velezensis* ZJ20 exerts antifungal effect on plant pathogenic fungi. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **32**: 26.
- Xu X-M, Jeffries P, Pautasso M & Jeger MJ (2011) Combined use of biocontrol agents to manage plant diseases in theory and practice. *Phytopathology* **101**: 1024-1031.
- Xu Z, Shao J, Li B, Yan X, Shen Q & Zhang R (2013) Contribution of bacillomycin D in *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 to antifungal activity and biofilm formation. *Applied and environmental microbiology* **79**: 808-815.

Xu M, Sheng J, Chen L, Men Y, Gan L, Guo S & Shen L (2014) Bacterial community compositions of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) seeds and plant growth promoting activity of ACC deaminase producing *Bacillus subtilis* (HYT-12-1) on tomato seedlings. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **30**: 835-845.

Yakhin OI, Lubyantsev AA, Yakhin IA & Brown PH (2017) Biostimulants in plant science: a global perspective. *Frontiers in plant science* **7**: 2049.

Yamamoto S, Shiraishi S & Suzuki S (2015) Are cyclic lipopeptides produced by *Bacillus amyloliquefaciens* S13-3 responsible for the plant defence response in strawberry against *Colletotrichum gloeosporioides*? *Letters in applied microbiology* **60**: 379-386.

Yáñez-Mendizábal V, Usall J, Viñas I, Casals C, Marín S, Solsona C & Teixidó N (2011) Potential of a new strain of *Bacillus subtilis* CPA-8 to control the major postharvest diseases of fruit. *Biocontrol Science and Technology* **21**: 409-426.

Yáñez-Mendizábal V, Zerriouh H, Viñas I, Torres R, Usall J, de Vicente A, Pérez-García A & Teixidó N (2012) Biological control of peach brown rot (*Monilinia* spp.) by *Bacillus subtilis* CPA-8 is based on production of fengycin-like lipopeptides. *European Journal of Plant Pathology* **132**: 609-619.

Ye W-Q, Sun Y-F, Tang Y-J & Zhou W-W (2021) Biocontrol potential of a broad-spectrum antifungal strain *Bacillus amyloliquefaciens* B4 for postharvest loquat fruit storage. *Postharvest Biology and Technology* **174**: 111439.

Yoon S-H, Ha S-M, Kwon S, Lim J, Kim Y, Seo H & Chun J (2017) Introducing EzBioCloud: a taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* **67**: 1613.

Yu K, Liu Y, Tichelaar R, Savant N, Lagendijk E, van Kuijk SJ, Stringlis IA, van Dijken AJ, Pieterse CM & Bakker PA (2019) Rhizosphere-associated *Pseudomonas* suppress local root immune responses by gluconic acid-mediated lowering of environmental pH. *Current Biology* **29**: 3913-3920. e3914.

Zamioudis C, Mastranesti P, Dhonukshe P, Blilou I & Pieterse CM (2013) Unraveling root developmental programs initiated by beneficial *Pseudomonas* spp. bacteria. *Plant Physiology* **162**: 304-318.

Zamioudis C, Korteland J, Van Pelt JA, van Hamersveld M, Dombrowski N, Bai Y, Hanson J, Van Verk MC, Ling HQ & Schulze-Lefert P (2015) Rhizobacterial volatiles and photosynthesis-related signals coordinate MYB 72 expression in *Arabidopsis* roots during onset of induced systemic resistance and iron-deficiency responses. *The Plant Journal* **84**: 309-322.

Zarei T, Moradi A, Kazemeini SA, Akhgar A & Rahi AA (2020) The role of ACC deaminase producing bacteria in improving sweet corn (*Zea mays* L. var *saccharata*) productivity under limited availability of irrigation water. *Scientific reports* **10**: 1-12.

Zasloff M (2017) Pollen has a microbiome: implications for plant reproduction, insect pollination and human allergies. *Environmental Microbiology* **19**: 1-2.

Zehra A, Raytekar NA, Meena M & Swapnil P (2021) Efficiency of microbial bio-agents as elicitors in plant defense mechanism under biotic stress: A review. *Current Research in Microbial Sciences* **2**: 100054.

Zeng Q, Xie J, Li Y, Chen X, Gu X, Yang P, Hu G & Wang Q (2021) Organization, evolution and function of fengycin biosynthesis gene clusters in the *Bacillus amyloliquefaciens* group. *Phytopathology Research* **3**: 1-12.

Zerriouh H, de Vicente A, Pérez-García A & Romero D (2014) Surfactin triggers biofilm formation

of *Bacillus subtilis* in melon phylloplane and contributes to the biocontrol activity. *Environmental microbiology* **16**: 2196-2211.

Zerriouh H, Romero D, García-Gutiérrez L, Cazorla FM, de Vicente A & Pérez-García A (2011) The iturin-like lipopeptides are essential components in the biological control arsenal of *Bacillus subtilis* against bacterial diseases of cucurbits. *Molecular plant-microbe interactions* **24**: 1540-1552.

Zhang L & Sun C (2018) Fengycins, cyclic lipopeptides from marine *Bacillus subtilis* strains, kill the plant-pathogenic fungus *Magnaporthe grisea* by inducing reactive oxygen species production and chromatin condensation. *Applied and environmental microbiology* **84**: e00445-00418.

Zhang W, Dick W & Hoitink H (1996) Compost-induced systemic acquired resistance in cucumber to *Pythium* root rot and anthracnose. *Phytopathology* **86**: 1066-1070.

Zhang C, Tian X & Zhang C-S (2019) Diversity and probiotic activities of endophytic bacteria associated with the coastal halophyte *Messerschmidia sibirica*. *Applied soil ecology* **143**: 35-44.

Zhang B, Dong C, Shang Q, Han Y & Li P (2013) New insights into membrane-active action in plasma membrane of fungal hyphae by the lipopeptide antibiotic bacillomycin L. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* **1828**: 2230-2237.

Zhang D, Gao T, Li H, Lei B & Zhu B (2017) Identification of antifungal substances secreted by *Bacillus subtilis* Z-14 that suppress *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. *Biocontrol Science and Technology* **27**: 237-251.

Zhang R, Ji Y, Zhang X, Kennelly EJ & Long C (2020) Ethnopharmacology of *Hypericum* species in China: A comprehensive review on ethnobotany, phytochemistry and pharmacology. *Journal of ethnopharmacology* **254**: 112686.

Zhang X, Huang Y, Harvey PR, Ren Y, Zhang G, Zhou H & Yang H (2012) Enhancing plant disease suppression by *Burkholderia vietnamiensis* through chromosomal integration of *Bacillus subtilis* chitinase gene chi113. *Biotechnology letters* **34**: 287-293.

Zhang H, Yohe T, Huang L, Entwistle S, Wu P, Yang Z, Busk PK, Xu Y & Yin Y (2018) dbCAN2: a meta server for automated carbohydrate-active enzyme annotation. *Nucleic acids research* **46**: W95-W101.

Zhao Y (2018) Essential roles of local auxin biosynthesis in plant development and in adaptation to environmental changes. *Annual Review of Plant Biology* **69**: 417-435.

Zhao X, Zhou Z-j, Han Y, Wang Z-z, Fan J & Xiao H-z (2013) Isolation and identification of antifungal peptides from *Bacillus* BH072, a novel bacterium isolated from honey. *Microbiological research* **168**: 598-606.

Zhao H, Yan L, Xu X, Jiang C, Shi J, Zhang Y, Liu L, Lei S, Shao D & Huang Q (2018) Potential of *Bacillus subtilis* lipopeptides in anti-cancer I: induction of apoptosis and paraptosis and inhibition of autophagy in K562 cells. *AMB Express* **8**: 1-16.

Zhou L, Song C, Muñoz CY & Kuipers OP (2021) *Bacillus cabrialesii* BH5 Protects Tomato Plants Against *Botrytis cinerea* by Production of Specific Antifungal Compounds. *Frontiers in microbiology* **2230**.

Zhou S, Liu G, Zheng R, Sun C & Wu S (2020) Structural and functional insights into iturin W, a novel lipopeptide produced by the deep-sea bacterium *Bacillus* sp. strain wsm-1. *Applied and environmental microbiology* **86**: e01597-01520.

Zhou F, Emonet A, Tendon VD, Marhavy P, Wu D, Lahaye T & Geldner N (2020) Co-occurrence of damage and microbial patterns controls localized immune responses in roots. *Cell* **180**: 440-453. e418.

Zihalirwa Kulimushi P, Argüelles Arias A, Franzil L, Steels S & Ongena M (2017) Stimulation of

fengycin-type antifungal lipopeptides in *Bacillus amyloliquefaciens* in the presence of the maize fungal pathogen *Rhizomucor variabilis*. *Frontiers in microbiology* **8**: 850.

Zimina M, Babich O, Prosekov A, Sukhikh S, Ivanova S, Shevchenko M & Noskova S (2020) Overview of global trends in classification, methods of preparation and application of bacteriocins. *Antibiotics* **9**: 553.

Zweerink MM & Edison A (1987) Difficidin and oxydifficidin: novel broad spectrum antibacterial antibiotics produced by *Bacillus subtilis*. *The Journal of antibiotics* **40**: 1692-1697.

Δάβαρη Αγγελική (2019), Απομόνωση και χαρακτηρισμός ενδοφυτικών μικροοργανισμών από το *Hypericum hircinum* (Μεταπτυχιακή Εργασία), Διαθέσιμο από: Ψηφιακό Αποθετήριο Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Θωμλούδη Ειρήνη-Ευαγγελία (2018), Απομόνωση και χαρακτηρισμός ενδοφυτικών μικροοργανισμών από το *Teucrium polium* (Μεταπτυχιακή Εργασία), Διαθέσιμο από: Ψηφιακό Αποθετήριο Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Τζάμος ΕΚ (2007) *Φυτοπαθολογία*. Σταμούλης.