



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

Διδακτορική Διατριβή

Μελέτη ενδοφυτικών βακτηρίων από την *Calendula officinalis* και
ρίζοσφαιρικών βακτηρίων από το *Phaseolus vulgaris* που προάγουν
την ανάπτυξη των φυτών

Πωλίνα Χ. Τσαλγατίδου

Επιβλέπων καθηγητής:
Παναγιώτης Κατινάκης

Τριμελής συμβουλευτική επιτροπή:
Παναγιώτης Κατινάκης, Ομότιμος Καθηγητής ΓΠΑ
Δημήτριος Γεωργακόπουλος, Αναπληρωτής Καθηγητής ΓΠΑ
Δημήτριος Τσιτσιγιάννης, Αναπληρωτής Καθηγητής ΓΠΑ

ΑΘΗΝΑ

2021

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

Διδακτορική Διατριβή

Μελέτη ενδοφυτικών βακτηρίων από την *Calendula officinalis* και
ριζοσφαιρικών βακτηρίων από το *Phaseolus vulgaris* που προάγουν
την ανάπτυξη των φυτών

Study of endophytic bacteria from *Calendula officinalis* and rhizospheric
bacteria from *Phaseolus vulgaris* that promote plant growth

Πωλίνα Χ. Τσαλγατίδου

Επταμελής εξεταστική επιτροπή:

Παναγιώτης Κατινάκης, Ομότιμος Καθηγητής ΓΠΑ (Επιβλέπων)

Δημήτριος Γεωργακόπουλος, Αναπληρωτής Καθηγητής ΓΠΑ

Δημήτριος Τσιτσιγιάννης, Αναπληρωτής Καθηγητής ΓΠΑ

Επαμεινώνδας Παπλωματάς, Καθηγητής ΓΠΑ

Γεώργιος Ζερβάκης, Καθηγητής ΓΠΑ

Ιορδάνης Χατζηπαυλίδης, Αναπληρωτής Καθηγητής ΓΠΑ

Κωνσταντίνος Δελής, Επίκουρος Καθηγητής Πανεπιστημίου Πελοποννήσου

Μελέτη ενδοφυτικών βακτηρίων από την *Calendula officinalis* και ριζοσφαιρικών βακτηρίων από το *Phaseolus vulgaris* που προάγουν την ανάπτυξη των φυτών

Τμήμα Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής
Εργαστήριο Γενικής και Γεωργικής Μικροβιολογίας

Περίληψη

Η εκτεταμένη χρήση στην εντατική γεωργία χημικών φυτοπροστατευτικών προϊόντων, φυτοφαρμάκων όσο και λιπασμάτων έχει ως αποτέλεσμα δυσμενείς επιπτώσεις στο περιβάλλον και τους ζωντανούς οργανισμούς, που οδήγησαν στην ανάγκη εύρεσης νέων, εναλλακτικών και ασφαλέστερων εφαρμογών που στόχο έχουν μια φιλική προς το περιβάλλον και εξίσου αποτελεσματική αειφόρο γεωργία. Η εφαρμογή ωφέλιμων ριζοσφαιρικών ή ενδοφυτικών βακτηρίων μπορεί να αποτελέσει μια ανταγωνιστική και ασφαλή πρακτική διαχείρισης των καλλιεργειών, καθώς ενισχύουν την ανάπτυξη και την αντοχή των φυτών σε βιοτικές και αβιοτικές καταπονήσεις. Στην παρούσα μελέτη απομονώθηκαν και μελετήθηκαν 119 ενδοφυτικά βακτηριακά στελέχη από φύλλα, ρίζα και άνθη του φαρμακευτικού φυτού *Calendula officinalis*, καθώς και το βακτηριακό στέλεχος *P. carnis* X απομονωμένο από τη ριζόσφαιρα του *Phaseolus vulgaris*. Η μορφολογική και φυλογενετική ανάλυση σε 37 αντιπροσωπευτικά ενδοφυτικά στελέχη απέδειξε ότι ανήκουν στα γένη *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Agrobacterium*, *Stenotrophomonas* και *Pantoea*. Τα επιλεγμένα ενδοφυτικά βακτήρια του φαρμακευτικού φυτού *C. officinalis* μελετήθηκαν εκτενέστερα ως προς το πλήθος των άμεσων και έμμεσων μηχανισμών δράσης τους, καθώς και για την ικανότητα επιβίωσής τους σε ακραίες συνθήκες ανάπτυξης. Η *in vitro* εφαρμογή αντιπροσωπευτικών στελεχών σε φυτά *Arabidopsis thaliana* Col-0 και ο εμβολιασμός τους με βιο- κάλυψη σε σπόρους *Solanum lycopersicum* var. Chondrokatsari Messinias, επηρέασε σημαντικά την ανάπτυξη και τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των φυτών, με τη σύνθεση και παραγωγή φυτοορμονών, την παραγωγή βακτηριακών πτητικών ενώσεων (BVCs), τον καλό αποικισμό των βακτηρίων και την αφομοίωση των απαραίτητων θρεπτικών στοιχείων, να αποτελούν πιθανούς μηχανισμούς δράσης. Επιπλέον, μελετήθηκε η ανταγωνιστικότητα των μελετώμενων βακτηρίων εναντίον των φυτοπαθογόνων μυκήτων *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* και *Botrytis cinerea* *in vitro*, με τα είδη *B. velezensis*, *B. subtilis* και *B. halotolerans* να ξεχωρίζουν συγκριτικά με τα υπόλοιπα είδη βακτηρίων. Η αποτελεσματική παρεμπόδιση των φυτοπαθογόνων μυκήτων συνδυάστηκε με την άμεση επίδραση των παραγόμενων και διαχεόμενων αντιμικροβιακών ενώσεων των βακτηριακών

στελεχών στο μέσο ανάπτυξης, όπως επιβεβαιώθηκε και μικροσκοπικά εναντίον του φυτοπαθογόνου μύκητα *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*. Τα ενδοφυτικά βακτήρια *B. halotolerans* Cal.l.30, *B. velezensis* Cal.r.29 και *B. halotolerans* Cal.f.4, καθώς και το ριζοσφαιρικό βακτήριο *P. carnis* X που ξεχώρισαν για την *in vitro* ανταγωνιστικότητά τους, παρεμπόδισαν σημαντικά τους φυτοπαθογόνους μύκητες *B. cinerea* και *Colletotrichum acutatum* σε μετασυλλεκτικές εφαρμογές *in vivo*, σε καρπούς τομάτας και σταφυλιού, αλλά και ελιάς αντίστοιχα. Συγκεκριμένα, τα επιλεγμένα ανταγωνιστικά στελέχη μείωσαν εξίσου σημαντικά το δείκτη σοβαρότητας της ασθένειας (DSI %) σε καρπούς τομάτας με ποσοστό μεταξύ 11-18% και σε καρπούς ελιάς με ποσοστό μεταξύ 24-27%, ενώ στους καρπούς σταφυλιού ξεχώρισε η εφαρμογή του βακτηρίου Cal.r.29 με ποσοστό 13%. Η μεταβολομική ανάλυση με UHPLC-ESI HRMS των στελεχών Cal.l.30 και Cal.r.29 σε συνδυασμό με την *in silico* ανάλυση των γονιδιωμάτων των στελεχών Cal.l.30, Cal.f.4 και X, ανέδειξαν ένα πλήθος ισχυρών αντιμικροβιακών ενώσεων και δευτερογενών μεταβολιτών που εμπλέκονται στον ανταγωνισμό των βακτηρίων. Συγκεκριμένα, τα βακτήρια του γένους *Bacillus* ξεχώρισαν για την παραγωγή των ισχυρών κυκλικών λιποπεπτιδίων των οικογενειών surfactin, fengycin και iturin, της πρόδρομης ένωσης του αντιβιοτικού διπεπτιδίου bacilysin (L-dihydroanticapsin), το πολυκετίδιο bacillaene, την αντιβακτηριακή ένωση oxydifficidin, τη σιδηροφόρα ένωση bacillibactin και τη δραστική ουσία azelaic acid. Αντίστοιχα η *in silico* ανάλυση του γονιδιώματος του βακτηρίου *P. carnis* X ανέδειξε τις συστάδες γονιδίων για τη βιοσύνθεση του κυκλικού λιποπεπτιδίου viscosinamide, της σιδηροφόρου ένωσης pyoverdinin και επιβεβαίωσε την ύπαρξη του εκκριτικού συστήματος τύπου VI (T6SS). Οι ενώσεις αυτές, εκτός από την άμεση ανταγωνιστική τους δράση, λειτουργούν παράλληλα ως διεγέρτες της επαγόμενης διασυστηματικής ανοχής (ISR), για την ενεργοποίηση των αμυντικών μηχανισμών των φυτών, είτε στον ιστό επαφής, είτε διασυστηματικά. Έτσι, μελετήθηκε επιπλέον η επίδραση των βακτηριακών στελεχών Cal.l.30, Cal.r.29, Cal.f.4 και X σε συνθήκες θερμοκηπίου στην ανάπτυξη και την ενεργοποίηση της επαγόμενης διασυστηματικής ανοχής (ISR) καθώς τελικά και την προστασία των φυτών τομάτας από το φυτοπαθογόνο μύκητα *B. cinerea*, μετά από την εφαρμογή των βακτηρίων είτε ως μεμονωμένα στελέχη είτε ως ζεύγη σε μίγματα. Συγκεκριμένα, μετά από την εφαρμογή των βακτηρίων παρατηρήθηκε σημαντική μείωση του δείκτη σοβαρότητας της ασθένειας (DSI %) με ποσοστό μεταξύ 20- 27%, σε σύγκριση με τα φυτά του μάρτυρα με ποσοστό 78%. Η εφαρμογή των βακτηρίων στις ρίζες των φυτών τομάτας ενεργοποίησε τα μονοπάτια του σαλικυλικού οξέος και του γιασμονικού οξέος/ αιθυλενίου. Συγκεκριμένα αυξήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *PR1*, *PR2*, *PR3* που εμπλέκονται στο μονοπάτι του

σαλικυλικού οξέος και των *ERF1*, *ACO1* και *TomLoxA* που εμπλέκονται στο μονοπάτι του γιασμονικού οξέος/ αιθυλενίου. Ακολούθως μελετήθηκε η δράση των στελεχών αυτών ως μίγματα και η πιθανή συμβατότητά τους. Ο συνδυασμός των κατάλληλων στελεχών μεταξύ τους μπορεί να δημιουργήσει ισχυρά μίγματα βακτηρίων, με αποτέλεσμα να ενισχύσουν αθροιστικά την αποτελεσματικότητά τους στην ανάπτυξη και προστασία των φυτών, σε σύγκριση με τα μεμονωμένα στελέχη. Στην παρούσα μελέτη τα μίγματα βακτηρίων που εμφάνισαν τη βέλτιστη συμβατότητα *in vitro*, παρουσίασαν παράλληλα και καλύτερα αποτελέσματα στις *in vivo* και *in planta* εφαρμογές. Έτσι, τα μίγματα βακτηρίων Cal.l.30-Cal.f.4 και Cal.r.29- X, διακρίθηκαν για τη συνδυαστική τους δράση και τη βελτίωση τόσο των μορφολογικών και αναπτυξιακών χαρακτηριστικών των φυτών τομάτας, όσο και για την προστασία τους από το φυτοπαθογόνο μύκητα *B. cinerea* λόγω της ενεργοποίησης του μηχανισμού ISR. Επομένως, η ολοκληρωμένη μελέτη των ενδοφυτικών βακτηρίων του φαρμακευτικού φυτού *C. officinalis* και του ριζοσφαιρικού βακτηρίου *P. carnis* X από το φυτό *P. vulgaris* ανέδειξε σημαντικό αριθμό ανταγωνιστικών BCAs και PGP στελεχών, τα οποία μετά από κατάλληλο συνδυασμό μεταξύ τους μπορούν να αποτελέσουν ισχυρά και αποτελεσματικά μίγματα βακτηρίων.

Επιστημονική περιοχή: Γεωργική Μικροβιολογία

Λέξεις κλειδιά: Ενδοφυτικά βακτήρια, ριζοσφαιρικά βακτήρια, *Calendula officinalis*, *Phaseolus vulgaris*, μίγματα βακτηρίων, παράγοντες βιολογικού ελέγχου (BCAs), φυτοπροστασία, βακτηριακοί βιοδιεγέρτες φυτών, επαγόμενη διασυστηματική αντοχή (ISR), γονιδιωματική ανάλυση, δευτερογενείς μεταβολίτες

Study of endophytic bacteria from *Calendula officinalis* and rhizospheric bacteria from *Phaseolus vulgaris* that promote plant growth

Faculty of Crop Science

Laboratory of General and Agricultural Microbiology

Abstract

The adverse effects of the overuse of chemical plant protection and fertilization products on the environment and living organisms have led to the research and application of new, alternative and environmentally-friendly products aiming towards sustainable agriculture. Application of beneficial rhizospheric or endophytic bacteria is a safe agricultural practice, as they enhance plant growth and resistance to biotic and abiotic stresses. In the current study, 119 culturable endophytic bacteria in leaves, root and flowers of the medicinal plant *Calendula officinalis* were isolated and studied along with *Pseudomonas carnis* X strain isolated from *Phaseolus vulgaris* rhizosphere. The morphological and phylogenetic analysis of 37 representative endophytic strains revealed that they belong to *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Agrobacterium*, *Stenotrophomonas* and *Pantoea* genera. Selected endophytic strains were studied further regarding their direct and indirect modes of action as well as their survival ability during extreme growth conditions. The *in vitro* application of representative strains to *Arabidopsis thaliana* Col-0 plantlets and the biopriming application on *Solanum lycopersicum* var. Chondrokatsari Messinias seeds, strongly affected plant growth and morphological characteristics, possibly due to the production of phytohormones and bacterial volatile compounds (BVCs), efficient colonization and increase of nutrient bioavailability. Furthermore, the *in vitro* antagonistic ability against phytopathogenic fungi was studied, namely *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* και *Botrytis cinerea* *in vitro*, with strains belonging to *B. velezensis*, *B. subtilis* και *B. halotolerans* being the most effective. The antagonistic activity was attributed to the production of diffusible antifungal compounds, an effect observed also during microscopic observation against *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*. Endophytic strains *B. halotolerans* Cal.l.30, *B. velezensis* Cal.r.29 and *B. halotolerans* Cal.f.4 as well as rhizospheric strain *P. carnis* X that stood out in tests *in vitro*, were also effective against *B. cinerea* in detached tomato and grape fruit but also against *Colletotrichum acutatum* in detached olive fruit. Specifically, the selected competing strains equally reduced the disease severity index (DSI %) in tomato fruits with a percentage between 11-18% and in olive fruits with a percentage between 24-27%, while in

grape berries the bacterial strain Cal.r.29 presented the best results with a percentage of 13%. Metabolomic analysis by UHPLC-ESI HRMS of strains Cal.l.30 and Cal.r.29 combined with *in silico* genomic analysis of Cal.l.30, Cal.f.4 and X, highlighted a plethora of strong antimicrobial and other secondary metabolites involved in bacterial antagonistic ability. Specifically, *Bacillus* strains produced cyclic lipopeptides of surfactin, fengycin and iturin families, the precursor of antibiotic dipeptide bacilysin (L-dihydroanticiapsin), the polyketide bacillaene, the antibacterial compound oxydifficidin, the siderophore compound bacillibactin and drastic compound azelaic acid. *In silico* analysis of *P. carnis* X genome revealed biosynthetic gene clusters (BGCs) involved in the biosynthesis of cyclic lipopeptide viscosinamide, siderophore compound pyoverdine and confirmed existence of type VI secretion system (T6SS). These compounds, besides the direct antagonistic activity, also act as ISR elicitors and activate plant defense mechanisms either on the contact point or systemically. So, the effect of bacterial strains Cal.l.30, Cal.r.29, Cal.f.4 and X was further studied on the growth, ISR activation and protection of tomato plants under greenhouse conditions by applying them as individual inoculants or two-strain mixtures. Specifically, after bacterial formulation, a significant reduction of the disease severity index (DSI %) was observed with a percentage between 20-27%, compared to the control plants with a percentage of 78%. Bacterial application on plant roots activated salicylic acid and jasmonic acid/ethylene pathways. Specifically, this study focused on the induction of gene expression of *PR1*, *PR2*, *PR3*, involved in salicylic acid pathway as well as *ERF1*, *ACO1* και *TomLoxA* that are involved in jasmonic acid/ethylene pathway. Combination of the right strains can result in powerful bacterial mixtures that are able to act additively and synergistically towards enhancement of plant growth and protection, compared with individual strains. In this study, bacterial mixtures that achieved better compatibility in the *in vitro* assays, achieved better results in the *in vivo* and *in planta* application. So, the bacterial mixtures Cal.l.30- Cal.f.4 and Cal.r.29- X, performed better in terms of morphological and growth characteristics of tomato plants, as well as in terms of plant protection from phytopathogenic fungus *B.cinerea* by ISR activation. Concluding, the study of endophytic bacteria from the medicinal plant *Calendula officinalis* and *P. carnis* X from *Phaseolus vulgaris* discovered a number of BCAs and PGP strains, and underlined that appropriate pairwise combinations of them can be a more powerful and effective solution than individual inoculation.

Scientific area: Agricultural Microbiology

Keywords: Endophytic bacteria, rhizospheric bacteria, *Calendula officinalis*, *Phaseolus vulgaris*, bacterial mixtures, biological control agents (BCAs), plant protection, bacterial plant biostimulants, induced systemic resistance (ISR), genomic analysis, secondary metabolites

Ευχαριστίες

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστώ τον επιβλέποντα καθηγητή μου, τον Ομότιμο Καθηγητή κ. Παναγιώτη Κατινάκη ο οποίος αποτέλεσε για μένα ένα εξαιρετικό πρότυπο επιστήμονα και καθηγητή. Μέσα από τις γνώσεις του και τις πολύωρες συζητήσεις μας, με βοήθησε να διευρύνω την επιστημονική μου αντίληψη και να αποκτήσω μια σπουδαία ερευνητική εμπειρία. Τον ευχαριστώ για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, τη στήριξη και καθοδήγησή του καθώς και τις πολύτιμες συμβουλές του που με συνόδευαν καθ' όλη τη διάρκεια της πολυετούς συνεργασίας μας.

Στη συνέχεια θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Δημήτριο Γεωργακόπουλο για τη συμμετοχή του στην τριμελή συμβουλευτική επιτροπή, καθώς και για τους εποικοδομητικούς διαλόγους και τις πολύτιμες συμβουλές του.

Θερμές ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω στον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Δημήτριο Τσιτσιγιάννη για τη συμμετοχή του στην τριμελή συμβουλευτική επιτροπή, τη συνεργασία μας καθώς και τις πολύτιμες συμβουλές του.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή κ. Επαμεινώνδα Παπλωματά για τις εποικοδομητικές του παρατηρήσεις και επισημάνσεις κατά τη διόρθωση της παρούσας διδακτορικής μελέτης.

Στη συνέχεια θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή κ. Γεώργιο Ζερβάκη, του οποίου οι υποδείξεις και παρατηρήσεις καθόρισαν τη βελτίωση της διδακτορικής διατριβής.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Ιορδάνη Χατζηπανλίδη για το σύνολο των παρατηρήσεών του κατά τη διόρθωση της παρούσας μελέτης.

Ευχαριστώ θερμά τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Κωνσταντίνο Δελή για την άριστη συνεργασία μας και το ευχάριστο κλίμα καθ' όλη τη διάρκεια της παραμονής μου στο εργαστήριο Γεωργικής Γενετικής και Βιοτεχνολογίας στο Πανεπιστήμιο της Καλαμάτας, καθώς και την πολύτιμη βοήθειά του κατά την εκτέλεση των πειραμάτων, που συνέβαλαν στην εκμάθηση σημαντικών μοριακών τεχνικών και τελικά στην άρτια ολοκλήρωση της διδακτορικής μου μελέτης.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την κα Αναστασία Βενιεράκη για το ενδιαφέρον, την υποστήριξη και την ενθάρρυνση της, καθώς και για τη βοήθειά της σε επιστημονικό και ανθρώπινο επίπεδο, καθ' όλη τη διάρκεια της συνεργασίας μας.

Ευχαριστώ επίσης την Επίκουρη Καθηγήτρια κα Μαρία Δήμου για την αρμονική συνύπαρξη και τη συνεργασία μας καθ' όλο το χρονικό διάστημα της παραμονής μου στο εργαστήριο.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στον Καθηγητή κ. Δημήτριο Μπουράνη για την παροχή πρόσβασης σε σημαντικό εργαστηριακό εξοπλισμό, στον κ. Δημοσθένη Νικολόπουλο για την προθυμία του και την πολύτιμη βοήθεια του στο χειρισμό των εργαστηριακών οργάνων, καθώς και στον Καθηγητή κ. Κωνσταντίνο Φασσέα για την πολύτιμη βοήθειά του στο χειρισμό του οπτικού μικροσκοπίου.

Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Πρύτανη Καθηγητή κ. Σπυρίδωνα Κίντζιο και τον Καθηγητή κ. Πολυδεύκη Χατζόπουλο για την παροχή πρόσβασης σε θαλάμους ανάπτυξης φυτών και τη χρήση εργαστηριακού εξοπλισμού που βοήθησαν σημαντικά στην πραγματοποίηση σημαντικού τμήματος της διδακτορικής μου μελέτης.

Στη συνέχεια, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κα Καθηγήτρια Γαρυφαλιά Οικονόμου για τη συλλογή και ταυτοποίηση του φαρμακευτικού φυτού που μελετήθηκε στη διδακτορική διατριβή.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κα Αιμιλία Μαρκέλλου και ιδιαίτερα την κα Ειρήνη Μπαϊρά για τη συνεργασία μας και τη σημαντική βοήθειά τους στην ανάλυση σημαντικών δεδομένων, που βελτίωσαν ποιοτικά τη διδακτορική μου διατριβή.

Δε θα μπορούσα να παραλείψω να ευχαριστήσω τον κ. Καλλίμαχο Νηφάκο για την ανιδιοτελή και απλόχερη βοήθεια του στην εκτέλεση σημαντικών πειραμάτων της διδακτορικής μου διατριβής, καθώς και για το σύνολο των εποικοδομητικών συζητήσεων που πραγματοποιήθηκαν και του ευχάριστου κλίματος που επικράτησε καθ' όλη τη διάρκεια της συνεργασίας μας.

Ένα ιδιαίτερο ευχαριστώ και την αμέριστη ευγνωμοσύνη οφείλω στη συνεργάτιδά μου, φίλη και συνοδοιπόρο Ειρήνη - Ευαγγελία Θωμλούδη, που με τις πολύωρες συζητήσεις μας σε ανθρώπινο, φιλικό και επιστημονικό επίπεδο, τη βοήθεια, τη στήριξη και την εμψυχωσή της κατάφερα να φέρω εις πέρας αυτό το μακροχρόνιο και συνάμα δύσκολο ταξίδι. Ένα εγκάρδιο ευχαριστώ οφείλω και στα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου Κατερίνα Κωλέττη, Μαριέλα Ζωγραφάκη, Δήμητρα Δούκα, Τάσο Σπαντίδο, Αγγελική Σκαγιά, Δημήτρη Σκληρό και Φώτη Κωμαίτη για την αρμονική μας συνύπαρξη στο χώρο του εργαστηρίου, την ηθική τους υποστήριξη, τις συζητήσεις μας και το ευχάριστο και φιλικό κλίμα που επικράτησε όλα τα χρόνια της παραμονής μου στο εργαστήριο.

Τέλος, τις ολόψυχες ευχαριστίες μου αξίζουν οι κοντινοί μου άνθρωποι, που από την αρχή μέχρι και το τέλος, με στήριξαν σε αυτή μου την προσπάθεια ανιδιοτελώς. Συγκεκριμένα θα

ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου και τους φίλους μου, για την κατανόηση και την υπομονή που έδειξαν όλο το διάστημα αυτής μου της προσπάθειας.

Υποτροφίες

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 – 2^{ος} Κύκλος» (MIS-5000432), που υλοποιεί το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών (ΙΚΥ).



Επιχειρησιακό Πρόγραμμα
Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού,
Εκπαίδευση και Διά Βίου Μάθηση
Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	- 3 -
ABSTRACT.....	- 6 -
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	- 23 -
1.1 ΦΥΤΙΚΟ ΜΙΚΡΟΒΙΩΜΑ.....	- 23 -
1.1.1 Ριζοσφαιρικά βακτήρια.....	- 23 -
1.1.2 Ενδοφυτικά βακτήρια	- 24 -
1.2 ΑΠΟΙΚΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ- ΚΙΝΗΤΙΚΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΒΙΟΪΜΕΝΙΟΥ	- 26 -
1.3 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΠΟΥ ΠΡΟΑΓΟΥΝ ΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ (PGP)	- 28 -
1.3.1 Απορρόφηση θρεπτικών στοιχείων.....	- 29 -
1.3.2 Σταθεροποίηση του αζώτου (N ₂)	- 29 -
1.3.3 Διαλυτοποίηση του φωσφόρου (P)	- 30 -
1.3.4 Απορρόφηση του σιδήρου (Fe).....	- 31 -
1.3.5 Ρύθμιση επιπέδων φυτοορμονών	- 32 -
1.3.5.1 Ινδολ-3-οξικό οξύ (IAA).....	- 32 -
1.3.5.2 Αιθυλένιο.....	- 34 -
1.3.5.3 Γιββερελλίνη (GA) και κυτοκίνη (CA).....	- 35 -
1.3.6 Παραγωγή βακτηριακών πτητικών ενώσεων (BVCs)	- 36 -
1.4 ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ.....	- 38 -
1.4.1 Λυτικά ένζυμα.....	- 39 -
1.4.2 Αντιβιοτικές ενώσεις.....	- 40 -
1.4.2.1 Μη ριβοσωμικά πεπτίδια (NRPs) και λιποπεπτίδια (LPs)	- 42 -
1.4.2.1.1 Αντιμικροβιακή δράση των LPs	- 44 -
1.4.2.1.2 Μη ριβοσωμικές πεπτιδικές συνθετάσες (NRPS).....	- 47 -
1.4.3 ISR	- 52 -
1.4.4 Ανταγωνισμός για θρεπτικά στοιχεία και χώρο	- 55 -
1.5 <i>CALENDULA OFFICINALIS</i>	- 57 -
1.6 ΣΚΟΠΟΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ	- 58 -
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	- 60 -
2.1 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΕΝΔΟΦΥΤΙΚΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ	- 60 -
2.1.1 Συλλογή φυτικών δειγμάτων για την απομόνωση ενδοφυτικών βακτηρίων	- 60 -
2.1.2 Διαδικασία απομόνωσης ενδοφυτικών βακτηρίων	- 60 -
2.1.3 Μορφολογική κατηγοριοποίηση βακτηρίων.....	- 61 -
2.1.4 Μοριακή ταυτοποίηση ενδοφυτικών βακτηρίων με το 16S rRNA γονίδιο αναφοράς- Εντοπισμός γονιδίων που κωδικοποιούν για τα αντιβιοτικά iturin, fengycin και surfactin	- 61 -

2.1.4.1	Απομόνωση γενωμικού DNA.....	- 61 -
2.1.4.2	Προετοιμασία Διαλυμάτων	- 61 -
2.1.4.3	Διαδικασία απομόνωσης ολικού DNA.....	- 62 -
2.1.4.4	Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction- PCR)-	63
-		
2.1.4.5	Ανάλυση δεοξυριβονουκλεϊκών οξέων σε πήκτωμα αгарόζης	- 64 -
2.1.4.6	Ποσοτικός προσδιορισμός του DNA με φασματοσκοπική ανάλυση.....	- 64 -
2.1.4.7	Αλληλούχιση νουκλεοτιδικών ακολουθιών (sequencing).....	- 64 -
2.1.4.8	Φυλογενετική κατάταξη βακτηρίων.....	- 64 -
2.2	ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ	- 65 -
2.2.1	Μέθοδος της ταυτόχρονης διπλής ομαδικής κίνησης βακτηρίων (swarm boundary assay).....	- 65 -
2.3	ΆΜΕΣΟΙ ΚΑΙ ΕΜΜΕΣΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΠΟΥ ΠΡΟΑΓΟΥΝ ΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ (PGP- TRAITS) <i>IN VITRO</i>	- 65 -
2.3.1	Παραγωγή σιδηροφόρων με τη μέθοδο Chrome Azurol S (CAS) Agar	- 65 -
2.3.2	Διαλυτοποίηση του φωσφόρου με τη μέθοδο Pikovskaya's Agar (PVK)	- 66 -
2.3.3	Παραγωγή ινδολοξικού οξέος (IAA)	- 67 -
2.3.4	Παραγωγή αμμωνίας.....	- 67 -
2.3.5	Παραγωγή ακετοΐνης	- 68 -
2.3.6	Παραγωγή κυτταρινολυτικών ενζύμων.....	- 68 -
2.3.6.1	Χρώση των τρυβλίων με τη χρωστική Congo Red	- 69 -
2.3.7	Παραγωγή πρωτεολυτικών ενζύμων.....	- 69 -
2.3.8	Παραγωγή χιτινολυτικών ενζύμων	- 69 -
2.3.8.1	Παραγωγή κολλοειδών χιτίνης (Colloidal Chitin Preparation)	- 69 -
2.3.8.2	Προετοιμασία θρεπτικού διαλύματος.....	- 70 -
2.3.9	Ανάπτυξη βακτηρίων σε ακραίες τιμές pH.....	- 70 -
2.3.10	Ανάπτυξη βακτηρίων σε ακραίες θερμοκρασίες	- 71 -
2.3.11	Ανάπτυξη βακτηρίων σε υπόστρωμα με ακραία συγκέντρωση σε αλατότητα (1% και 5% NaCl).....	- 71 -
2.3.12	Ανθεκτικότητα βακτηρίων σε διάφορες αντιβιοτικές ενώσεις	- 71 -
2.3.13	Κινητικότητα βακτηρίων <i>in vitro</i>	- 72 -
2.3.13.1	Ομαδική (swarming) και κολυμβητική κίνηση (swimming) βακτηρίων	- 72 -
2.3.13.2	Κίνηση των βακτηρίων στο χόμα	- 72 -
2.3.14	Σχηματισμός βιοϋμενίου (biofilm)	- 73 -
2.3.15	Ταχεία ανίχνευση επιφανειοδραστικών ενώσεων με τη μέθοδο της κατάρρευσης της σταγόνας (Drop collapse assay)	- 74 -
2.4	ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ <i>IN VITRO</i>	- 75 -

2.4.1 Μέθοδος της ταυτόχρονης διπλής καλλιέργειας (dual culture) μεταξύ μύκητα και βακτηρίου.....	- 75 -
2.4.2 Μέθοδος αναθυμιάσης με χλωροφόρμιο (CHCl ₃) (chloroform vapour method)....	- 76 -
2.4.3 Μέθοδος μικτής καλλιέργειας (Mixed culture).....	- 77 -
2.4.4 Μέθοδος της ταυτόχρονης διπλής καλλιέργειας σε αντικειμενοφόρο πλάκα.....	- 77 -
2.4.4.1 Χρώση ζωτικότητας των μυκηλιακών υφών με τη χρωστική Evans Blue	- 77 -
2.4.5 Υπολογισμός του ποσοστού παρεμπόδισης του μύκητα.....	- 78 -
2.5 ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΠΡΟΣΤΑΣΙΑ ΚΑΡΠΩΝ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ DETACHED FRUIT ASSAY	- 78 -
2.5.1 Αποστείρωση καρπών.....	- 78 -
2.5.2 Δημιουργία τεχνητής πληγής σε καρπούς.....	- 78 -
2.5.3 Προετοιμασία των βακτηρίων.....	- 79 -
2.5.4 Εμβολιασμός των βακτηρίων.....	- 79 -
2.5.5 Μόλυνση με το φυτοπαθογόνο μύκητα	- 79 -
2.5.6 Προετοιμασία των διάφανων πλαστικών δοχείων ανάπτυξης.....	- 80 -
2.5.7 Υπολογισμός της σοβαρότητας της ασθένειας	- 80 -
2.6 ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΤΩΝ ΔΕΥΤΕΡΟΓΕΝΩΝ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ ΤΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΑΠΟ ΣΤΕΡΕΟ ΜΕΣΟ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ	- 81 -
2.6.1 Εμβολιασμός βακτηρίων και φυτοπαθογόνου μύκητα	- 81 -
2.6.2 Εκχύλιση διαχεόμενων βιοδραστικών ενώσεων.....	- 82 -
2.6.3 Έλεγχος της βιοδραστικότητας του ακατέργαστου εκχυλίσματος	- 82 -
2.7 ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΑΠΟΜΟΝΩΜΕΝΩΝ ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΜΕ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΛΕΙΠΤΗΣ ΣΤΙΒΑΔΑΣ TLC	- 83 -
2.7.1 Προετοιμασία TLC πλάκας.....	- 83 -
2.7.2 Ανάπτυξη χρωματογραφήματος.....	- 83 -
2.7.3 Έλεγχος της βιοδραστικότητας των ενώσεων με τη μέθοδο της βιο-αυτογραφίας (Bioautography) στην TLC πλάκα	- 83 -
2.7.4 Υπολογισμός του συντελεστή επιβράδυνσης R _f (Retention factor)	- 84 -
2.8 ΜΕΤΑΒΟΛΟΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΕΝΩΝ ΔΕΥΤΕΡΟΓΕΝΩΝ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ ΜΕ UHPLC-ESI HRMS.....	- 85 -
2.8.1 Ταυτοποίηση δευτερογενών μεταβολιτών	- 86 -
2.9 ΈΛΕΓΧΟΣ ΣΥΜΒΑΤΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΜΑΚΡΟΑΠΟΙΚΙΩΝ ΤΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ <i>IN VITRO</i>	- 86 -
2.9.1 Μέθοδος μικτής μακροαποικίας (mixed colony spot)	- 86 -
2.9.2 Υπολογισμός της συγκέντρωσης των βακτηρίων	- 86 -
2.9.3 Μέθοδος αλληλεπίδρασης κατά ζεύγη (Pairwise interaction)	- 87 -
2.10 ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΣΕ ΦΥΤΑ <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i> COL-0 <i>IN VITRO</i>	- 87 -
2.10.1 Εφαρμογή μεμονωμένων βακτηριακών στελεχών σε φυτά <i>A. thaliana</i>	- 87 -
2.10.1.1 Αποστείρωση σπόρων <i>A. thaliana</i> Col-0	- 87 -

2.10.1.2 Προβλάστηση των σπόρων του <i>A. thaliana</i> Col-0 σε θρεπτικό μέσο ανάπτυξης ½ MS.....	- 88 -
2.10.1.3 Εμβολιασμός βακτηρίων σε φυτά <i>A. thaliana</i> Col-0	- 88 -
2.10.1.4 Διερεύνηση επίδρασης βακτηριακών πτητικών ενώσεων με τη χρήση τρυβλίων που διαθέτουν κεντρικό χώρισμα (I plates)	- 89 -
2.10.2 <i>In vitro</i> αποικισμός βακτηρίων σε φυτά <i>A. thaliana</i>	- 90 -
2.10.2.1 Προετοιμασία φυτών <i>A. thaliana</i> Col-0 και των βακτηριακών στελεχών	- 90 -
2.10.2.2 Εφαρμογή των βακτηρίων σε προβλαστημένα φυτά <i>A. thaliana</i> Col-0.....	- 90 -
2.10.2.3 Απομάκρυνση μη προσκολλημένων βακτηριακών κυττάρων από φυτά <i>A. thaliana</i> Col-0	- 91 -
2.10.2.4 Μικροσκοπική παρατήρηση των προσκολλημένων βακτηριακών κυττάρων στις ρίζες των φυτών <i>A. thaliana</i>	- 91 -
2.10.3 Εφαρμογή των βακτηρίων σε φυτά <i>A. thaliana</i> σε συνθήκες υψηλής αλατότητας <i>in vitro</i>	- 92 -
2.10.3.1 Προετοιμασία των φυτών <i>A. thaliana</i> Col-0	- 92 -
2.10.3.2 Προετοιμασία μεμονωμένων και μιγμάτων βακτηριακών στελεχών.....	- 92 -
2.10.3.3 Εμβολιασμός των βακτηρίων σε απόσταση 3 cm από τη ρίζα των φυτών <i>A. thaliana</i> Col-0	- 93 -
2.10.3.4 Στερεοσκοπική παρατήρηση του ριζικού συστήματος των φυτών <i>A. thaliana</i> Col-0.....	- 93 -
2.10.3.5 Καταγραφή των μορφολογικών χαρακτηριστικών των φυτών	- 93 -
2.11 ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΣΕ ΦΥΤΑ ΤΟΜΑΤΑΣ (<i>SOLANUM LYCOPERSICUM</i> VAR. CHONDROKATSARI MESSINIAS).....	- 93 -
2.11.1 Εφαρμογή των βακτηρίων σε <i>in vitro</i> συνθήκες.....	- 94 -
2.11.1.1 Αποστείρωση των σπόρων	- 94 -
2.11.1.2 Προετοιμασία υγρής βακτηριακής καλλιέργειας	- 94 -
2.11.1.3 Μέθοδος βιοκάλυψης των σπόρων (Seed bio-priming)	- 94 -
2.11.2 Εφαρμογή βακτηρίων σε συνθήκες θερμοκηπίου	- 95 -
2.11.2.1 Αποστείρωση των σπόρων	- 95 -
2.11.2.2 Προετοιμασία υγρής βακτηριακής καλλιέργειας	- 95 -
2.11.2.3 Μέθοδος βιοκάλυψης των σπόρων τομάτας (Seed biopriming)	- 96 -
2.11.2.4 Σπορά εμβαπτισμένων σπόρων σε γλάστρες.....	- 96 -
2.11.2.5 Ριζοπότισμα βακτηρίων.....	- 96 -
2.11.2.6 Λίπανση των φυτών τομάτας με πλήρες υγρό λίπασμα	- 97 -
2.11.2.7 Καταγραφή των μορφολογικών χαρακτηριστικών των φυτών	- 97 -
2.11.2.8 Μικροσκοπική παρατήρηση των βακτηρίων στις ρίζες φυταρίων τομάτας....	- 97 -

2.11.3 Βιολογική προστασία των φυτών <i>Solanum lycopersicum</i> var. Chondrokatsari Messinias με επαγωγή της διασυστηματικής αντοχής τους	- 97 -
2.11.3.1 Έκφραση γονιδίων που εμπλέκονται στην ενεργοποίηση της επαγόμενης διασυστηματικής αντοχής (ISR) των φυτών	- 98 -
2.11.3.1.1 Απομόνωση ολικού RNA.....	- 98 -
2.11.3.1.2 Καθαρισμός του ολικού RNA	- 99 -
2.11.3.1.3 Σύνθεση του cDNA	- 99 -
2.11.3.1.4 Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (real-time PCR).....	- 100 -
2.11.3.2 Βιολογική προστασία των φυτών <i>Solanum lycopersicum</i> εναντίον του φυτοπαθογόνου μύκητα <i>Botrytis cinerea</i>	- 102 -
2.11.3.2.1 Μόλυνση των φυτών με το φυτοπαθογόνο μύκητα <i>Botrytis cinerea</i>	- 102 -
2.11.3.2.2 Αξιολόγηση της σοβαρότητας της ασθένειας	- 103 -
2.12 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ.....	- 103 -
2.13 ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗ ΚΑΙ ΕΠΙΣΗΜΕΙΩΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΟΣ	- 104 -
2.13.1 Εργαλεία βιοπληροφορικής ανάλυσης (Genomic analysis tools).....	- 105 -
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	- 107 -
3.1 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΕΝΔΟΦΥΤΙΚΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΤΟΥ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΟΥ ΦΥΤΟΥ <i>CALENDULA OFFICINALIS</i>	- 107 -
3.1.1 Μορφολογική κατηγοριοποίηση των αντιπροσωπευτικών ενδοφυτικών βακτηρίων που απομονώθηκαν	- 107 -
3.1.2 Φυλογενετική ανάλυση με βάση το 16S rRNA.....	- 109 -
3.1.2.1 Φυλογενετικό δέντρο επιλεγμένων ενδοφυτικών βακτηρίων	- 111 -
3.1.4 Διαφοροποίηση των ενδοφυτικών στελεχών ανά είδος με <i>in vitro</i> αλληλεπιδράσεις (Kin discrimination).....	- 112 -
3.1.4.1 Μέθοδος της ταυτόχρονης ομαδικής κίνησης (swarm boundary line) των βακτηρίων του γένους <i>Bacillus</i>	- 113 -
3.1.4.1.1 Αλληλεπίδραση των ομαδικά κινούμενων στελεχών (Sw) με τη μέθοδο της ταυτόχρονης ομαδικής κίνησης	- 115 -
3.1.4.1.1.1 Βακτηριακά στελέχη του είδους <i>B. velezensis</i> και <i>B. subtilis</i>	- 115 -
3.1.4.1.1.2 Βακτήρια του είδους <i>B. halotolerans</i>	- 116 -
3.1.5 Επίδραση των ενδοφυτικών βακτηρίων στην ανάπτυξη και τη μορφολογία του φυτού <i>A. thaliana</i> Col-0.....	- 118 -
3.1.5.1 Βακτήρια του γένους <i>Bacillus</i>	- 119 -
3.1.5.1.1 Μακροσκοπική παρατήρηση φυτών <i>A. thaliana</i> Col-0	- 119 -

3.1.5.1.2 Στερεοσκοπική παρατήρηση του ακρορρίζιου των φυτών <i>A. thaliana</i> Col-0	- 123 -
3.1.5.2 Βακτήρια του γένους <i>Pseudomonas</i> , <i>Agrobacterium</i> , <i>Stenotrophomonas</i> και <i>Pantoea</i>	- 125 -
3.1.5.2.1 Μακροσκοπική παρατήρηση φυτών <i>A. thaliana</i> Col-0	- 125 -
3.5.2.2.2 Στερεοσκοπική παρατήρηση	- 129 -
3.1.6 Επίδραση των παραγόμενων πτητικών ενώσεων των ενδοφυτικών βακτηρίων στην ανάπτυξη του φυτού <i>A. thaliana</i> Col-0	- 130 -
3.1.6.1 Βακτήρια του γένους <i>Bacillus</i> sp.	- 131 -
3.1.6.2 Βακτήρια του γένους <i>Pseudomonas</i> , <i>Agrobacterium</i> , <i>Stenotrophomonas</i> και <i>Pantoea</i>	- 131 -
3.1.7 Ανίχνευση των άμεσων και έμμεσων μηχανισμών που προάγουν την ανάπτυξη των φυτών.....	- 132 -
3.1.8 Επιβίωση βακτηρίων σε ακραίες συνθήκες ανάπτυξης.....	- 135 -
3.1.9 Φυσική ανθεκτικότητα των ενδοφυτικών βακτηρίων σε διάφορες αντιβιοτικές ενώσεις. -	136 -
3.2 ΠΕΡΑΙΤΕΡΩ ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΩΝ ΕΝΔΟΦΥΤΙΚΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ CAL.R.29, CAL.F.4, CAL.L.30, CAL.F.5, CAL.R.11, CAL.F.2.1, CAL.L.11, CAL.R.33, CAL.R.19, CAL.L.21, CAL.R.20, CAL.L.7A ΚΑΙ CAL.R.6	- 138 -
3.2.1 Επίδραση των επιλεγμένων ενδοφυτικών βακτηρίων στη βλαστικότητα και την ανάπτυξη φυταρίων τομάτας <i>in vitro</i>	- 138 -
3.2.2 Κινήσεις βακτηρίων, ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου και παραγωγή επιφανειοδραστικών ενώσεων.....	- 140 -
3.2.3 Βιολογική αντιμετώπιση των φυτοπαθογόνων μυκήτων <i>Rhizoctonia solani</i> και <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i> <i>in vitro</i>	- 142 -
3.3 ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΡΙΖΟΣΦΑΙΡΙΚΟΥ ΒΑΚΤΗΡΙΟΥ <i>PSEUDOMONAS CARNIS</i> X.....	- 145 -
3.3.1 Εφαρμογή του ριζοσφαιρικού βακτηρίου <i>Pseudomonas carnis</i> X στο φυτό μοντέλο <i>Arabidopsis thaliana</i> Col-0	- 146 -
3.3.1.1 Αποικισμός της ρίζας των φυτών <i>Arabidopsis thaliana</i> Col-0	- 148 -
3.3.2 Ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου και κίνησης του βακτηρίου <i>P. carnis</i> X στο χώμα..	- 149 -
3.3.3 Μελέτη άμεσων και έμμεσων μηχανισμών που προάγουν την ανάπτυξη των φυτών (PGP traits)	- 150 -
3.3.4 Επιβίωση του <i>P. carnis</i> X σε ακραίες συνθήκες ανάπτυξης.....	- 151 -
3.3.5 Εφαρμογή του βακτηρίου <i>P. carnis</i> X σε φυτά <i>Solanum lycopersicum</i> var. Chondrokatsari Messinias σε <i>in vitro</i> συνθήκες.....	- 151 -

3.3.6 Ανταγωνιστική δράση του ριζοσφαιρικού βακτηρίου <i>P. carnis</i> X εναντίον του φυτοπαθογόνου μύκητα <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i>	153 -
3.3.6.1 Μέθοδος της διπλής καλλιέργειας (dual culture).....	153 -
3.3.6.2 Μέθοδος αναθυμιάσης με χλωροφόρμιο (CHCl ₃) (chloroform vapour method) -	154
-	
3.3.6.3 Μέθοδος μικτής καλλιέργειας (Mixed culture).....	154 -
3.3.6.3.1 Μικροσκοπική παρατήρηση της κάλυψης των υφών του μύκητα <i>F. oxysporum</i> sp. από το ριζοσφαιρικό βακτήριο <i>P. carnis</i> X.....	155 -
3.3.6.3.2 Μικροσκοπική παρατήρηση σε μικροσκόπιο φθορισμού	157 -
3.3.6.3.3 Μικροσκοπική παρατήρηση αντίθεσης φάσης και σκοτεινού πεδίου	157 -
3.3.6.4 Μέθοδος της ταυτόχρονης διπλής καλλιέργειας σε αντικειμενοφόρο πλάκα ...	158 -
3.3.6.4.1 Χρώση ζωτικότητας των μυκηλιακών υφών με τη χρωστική Evans Blue	159 -
3.4 ΠΕΡΑΙΤΕΡΩ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΩΝ ΕΝΔΟΦΥΤΙΚΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ CAL.R.29, CAL.L.30, CAL.F.4, CAL.F.2.1, CAL.R.11, CAL.L.11 ΚΑΙ CAL.R.19 ΚΑΙ ΤΟΥ ΡΙΖΟΣΦΑΙΡΙΚΟΥ ΒΑΚΤΗΡΙΟΥ <i>P. CARNIS</i> X.....	160 -
3.4.1 Βιολογική αντιμετώπιση του φυτοπαθογόνου μύκητα <i>Botrytis cinerea</i> από επιλεγμένα βακτηριακά στελέχη σε <i>in vitro</i> και <i>in vivo</i> συνθήκες.....	160 -
3.4.1.1 Ανταγωνιστική δράση με τη μέθοδο της ταυτόχρονης διπλής καλλιέργειας <i>in vitro</i> -	160 -
3.4.1.2 Ανταγωνιστική δράση εναντίον του φυτοπαθογόνου μύκητα <i>Botrytis cinerea</i> σε καρπούς τομάτας <i>in vivo</i> (detached fruit assay).....	161 -
3.4.2 Απομόνωση αντιβιοτικών ενώσεων που παράγονται εναντίον του φυτοπαθογόνου μύκητα <i>Botrytis cinerea</i> και διαχωρισμός τους με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) -	164 -
3.4.3 Ανίχνευση των γονιδίων που κωδικοποιούν για τις αντιβιοτικές ενώσεις Iturin, Fengycin και Surfactin με PCR.....	166 -
3.5 ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΩΝ ΕΝΔΟΦΥΤΙΚΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ CAL.L.30, CAL.F.4, ΚΑΙ CAL.R.29 ΚΑΘΩΣ ΚΑΙ ΤΟΥ ΡΙΖΟΣΦΑΙΡΙΚΟΥ ΒΑΚΤΗΡΙΟΥ X ΩΣ ΜΕΜΟΝΩΜΕΝΑ ΚΑΙ ΜΙΓΜΑΤΑ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ. -	168 -
3.5.1 Μεταβολομική ανάλυση με UHPLC-ESI HRMS	168 -
3.5.1.1 Cal.r.29.....	168 -
3.5.1.2 Cal.l.30	172 -
3.5.2 Βιολογική προστασία καρπών ελιάς (detached fruit assay) από τον φυτοπαθογόνο μύκητα <i>Colletotrichum acutatum</i>	176 -
3.5.3 Εφαρμογή των βακτηριακών στελεχών Cal.r.29, Cal.l.30, Cal.f.4 και X σε φυτά <i>A. thaliana</i> Col-0 σε συνθήκες υψηλής αλατότητας.....	179 -
3.5.4 Συμβατότητα μιγμάτων βακτηρίων <i>in vitro</i>	181 -
3.5.4.1 Συμβατότητα βακτηρίων με τη μέθοδο της μικτής μακροαποικίας (mixed colony spot).....	181 -

3.5.4.1.1 <i>Bacillus velezensis</i> Cal.r.29- <i>Pseudomonas carnis</i> X	181 -
3.5.4.1.2 <i>Bacillus halotolerans</i> Cal.l.30- <i>Bacillus halotolerans</i> Cal.f.4	182 -
3.5.4.1.3 <i>Bacillus halotolerans</i> Cal.l.30- <i>Bacillus velezensis</i> Cal.r.29	183 -
3.5.4.2 Συμβατότητα βακτηρίων με τη μέθοδο της αλληλεπίδρασης των μακροαποικιών τους κατά ζεύγη (colony pairwise interaction).....	185 -
3.5.4.2.1 <i>Bacillus velezensis</i> Cal.r.29- <i>Pseudomonas carnis</i> X	185 -
3.5.4.2.2 <i>Bacillus halotolerans</i> Cal.l.30- <i>Bacillus halotolerans</i> Cal.f.4	186 -
3.5.4.2.3 <i>Bacillus halotolerans</i> Cal.l.30- <i>Bacillus velezensis</i> Cal.r.29	187 -
3.5.4.3 Επίδραση των μιγμάτων βακτηρίων στο σχηματισμό βιοϋμενίου <i>in vitro</i>	189 -
3.5.5 Εφαρμογή των βακτηριακών στελεχών Cal.r.29, Cal.l.30, Cal.f.4 και X ως μίγματα βακτηρίων σε φυτά <i>A. thaliana</i> Col-0 <i>in vitro</i>	190 -
3.5.5.1 Επίδραση των βακτηρίων στη ανάπτυξη και τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των φυτών	190 -
3.5.5.2 Αποικισμός των ριζών του φυτού <i>A. thaliana</i>	192 -
3.5.5.2.1 Μικροσκοπική παρατήρηση των προσκολλημένων βακτηριακών κυττάρων στις ρίζες των φυτών <i>A. thaliana</i>	195 -
3.5.6 Βιολογική προστασία καρπών επιτραπέζιου σταφυλιού (detached fruit assay) από το φυτοπαθογόνο μύκητα <i>Botrytis cinerea</i> μετά την εφαρμογή μεμονωμένων και μιγμάτων βακτηρίων.....	196 -
3.5.7 Εφαρμογή των βακτηριακών στελεχών Cal.l.30, Cal.f.4, Cal.r.29 και X σε φυτά <i>Solanum lycopersicum</i> var. Chondrokatsari Messinias σε συνθήκες θερμοκηπίου	199 -
3.5.7.1 Επίδραση των βακτηρίων στη ανάπτυξη και τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των φυτών τομάτας.....	199 -
3.5.7.1.1 Εφαρμογή των μεμονωμένων στελεχών Cal.l.30, Cal.f.4, Cal.r.29 και X -	199 -
3.5.7.1.1.2 Μικροσκοπική παρατήρηση των προσκολλημένων βακτηριακών κυττάρων στη ρίζα των φυτών <i>Solanum lycopersicum</i> από τα μεμονωμένα βακτηριακά στελέχη	202 -
3.5.7.1.2 Εφαρμογή των μιγμάτων βακτηρίων Cal.l.30-Cal.f.4, Cal.r.29-Cal.l.30 και Cal.r.29-X σε φυτά τομάτας	203 -
3.5.7.2 Έκφραση των γονιδίων που εμπλέκονται στην επαγόμενη διασυστηματική ανοχή (ISR) των φυτών <i>Solanum lycopersicum</i> var. Chondrokatsari Messinias.....	206 -
3.5.7.2.1 Επίπεδα έκφρασης γονιδίων μετά την εφαρμογή των βακτηρίων με biopriming	207 -
3.5.7.2.1 Επίπεδα έκφρασης γονιδίων 24 h μετά τον εμβολιασμό των βακτηρίων με ριζοπότισμα.....	208 -

3.5.7.3 Βιολογική προστασία των φυτών <i>Solanum lycopersicum</i> var. Chondrokatsari Messinias εναντίον του φυτοπαθογόνου μύκητα <i>Botrytis cinerea</i> μέσω της επαγόμενης διασυστηματικής αντοχής (ISR)	211 -
3.5.7.3.1 Μείωση της νεκρωτικής κηλίδας των φύλλων τομάτας	211 -
3.6 ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ CAL.L.30, CAL.L.11, CAL.F.4 ΚΑΙ Χ.....	214 -
3.6.1 Ανάλυση της φυλογενετικής απόστασης των γονιδιωμάτων των στελεχών Cal.l.30, Cal.f.4 και Cal.l.11 του είδους <i>B. halotolerans</i> με ANI και dDDH	214 -
3.6.2 Ανάλυση της φυλογενετικής απόστασης του γονιδιώματος του βακτηρίου <i>P. carnis</i> Χ με ANI και dDDH	216 -
3.6.3 Πρόβλεψη συστάδων γονιδίων για τη βιοσύνθεση δευτερογενών μεταβολιτών στο γονιδίωμα του βακτηρίου <i>B. halotolerans</i> Cal.l.30.....	216 -
3.6.4 Πρόβλεψη συστάδων γονιδίων για τη βιοσύνθεση δευτερογενών μεταβολιτών στο γονιδίωμα του βακτηρίου <i>P. carnis</i> Χ.....	218 -
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	221 -
4.1 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΕΝΔΟΦΥΤΙΚΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΤΟΥ ΦΥΤΟΥ <i>CALENDULA OFFICINALIS</i> ΚΑΙ ΤΟΥ ΡΙΖΟΣΦΑΙΡΙΚΟΥ ΒΑΚΤΗΡΙΟΥ Χ ΤΟΥ <i>PHASEOLUS VULGARIS</i> ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ.....	221 -
4.2 ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΕΝΔΟΦΥΤΙΚΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΤΟΥ ΦΥΤΟΥ <i>CALENDULA OFFICINALIS</i> ΚΑΙ ΤΟΥ ΡΙΖΟΣΦΑΙΡΙΚΟΥ ΒΑΚΤΗΡΙΟΥ Χ ΤΟΥ <i>PHASEOLUS VULGARIS</i>	231 -
4.2.1 Εφαρμογή των ανταγωνιστικών βακτηρίων <i>in vitro</i>	231 -
4.2.2 Εφαρμογή των ανταγωνιστικών βακτηρίων <i>in vitro</i> και <i>in vivo</i>	234 -
4.2.3 Εφαρμογή των ανταγωνιστικών βακτηρίων <i>in planta</i> και ενεργοποίηση της ISR των φυτών.....	244 -
4.3 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΜΙΓΜΑΤΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΠΡΟΣΤΑΣΙΑ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ <i>SOLANUM LYCOPERSICUM</i> VAR. CHONDROKATSARI MESSINIAS	249 -
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	259 -

Εισαγωγή



1. Εισαγωγή

1.1 Φυτικό μικροβίωμα

Τα φυτά προσφέρουν ένα ευρύ φάσμα οικοτόπων για την ανάπτυξη των μικροβίων, όπως είναι οι ιστοί με υψηλή υγρασία και αυξημένη συγκέντρωση θρεπτικών στοιχείων, αλλά και λιγότερο ελκυστικούς ιστούς με ελλιπή θρεπτικά στοιχεία και παράλληλη έκθεση σε ακραίες περιβαλλοντικές συνθήκες (Gnanamanickam S. S., 2006). Οι επιφάνειες των σπόρων (σπερματόσφαιρα), των φύλλων, ανθέων και καρπών (φυλλόσφαιρα), των ριζών (ριζόσφαιρα), καθώς και το εσωτερικό των ιστών (ενδόσφαιρα), είναι οικολογικοί θώκοι που παρουσιάζουν πλούσιο μικροβιακό φορτίο (Liu et al., 2017; Massoni et al., 2020). Οι προκαρυώτες και κυρίως τα βακτήρια, αποτελούν την κυρίαρχη ομάδα μικροοργανισμών η οποία υπερέχει σε αριθμό στις περισσότερες μικροβιακές κοινότητες των φυτών (Gnanamanickam S. S., 2006). Αυτή η κατηγορία μικροοργανισμών, μπορεί να εμφανίσει καλλιεργήσιμα βακτήρια συγκέντρωσης 10^8 - 10^9 κύτταρα ανά γραμμάριο φυτικού ιστού ρίζας και συγκέντρωση συνολικού αριθμού καλλιεργήσιμων και μη βακτηριακών κυττάρων 10^{10} κύτταρα ανά γραμμάριο ρίζας (Schoenborn et al., 2004). Αντίστοιχα, ο πληθυσμός των καλλιεργήσιμων βακτηρίων του εδάφους μπορεί να κυμανθεί μεταξύ 10^6 - 10^9 κύτταρα ανά γραμμάριο χώματος (Gnanamanickam S. S., 2006). Τα βακτήρια συναντώνται τόσο στην επιφάνεια των ιστών (επιφυτικά) και στην περιοχή της ριζόσφαιρας των φυτών (ριζοσφαιρικά), όσο και εντός των φυτών (ενδοφυτικά), δημιουργώντας μια αμφίδρομη ωφέλιμη σχέση με τον ξενιστή τους (Santoyo et al., 2016; De Souza et al., 2016). Τα ωφέλιμα βακτήρια, παρουσιάζουν ένα πλήθος μηχανισμών που τα καθιστούν παράγοντες που προάγουν την ανάπτυξη και προστασία των φυτών (Plant Growth Promoting Bacteria, PGPB). Τα ωφέλιμα βακτήρια της περιοχής της ριζόσφαιρας ονομάζονται PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria), ενώ εκείνα που συναντώνται στο εσωτερικό των φυτών αποτελούν τα PGPEB (Plant Growth Promoting Endophytic Bacteria) (Glick, 2012).

1.1.1 Ριζοσφαιρικά βακτήρια

Η λεπτή στρώση χώματος που καλύπτει τις ρίζες των φυτών αποτελεί την περιοχή της ριζόσφαιρας (Brick et al., 2016). Η ριζόσφαιρα, είναι μια σημαντικά ενεργή περιοχή της ρίζας, η οποία επηρεάζεται άμεσα από τα ριζικά εκκρίματα όπως τα αμινοξέα, οι βιταμίνες, τα σάκχαρα, οι πολυσακχαρίτες, οι πρωτεΐνες, τα λιπαρά οξέα, οι δευτερογενείς μεταβολίτες κ.α. (Bais et al., 2008; Badri et al., 2009). Όπως περιγράφηκε για πρώτη φορά από το Hiltner το 1904, ο αυξημένος αριθμός θρεπτικών συστατικών που εκκρίνονται από τις ρίζες των

φυτών, προσελκύει πλήθος βακτηρίων παρέχοντας σημαντική μικροβιακή δραστηριότητα στην περιοχή της ριζόσφαιρας (Hiltner L., 1904). Τα βακτήρια που αποικίζουν τις ρίζες των φυτών συναντώνται κυρίως στα μεσοδιαστήματα των επιδερμικών κυττάρων και στις περιοχές όπου εξέρχονται οι πλευρικές ρίζες, ενώ πολύ μικρότερος αριθμός αποικίζει την επιφάνεια της ρίζας (Rovira A.D., 1956; Lugtenberg & Kamilova., 2009). Δεδομένου ότι τα βακτήρια είναι η πιο άφθονη κατηγορία μικροοργανισμών στη ριζόσφαιρα, πιθανώς επηρεάζουν σε μεγάλο βαθμό τη φυσιολογία των φυτών, λαμβάνοντας ιδιαίτερα υπ' όψιν την ανταγωνιστικότητά τους κατά τον αποικισμό της ρίζας (Barriuso et al., 2009). Τα βακτήρια που αποικίζουν τις ρίζες των φυτών χωρίζονται σε δύο βασικές κατηγορίες ανάλογα με την επίδρασή τους στα φυτά και την αλληλεπίδρασή τους με τις ρίζες: βακτήρια που λειτουργούν ως παθογόνα των φυτών και βακτήρια που ενεργούν ωφελιμιστικά. Επομένως, τα βακτήρια που αποικίζουν την περιοχή της ριζόσφαιρας ενός φυτού και προάγουν την ανάπτυξη των φυτών ορίζονται ως PGPR βακτήρια. Η πλειοψηφία των ειδών που ανήκουν στα PGPR βακτήρια, βρέθηκε πως ανήκουν στα γένη *Acinetobacter*, *Agrobacterium*, *Arthobacter*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Burkholderia*, *Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, *Frankia*, *Serratia*, *Thiobacillus*, *Pseudomonads* και *Bacillus* (Goswami et al., 2016).

1.1.2 Ενδοφυτικά βακτήρια

Ως ενδόφυτα χαρακτηρίζεται το σύνολο των μικροοργανισμών που διαβιούν στο εσωτερικό των φυτικών ιστών για ένα χρονικό διάστημα ή καθ' όλη τη διάρκεια του κύκλου ζωής τους, χωρίς να προκαλούν συμπτώματα παθογένειας στον ξενιστή τους (Εικ. 1.1) (Hardoim et al., 2015; Petrini O., 1991).

Οι ενδοφυτικοί μικροοργανισμοί κατηγοριοποιούνται περαιτέρω σε υποχρεωτικά ή προαιρετικά ενδόφυτα. Η επιβίωση των υποχρεωτικά ενδοφυτικών μικροοργανισμών εξαρτάται απόλυτα από τη συμβατότητα με τον ξενιστή τους. Η μεταφορά τους σε άλλο φυτό πραγματοποιείται με οριζόντια μεταφορά ή μέσω φορέων. Αντιθέτως, τα προαιρετικά ενδοφυτικά μπορούν να επιβιώσουν ταυτόχρονα και σε άλλα ενδιαιτήματα, όπως είναι η επιφάνεια του φυτού ή του εδάφους και από εκεί να εισχωρήσουν στο φυτό ξενιστή (del Carmen Orozco-Mosqueda & Santoyo, 2020; Hallmann & Berg., 2006; Hardoim et al., 2008; Sessitsch et al., 2002). Καθώς το ενδοφυτικό βακτήριο εισέρχεται εντός του ξενιστή του, αναγνωρίζεται από το φυτό με την ενεργοποίηση και ανταλλαγή σηματοδοτικών μορίων μεταξύ τους (Khare et al., 2018).

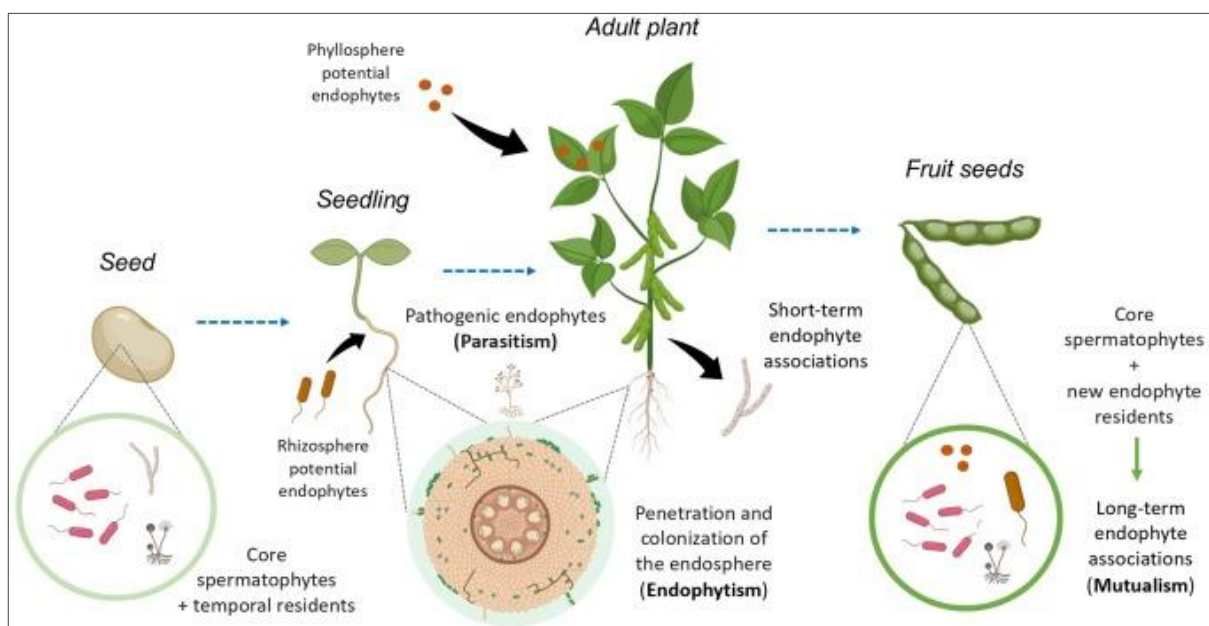
Τα ριζικά εκκρίματα των φυτών ξενιστών παίζουν καθοριστικό ρόλο στο χημειοτακτισμό τόσο των ριζοσφαιρικών όσο και των ενδοφυτικών βακτηρίων (Rosenblueth & Martínez-Romero., 2006; Compant et al., 2010; Brader et al., 2014). Αποτελούν μια πλούσια πηγή βιομορίων, θρεπτικών στοιχείων και νερού, και ως αποτέλεσμα προσελκύουν ένα πλήθος ωφέλιμων μικροοργανισμών, συμπεριλαμβανομένων και των ενδοφυτικών βακτηρίων (Hardoim et al., 2015).

Ο πλέον συνηθισμένος τρόπος εισόδου των ενδοφυτικών βακτηρίων εντός των ριζών είναι μέσω κεντρικών και πλευρικών ρωγμών, καθώς και διαφόρων πληγών που δημιουργούνται στους ιστούς κατά την ανάπτυξη του φυτού (Santoyo et al., 2016). Από τις πληγές αυτές, γίνεται διαρροή φυτικών μεταβολιτών οι οποίοι προσελκύουν τα ενδοφυτικά βακτήρια (Santoyo et al., 2016). Μόλις εισχωρήσουν, τα ενδοφυτικά βακτήρια είτε αποικίζουν άμεσα τους ενδοκυτταρικούς και διακυτταρικούς χώρους των ιστών, είτε κινούνται διασυστηματικά μέσω του ξυλώματος της ρίζας με κατεύθυνση τους υπέργειους ιστούς, υποβοηθούμενα από την κίνηση των μαστιγίων και από το ρεύμα διαπνοής των φυτών (James et al., 2002; Compant et al., 2005). Ο αποικισμός των ενδοφυτικών βακτηρίων αποτελεί πιο εύκολη διαδικασία καθώς τα θρεπτικά στοιχεία του ξενιστή μπορούν να χρησιμοποιηθούν αποτελεσματικότερα και χωρίς ανταγωνισμό, σε σύγκριση με τον αυξημένο αριθμό των βακτηρίων που αποικίζουν εκτός της ρίζας (Liu et al., 2017).

Η δομή των ενδοφυτικών βακτηριακών κοινοτήτων επηρεάζεται από πλήθος βιοτικών και αβιοτικών παραγόντων, όπως είναι το είδος και η ποικιλία του ξενιστή, το στάδιο ανάπτυξης του φυτού, το σύνολο των ανταγωνιστικών μικροβίων, η θερμοκρασία, η ακτινοβολία, καθώς και το πλήθος των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών του εδάφους (Anyango et al., 1995; Overbeek & Saikkonen, 2016; Van Overbeek & Van Elsas; 2008, Yu et al., 2015). Ως αποτέλεσμα των πολυδιάστατων συνθηκών που αντιμετωπίζουν τα βακτήρια, η ριζική ενδοφυτική βιοποικιλότητα υπερβαίνει εκείνης που συναντάται γύρω από την περιοχή της ριζόσφαιρας (Marquez-Santacruz et al., 2010).

Τα ενδοφυτικά βακτήρια μπορούν να διαχωρισθούν σε περαιτέρω τρεις κατηγορίες ανάλογα με το ρόλο τους σε σχέση με τον ξενιστή τους: τα αμοιβαία ενδοφυτικά βακτήρια (mutualistic), ευκαιριακά ενδοφυτικά παθογόνα (opportunistic pathogens) και τα κοινά ενδοφυτικά βακτήρια, τα οποία αποτελούν και τη μεγαλύτερη αριθμητικά κατηγορία (Hardoim et al., 2015). Τα κοινά ενδοφυτικά βακτήρια δεν επηρεάζουν την απόδοση του ξενιστή τους παρά μόνο επιβιώνουν από τους μεταβολίτες που παράγει, σε αντίθεση με τα

αμοιβαία ενδοφυτικά βακτήρια τα οποία ωφελούν τον ξενιστή τους και συχνά προάγουν την ανάπτυξή του (Hardoim et al., 2015). Το σύνολο των ενδοφυτικών βακτηρίων που προάγουν την ανάπτυξη των φυτών και ταυτόχρονα αποικίζουν και επιβιώνουν εντός του φυτού ξενιστή χωρίς την εμφάνιση συμπτωμάτων παθογένειας, ορίζονται ως PGPEB (Plant Growth Promoting Endophytic Bacteria). Στην κατηγορία των ωφέλιμων ενδοφυτικών βακτηρίων (PGPEB) συναντάται σημαντικός αριθμός ειδών που ανήκουν στα γένη βακτηρίων *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Methylobacterium*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Paenibacillus*, *Pantoea*, *Phyllobacterium*, *Pseudomonas*, *Rhanelia*, *Rhodanobacter*, *Sphingomonas*, και *Stenotrophomonas* (Santoyo et al., 2016).



Εικόνα 1.1 Σύντομη σχηματική αναπαράσταση του κύκλου ζωής των φυτών και τη συνύπαρξή τους με τα ενδόφυτα (del Carmen Orozco-Mosqueda et al., 2020).

1.2 Αποικισμός των βακτηρίων- Κινητικότητα και σχηματισμός βιοϋμενίου

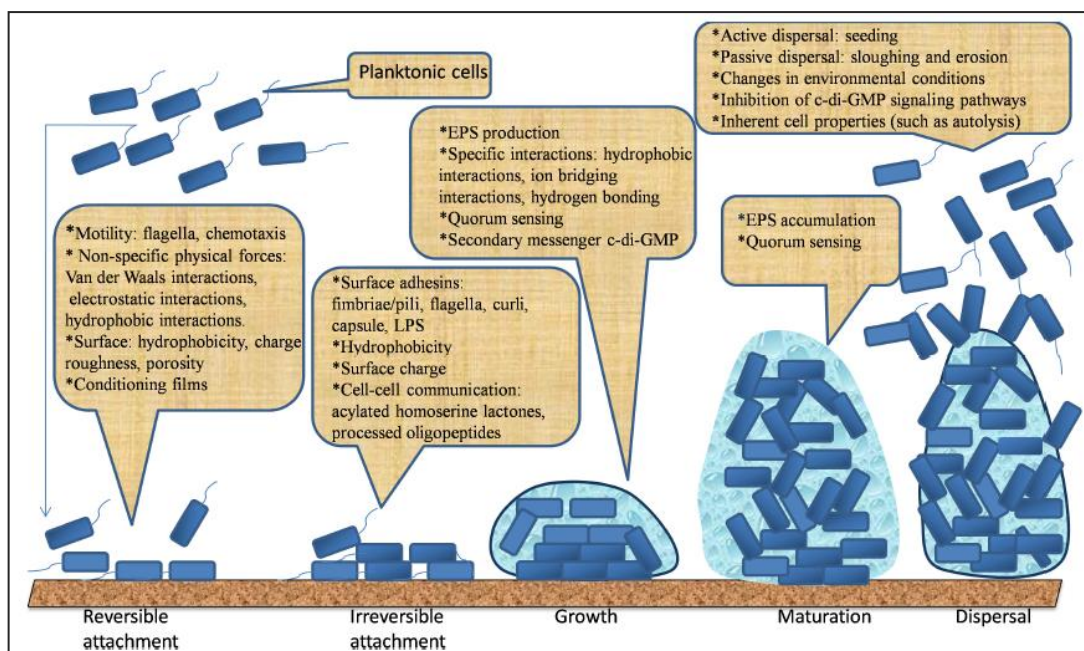
Η περιοχή της ριζόσφαιρας αποτελεί έναν κόμβο μικροβιακών αλληλεπιδράσεων, όπου επηρεάζουν άμεσα τη λειτουργία των φυτών (Pandit et al., 2020). Η ριζόσφαιρα περιλαμβάνει το στρώμα της ενδοριζόσφαιρας, της εκτοριζόσφαιρας και της ριζοεπιφάνειας (rhizoplane), καθ' ένα από τα οποία αποικίζεται από ένα σημαντικό αριθμό μικροοργανισμών. Οι ρίζες των φυτών εμπλουτίζουν το χώμα που τις περιβάλλει με ριζικά εκκρίματα, βλεννογόνες ενώσεις υδατανθράκων και κυτταρικά θραύσματα, τα οποία αποτελούν σημαντική πηγή σακχάρων, λιπαρών οξέων, αμινοξέων, φυτοορμονών, βιταμινών και αντιμικροβιακών ενώσεων (Dhawi, 2016). Τα βακτήρια έχουν την ικανότητα να αποικίζουν τόσο σε αβιοτικές (γυαλί, μέταλλο, τεφλόν), όσο και σε βιοτικές επιφάνειες

(φυτά, ζώα, άλλους μικροοργανισμούς) και να επιβιώνουν εκεί ως μεμονωμένα κύτταρα, συστάδες κυττάρων, είτε ως βιοϋμένια (Pandit et al., 2020).

Οι μηχανισμοί με τους οποίους τα βακτήρια μεταφέρονται περιλαμβάνουν την κίνηση Brownian, την καθίζηση λόγω ειδικού βάρους μεταξύ του βακτηρίου και του ρεύματος νερού, ή τη μαζική κατευθυνόμενη κίνηση, κατά την οποία τα βακτήρια μεταφέρονται φυσικά προς την επιφάνεια, παράλληλα με την κίνηση του υγρού ρεύματος (Gao et al., 2016; Palmer et al., 2007). Η κινητικότητα των βακτηριακών κυττάρων περιλαμβάνει ένα ευρύ φάσμα μορφών, όπως είναι η κολυμβητική (swimming), η ομαδική (swarming), η gliding, η twitching, η sliding, η darting και η corkscrew κινητικότητα (Kearns, 2010; Kinosita et al., 2018).

Ο χημειοτακτισμός είναι η κατευθυνόμενη κίνηση των βακτηριακών κυττάρων προς μια πηγή θρεπτικών ενώσεων ή χημειο-προσεκλυστικών ουσιών, όπως σάκχαρα και αμινοξέα. Τα κινούμενα βακτηριακά κύτταρα μετρούν συνεχώς τη συγκέντρωση των χημειο-προσεκλυστικών ουσιών μέσω ειδικών διαμεμβρανικών χημικών υποδοχέων, οι οποίοι συχνά διατάσσονται σε συστάδες στους πόλους των κυττάρων (Porter et al., 2011; Wadhams & Armitage, 2004). Τα βακτήρια του γένους *Bacillus* και *Pseudomonas* έχουν ξεχωρίσει για την ικανότητά των κυττάρων τους να κινούνται σε επιφάνειες και να προσκολλώνται επιφανειακά σε φυτικούς ιστούς σχηματίζοντας ισχυρά βιοϋμένια, με τα λιποπεπτίδια που παράγουν να εμπλέκονται άμεσα στον αποικισμό τους (Kohl et al., 2019). Στους φυτικούς ιστούς, τα βακτήρια έχουν την ικανότητα να σχηματίζουν βιοϋμένια τόσο στις επιφάνειες των φύλλων, των βλαστών, των καρπών, όσο και των ριζών (Bogino et al., 2013; Morikawa, 2006; Schirawski, J., & Perlin, 2018; Zeriouh et al., 2014). Ως βιοϋμένιο, ορίζεται μια καλά οργανωμένη δομή η οποία σχηματίζεται από ένα σύνολο βακτηριακών κυττάρων που περικλείεται από μια εξωκυτταρική πολυμερή μήτρα (EPS), εντός της οποίας τα κύτταρα επικοινωνούν μεταξύ τους (Εικ. 1.2) (Armbruster & Parsek, 2018; Kohl et al., 2019).

Τα βακτήρια που ζουν σε βιοϋμένια έχουν διάφορα πλεονεκτήματα, μεταξύ των οποίων η προστασία από δυσμενείς περιβαλλοντικές συνθήκες, όπως η οσμωτική καταπόνηση, η υπεριώδης ακτινοβολία (UV), η θερμοκρασία, η αλλαγή στο pH, η έκθεση σε τοξίνες και αντιμικροβιακές ενώσεις, η προστασία από ανταγωνιστικούς μικροοργανισμούς καθώς και η απορρόφηση των απαραίτητων για την ανάπτυξή τους θρεπτικών στοιχείων από τον ιστό αποικισμού τους (Koo & Yamada, 2016).



Εικόνα 1.2

Οι πέντε φάσεις που οδηγούν στην ανάπτυξη και τη διασπορά του βιοϋμενίου (Muhammad et al., 2020).

Οι ρίζες του φυτού *A. thaliana* παρουσίασαν ένα σύνθετο μίγμα βακτηρίων, τα οποία σχημάτιζαν ένα βιοϋμένιο με θετικό αντίκτυπο στην ανάπτυξη και παραγωγικότητα του φυτού (Hassani et al., 2018). Τα βιοϋμένια που σχηματίζονται στις ρίζες των φυτών συμβάλλουν στην απορρόφηση διάφορων οργανικών και ανόργανων ενώσεων, ενώ παράλληλα διασπούν ενώσεις που φέρουν πολύπλοκα στοιχεία, όπως είναι το άζωτο και ο φώσφορος (Ikuma et al., 2013). Ταυτόχρονα, αυξάνουν την βλαστική ικανότητα των φυτών, ενισχύουν τις φωτοσυνθετικές παραμέτρους, όπως είναι η συγκέντρωση της χλωροφύλλης, ο ρυθμός διαπνοής, η συγκέντρωση του CO₂ και ο καθαρός φωτοσυνθετικός ρυθμός, ενισχύουν τη σύνθεση των φυτικών πολυσακχαριτών, όπως είναι η ξυλάνη, η πηκτίνη και η αραβινογαλακτάνη, ενώ προσδίδουν ανθεκτικότητα σε βιοτικές και αβιοτικές καταπονήσεις (Ansari et al., 2019; Bais et al., 2004; Kasim et al., 2016; Poole, 2017). Ο σχηματισμός βιοϋμενίων από ανταγωνιστικά βακτηριακά στελέχη σε ρίζες, φύλλα και καρπούς φυτών, συμβάλλει άμεσα στη βιολογική αντιμετώπιση πλήθους φυτοπαθογόνων μυκήτων (Bais et al., 2004; Chen et al., 2013; Haggag et al., 2008; Kröber et al., 2016; Zerrouh et al., 2014).

1.3 Μηχανισμοί βακτηρίων που προάγουν την ανάπτυξη των φυτών (PGP)

Τόσο τα ριζοσφαιρικά όσο και ενδοφυτικά ωφέλιμα βακτήρια που αποικίζουν τους ξενιστές τους, φέρουν ένα σύνολο άμεσων και έμμεσων μηχανισμών που προάγουν την ανάπτυξη αλλά και προστασία των φυτών (Plant Growth Promoting methods, PGP). Οι δύο κατηγορίες ωφέλιμων, για τα φυτά, βακτηρίων, φέρουν ένα ευρύ φάσμα οικολογικών λειτουργιών όπως είναι η απορρόφηση θρεπτικών συστατικών συμπεριλαμβανομένων της

σταθεροποίησης του αζώτου, της διαλυτοποίησης του φωσφόρου και της δέσμευσης του σιδήρου, η παραγωγή φυτοορμονών, η προστασία έναντι αβιοτικών πιέσεων (όπως αλατότητα και ξηρασία) καθώς και η προστασία από ένα σύνολο φυτοπαθογόνων οργανισμών (Hardoim et al., 2015; Khare et al., 2018; Lugtenberg & Kamilova., 2009; Vessey, 2003).

1.3.1 Απορρόφηση θρεπτικών στοιχείων

Εκτός των βακτηρίων που συμβάλλουν γενικά στη θρέψη των φυτών με την αποσύνθεση της οργανικής ύλης του εδάφους, ορισμένα βακτήρια παρέχουν συγκεκριμένα θρεπτικά συστατικά στα φυτά. Η απορρόφηση των μη βιοδιαθέσιμων θρεπτικών συστατικών, όπως είναι το άζωτο, ο φώσφορος και ο σίδηρος, αποτελεί τον καλύτερα μελετώμενο μηχανισμό δράσης των βακτηρίων που προάγουν άμεσα την ανάπτυξη των φυτών (Glick., 2012).

1.3.2 Σταθεροποίηση του αζώτου (N₂)

Το άζωτο (N) αποτελεί ένα θρεπτικό στοιχείο μεγάλης ζωτικής σημασίας για την ανάπτυξη και την αναπαραγωγή των φυτών (Ahemad & Kibret, 2014). Παρ' όλο που στην ατμόσφαιρα υπάρχει περίπου 78 % N₂, αυτό δεν είναι διαθέσιμο στα αναπτυγμένα φυτά. Το ατμοσφαιρικό άζωτο μετατρέπεται σε αφομοιώσιμη μορφή με τη βιολογική σταθεροποίησή του, όπου μετατρέπεται σε αμμωνία με τη βοήθεια βακτηρίων- σταθεροποιητών του αζώτου (Kim & Rees, 1994). Τα βακτήρια- σταθεροποιητές του αζώτου κατηγοριοποιούνται σε συμβιωτικά βακτήρια και μη- συμβιωτικά βακτήρια σταθεροποίησης του αζώτου. Τα συμβιωτικά βακτήρια που ονομάζονται ριζόβια, δημιουργούν συμβιωτική σχέση με τα ψυχανθή με τα πιο συχνά μελετώμενα βακτήρια να ανήκουν στα γένη *Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium*, and *Sinorhizobium*, παρέχοντας την απαραίτητη ποσότητα σταθεροποιημένου αζώτου στους ξενιστές τους (Mus et al., 2016; Vessey, 2003). Αντιθέτως, τα μη συμβιωτικά βακτήρια στα οποία ανήκουν τα βακτήρια των γενών *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Gluconoacetobacter* κ.α., είναι ελεύθερα βακτήρια τα οποία παρέχουν μόνο μια μικρή ποσότητα σταθεροποιημένου αζώτου σε σύγκριση με τις συνολικές απαιτήσεις των φυτών (Glick, 2012; James & Olivares, 1998). Η σταθεροποίηση του αζώτου πραγματοποιείται με το ενζυμικό σύμπλοκο της νιτρογενάσης (*Nif*), τα γονίδια του οποίου εμφανίζονται τόσο στα συμβιωτικά βακτήρια όσο και στις ελεύθερες μορφές αλληλεπίδρασης (Kim & Rees, 1994).

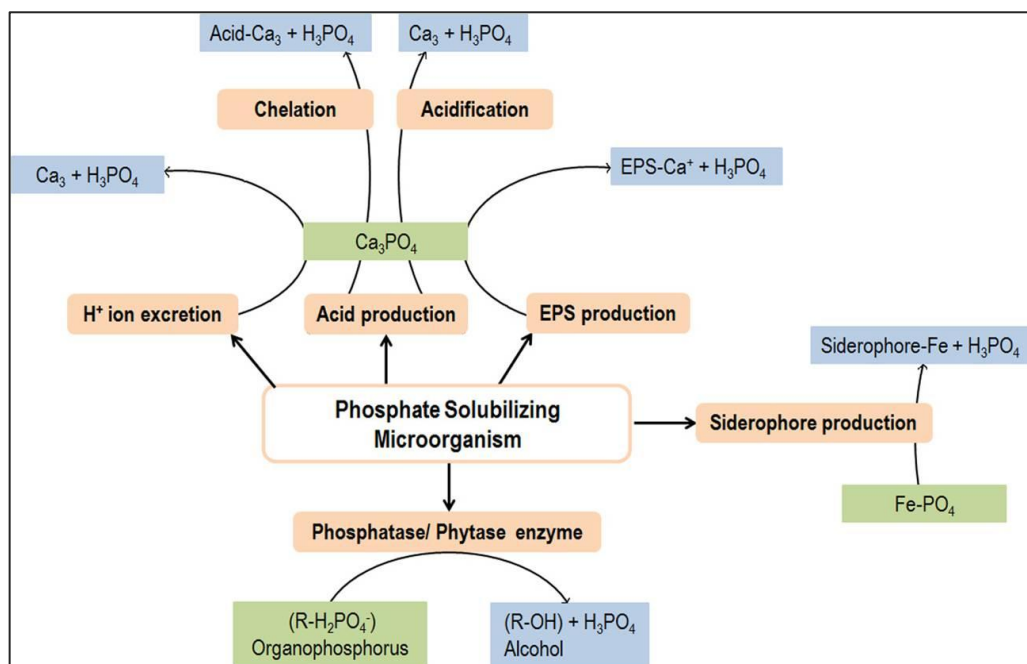
1.3.3 Διαλυτοποίηση του φωσφόρου (P)

Ο φώσφορος (P), αποτελεί ένα από τα πιο σημαντικά θρεπτικά στοιχεία για την ανάπτυξη των φυτών. Οι φωσφορικές ενώσεις του εδάφους ταξινομούνται σε τρεις βασικές κατηγορίες, σε διαλυτό ορθοφωσφορικό, σε αδιάλυτο οργανικό φωσφορικό και σε αδιάλυτο ανόργανο φωσφορικό (Prabhu et al., 2019). Παρά την αφθονία του στο έδαφος, ο φώσφορος βρίσκεται κυρίως σε μη αφομοιώσιμη μορφή, με το ορθοφωσφορικό ανιόν να αποτελεί τη μόνη αφομοιώσιμη μορφή για τα φυτά (Prabhu et al., 2019; Santoyo et al., 2019). Ταυτόχρονα, το μεγαλύτερο μέρος του διαλυτού ανόργανου P που εφαρμόζεται στο έδαφος με τη μορφή χημικού λιπάσματος, πολύ σύντομα μετά την εφαρμογή του μετατρέπεται σε μη διαθέσιμη μορφή εξαιτίας του χαμηλού pH του εδάφους (Glick, 2012; Khan et al., 2007). Η χαμηλή διαθεσιμότητα του P στα φυτά, είναι αποτέλεσμα του συμπλόκου που δημιουργείται μεταξύ του φωσφόρου και του ασβεστίου, σιδήρου ή αλουμινίου στο έδαφος, ενώ τα φυτά μπορούν να απορροφήσουν το P μόνο όταν βρίσκεται σε μορφή ορθοφωσφορικού ανιόντος (H_2PO_4^- και HPO_4^{2-}) (Bhattacharyya, & Jha, 2012; Chhabra et al., 2013).

Μετά το 1948 και την πρώτη αναφορά για την ικανότητα των μικροοργανισμών να διαλυτοποιούν τον αδιάλυτο ανόργανο φώσφορο, ένα πλήθος βακτηρίων έχουν ξεχωρίσει για αυτή τους την ικανότητα (Εικ. 1.3) (Pikovskaya et al., 1948). Τόσο τα ριζοσφαιρικά, όσο και τα ενδοφυτικά βακτήρια που φέρουν τους απαραίτητους μηχανισμούς για τη διαλυτοποίηση του αδιάλυτου φωσφόρου, μπορούν να εφαρμοσθούν αποτελεσματικά στις ρίζες των φυτών, αυξάνοντας τελικά τη βιοδιαθεσιμότητα και απορρόφηση του P (Emami et al., 2019; Glick, 2012; Varga et al., 2020). Μάλιστα, τα ενδοφυτικά βακτήρια μπορεί να παρουσιάζουν εμφανές πλεονέκτημα έναντι των ριζοσφαιρικών βακτηρίων. Σύμφωνα με τους Verga και συνεργάτες, ο P που προσλαμβάνεται από τα φυτά μπορεί πολύ σύντομα μετά την απορρόφησή του να δημιουργήσει εκ νέου αδιάλυτες μορφές P, με αποτέλεσμα τα ριζοσφαιρικά βακτήρια που τον διαλυτοποιούν αποκλειστικά εκτός του φυτού, να βρίσκονται σε μειονεκτική θέση έναντι των ενδοφυτικών (Verga et al., 2020). Συγκεκριμένα, τα ενδοφυτικά βακτήρια έχουν τη δυνατότητα να απελευθερώνουν συνεχώς τον απαραίτητο P για τα φυτά κατά την πορεία της ανάπτυξής τους (Verga et al., 2020).

Η διαλυτοποίηση του ανόργανου P από τα βακτήρια και η αφομοίωσή του από τα φυτά μπορεί να πραγματοποιηθεί με την παραγωγή χαμηλού μοριακού βάρους οργανικών οξέων, όπως είναι το γλυκονικό οξύ και το κιτρικό οξύ, την παραγωγή χηλικοποιητών όπως χουμικό οξύ, έμμεσα από την οξίνιση του μέσου με την απελευθέρωση κατιόντων υδρογόνου (H^+)

καθώς και την παραγωγή εξωπολυσακχαριτών (exopolysaccharide, EPS), ενώ η διαλυτοποίηση του οργανικού P μπορεί να πραγματοποιηθεί με σύνθεση βακτηριακών ενζύμων όπως οι φωσφατάσες οι οποίες υδρολύουν τους φωσφορικούς εστέρες (Otieno et al., 2015; Rodríguez & Fraga, 1999; Rodriguez et al., 2004; Winarso et al., 2011; Yi et al., 2008). Τα βακτήρια των γενών *Pseudomonas*, *Bacillus*, και *Rhizobium* αποτελούν τα πιο ευρέως διαδεδομένα και αποτελεσματικά γένη βακτηρίων που εφαρμόζονται για τη διαλυτοποίηση του φωσφόρου στο έδαφος.



Εικόνα 1.3 Μηχανισμοί διαλυτοποίησης οργανικού και ανόργανου φωσφόρου από μικροοργανισμούς (Prabhu et al., 2019).

1.3.4 Απορρόφηση του σιδήρου (Fe)

Ο σίδηρος (Fe) αποτελεί ένα από το πιο άφθονα στοιχεία στη φύση, ωστόσο δεν είναι βιοδιαθέσιμες όλες οι μορφές του (Santoyo et al., 2019). Ο τρισθενής σίδηρος (Fe^{3+}) είναι η πιο άφθονη αλλά ταυτόχρονα και η λιγότερο αφομοιώσιμη μορφή σιδήρου του εδάφους (Ma, 2005, Taylor & Konhauser, 2011). Τόσο οι μικροοργανισμοί όσο και τα φυτά έχουν πολύ υψηλές απαιτήσεις σε σίδηρο για ένα πλήθος μεταβολικών διεργασιών, με αποτέλεσμα η λήψη επαρκούς ποσότητας σιδήρου από τη ριζόσφαιρα να είναι ιδιαίτερα δύσκολη εξαιτίας του ανταγωνισμού που δημιουργείται μεταξύ του φυτού, των βακτηρίων αλλά και των μυκήτων (Guerinot & Yi, 1994; Loper & Buyer, 1991). Προκειμένου να αντισταθμισθεί η χαμηλή βιοδιαθεσιμότητα του σιδήρου, τα βακτήρια παράγουν χαμηλού μοριακού βάρους χηλικοποιητές (~ 400-1500 Da), τα σιδηροφόρα, τα οποία απορροφούν διάφορες μορφές οργανικού και ανόργανου σιδήρου από το έδαφος. Ταυτόχρονα, μπορεί να φέρουν και

κατάλληλους υποδοχείς στην κυτταρική μεμβράνη προκειμένου να συγκρατήσουν το σύμπλοκο Fe-σιδηροφόρο, διευκολύνοντας με αυτόν τον τρόπο την απορρόφηση του σιδήρου (Hider & Kong, 2010; Neilands, 1981; Saha et al., 2016). Η εφαρμογή ριζοσφαιρικών αλλά και ενδοφυτικών βακτηρίων που παράγουν σιδηροφόρα, παρουσιάζει σημαντικά οφέλη στην ανάπτυξη των φυτών, ενώ ταυτόχρονα τους παρέχει έμμεση προστασία έναντι ανταγωνιστικών φυτοπαθογόνων μυκήτων του εδάφους (Araújo et al., 2008; Chakraborty et al., 2006; Duijff et al., 1994; Kloepper et al., 1980; Mishra et al., 2011; Sharma et al., 2003; Jin et al., 2006; Vansuyt et al., 2007; Yu et al., 2011).

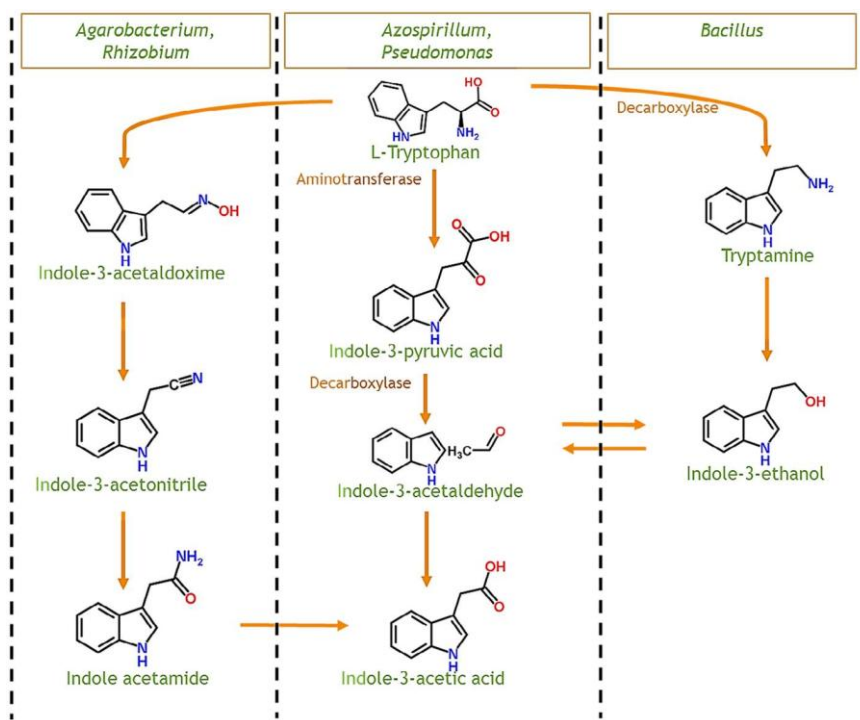
1.3.5 Ρύθμιση επιπέδων φυτοορμονών

Τόσο τα ριζοσφαιρικά όσο και τα ενδοφυτικά βακτήρια μπορούν να προκαλέσουν αλλαγή στη μορφολογία και φυσιολογία των φυτών, αυξάνοντας την επιφάνεια της ρίζας ή του υπέργειου μέρους των φυτών καθώς και το ρυθμό διαπνοής, επηρεάζοντας έτσι την απορρόφηση των θρεπτικών στοιχείων και την ανάπτυξη των φυτών. Οι φυτοορμόνες είναι οργανικές ενώσεις που λειτουργούν ως σηματοδοτικά μόρια και παίζουν καθοριστικό ρόλο στην ανάπτυξη και εξέλιξη των φυτών, ενώ ταυτόχρονα καθορίζουν και τις αποκρίσεις των φυτών στο περιβάλλον (Davies, 2004). Όταν τα φυτά εκτεθούν σε βιοτικές και αβιοτικές συνθήκες καταπόνησης οι οποίες επηρεάζουν την ανάπτυξή τους, προκειμένου να επιβιώσουν και να αντιμετωπίσουν τις αρνητικές επιπτώσεις, προσαρμόζουν το μεταβολισμό τους και το επίπεδο των ενδογενών ορμονών τους (Glick et al., 2007; Verma et al., 2016). Σε συνδυασμό με τις αποκρίσεις των φυτών, ένα πλήθος βακτηρίων που προάγουν την ανάπτυξη των φυτών (PGPB), παράγουν επίσης φυτοορμόνες επηρεάζοντας τα επίπεδα ορμονών των φυτών και τελικά την ανθεκτικότητά τους σε ακραίες περιβαλλοντικές συνθήκες (de Garcia Salamone et al., 2005; Glick et al., 2007).

1.3.5.1 Ινδολ-3-οξικό οξύ (IAA)

Μια από τις πιο καλά μελετημένες φυτοορμόνες που παράγεται τόσο από τα φυτά όσο και από τα βακτήρια είναι το ινδολ-3-οξικό οξύ (IAA). Η παραγωγή IAA στα φυτά διεγείρει την κυτταρική διαίρεση και βλαστικότητα των σπόρων, αυξάνει το ρυθμό ανάπτυξης του ξυλώματος και της ρίζας, ελέγχει τις διαδικασίες ανάπτυξης των φυτών όπως είναι ο σχηματισμός πλευρικών και νεοσχηματιζόμενων ριζών, ρυθμίζει τις αντιδράσεις των φυτών στο φως και τη βαρύτητα, επηρεάζει τη διαδικασία της φωτοσύνθεσης και τη βιοσύνθεση μεταβολιτών, ενώ προσδίδει ανθεκτικότητα σε διάφορες καταπονήσεις (Khan et al., 2011; Merzaeva & Shirokikh, 2010; Spaepen & Vanderleyden, 2011; Tsavkelova et al., 2006).

Η λειτουργία του βακτηριακού IAA τονίζει το γεγονός πως τα βακτήρια παράγουν αυτήν τη φυτοορμόνη προκειμένου να αλληλεπιδράσουν με τα φυτά ως μέρος της διαδικασίας αποικισμού τους. Ταυτόχρονα, αρκετές έρευνες έχουν δείξει πως το IAA λειτουργεί ως σηματοδοτικό μόριο των βακτηρίων και ως εκ τούτου επηρεάζει άμεσα τη φυσιολογία τους (Sraepen et al., 2007). Έχει βρεθεί ότι περίπου το 80% των βακτηρίων που έχουν απομονωθεί από την περιοχή της ριζόσφαιρας φυτικών καλλιεργειών, έχουν την ικανότητα να συνθέτουν και να εκκρίνουν αυξίνες, ως δευτερογενείς μεταβολίτες (Εικ. 1.4) (Loper & Schroth, 1986). Ταυτόχρονα μεγάλος αριθμός ενδοφυτικών βακτηρίων συνθέτουν και παράγουν τη φυτοορμόνη IAA και επηρεάζουν την ανάπτυξη και τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των φυτών (Khan et al., 2011; Merzaeva & Shirokikh, 2010). Η παραγωγή IAA από PGPB μπορεί είτε να επάγει είτε να καταστείλει τα επίπεδα ανάπτυξης των φυτών, γεγονός που εξαρτάται από το επίπεδο του παραγόμενου IAA καθώς και του αποθέματος IAA που υπάρχει στο εσωτερικό των φυτών (Glick et al., 2012). Ένα σημαντικό μόριο που ρυθμίζει το επίπεδο βιοσύνθεσης του IAA πολλών μικροοργανισμών είναι το αμινοξύ τρυπτοφάνη. Η τρυπτοφάνη, αποτελεί κύριο πρόδρομο μόριο του μονοπατιού του IAA, η παρουσία του οποίου αυξάνει την παραγωγή IAA των βακτηρίων (Idris et al., 2007; Naveed et al., 2015; Zaidi et al., 2009). Ταυτόχρονα, η επίδραση της συγκέντρωσης IAA που παράγεται από τα βακτήρια επηρεάζει διαφορετικά την ανάπτυξη των φυτών, ανάλογα από το φυτικό είδος και του είδους του βακτηρίου (Ahmad et al., 2005).



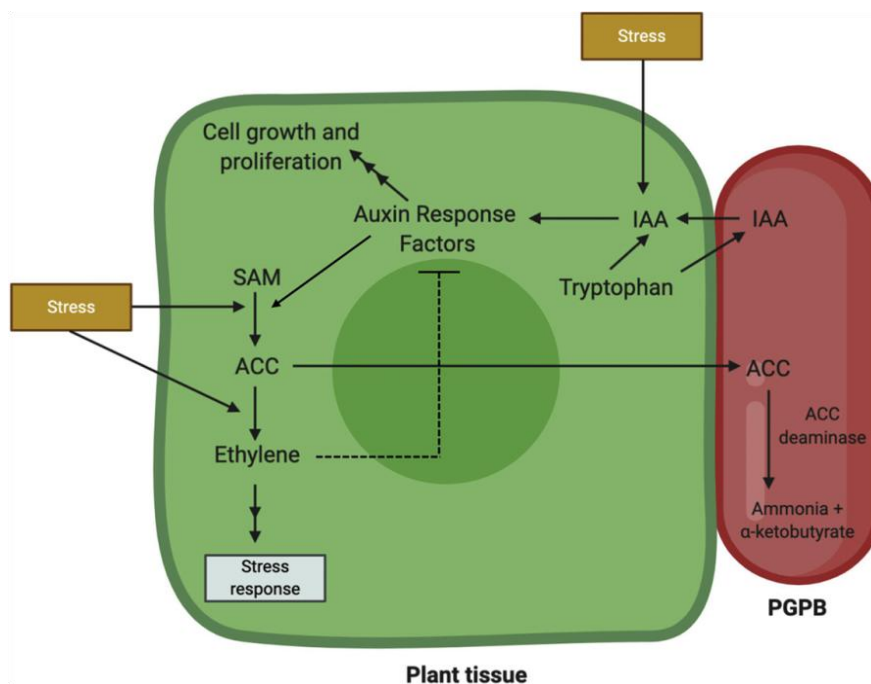
Εικόνα 1.4 Βιοσυνθετικό μονοπάτι παραγωγής ινδολ-3-οξικού οξέος (IAA) με πρόδρομη ένωση το αμινοξύ L-τρυπτοφάνη (L- tryptophan) για διαφορετικά γένη βακτηρίων (Goswami et al., 2016).

1.3.5.2 Αιθυλένιο

Το αιθυλένιο αποτελεί μια από τις πιο σημαντικές φυτοορμόνες, η οποία ρυθμίζει διάφορες πτυχές της ανάπτυξης των φυτών, όπως είναι η βλαστικότητα των σπόρων, η αντίδραση τους σε μηχανικές καταπονήσεις και τραυματισμούς, καθώς και η απόκριση τους σε διάφορες βιοτικές και αβιοτικές καταπονήσεις, συμπεριλαμβανομένων της έκθεσης σε περιβάλλοντα ρυπασμένα με βαρέα μέταλλα ή με ακραία επίπεδα θερμοκρασίας, αλατότητας και υγρασίας (Fujita et al., 2006; Santoyo et al., 2019). Όλες αυτές οι καταπονήσεις μπορούν να αυξήσουν τα επίπεδα παραγωγής αιθυλενίου στα φυτά και να οδηγήσουν σε πρόωρη γήρανση, χλώρωση των φύλλων, αποκοπή των ιστών και μείωση της αύξησης των ριζών (Glick et al., 1998; Santoyo et al., 2019).

Ένας μεγάλος αριθμός ωφέλιμων ριζοσφαιρικών (PGBR) και ενδοφυτικών (PGPEB) βακτηρίων που αλληλεπιδρούν με τα φυτά παράγουν το ένζυμο ACC απαμινάση (1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase), το οποίο έχει βρεθεί πως μειώνει σε σημαντικό βαθμό το παραγόμενο αιθυλένιο και κατ' επέκταση μειώνει τις επιπτώσεις του αυξημένου επιπέδου αιθυλενίου στα φυτά, ενώ αυξάνει την ανθεκτικότητα των φυτών σε συνθήκες υδατικής καταπόνησης και υψηλής αλατότητας (Chinnaswamy et al., 2018; Glick et al., 1998; Karthikeyan et al., 2012; Nadeem et al., 2007; Siddikee et al., 2011; Win et al., 2018). Σε συνθήκες υψηλής αλατότητας και ακραίων περιβαλλοντικών συνθηκών γίνεται αύξηση της μεταγραφής της ACC συνθάσης και ACC οξειδάσης αυξάνοντας τη συγκέντρωση αιθυλενίου που παράγεται από το φυτό (del Carmen Orozco-Mosqueda et al., 2020). Το ένζυμο ACC απαμινάση, υδρολύει την πρόδρομη ένωση για τη βιοσύνθεση του αιθυλενίου, ACC, καταβολίζοντάς τη σε α-κετοβουτιρικό οξύ και αμμωνία (Glick, 2012). Ταυτόχρονα με την υδρόλυση της ACC από το ένζυμο ACC απαμινάση και τη μείωση του επιπέδου αιθυλενίου στο φυτό, γίνεται η παραγωγή της φυτοορμόνης IAA από τα ωφέλιμα βακτήρια με αποτέλεσμα την ανάπτυξη των φυτών (Εικ. 1.5) (del Carmen Orozco-Mosqueda et al., 2020; Glick, 2014; Nascimento et al., 2018; Siddikee et al., 2010).

Επομένως, σπόροι ή ρίζες φυτών στα οποία έχουν εφαρμοστεί PGP βακτήρια που παράγουν το ένζυμο ACC απαμινάση, παρουσιάζουν αύξηση της βλαστικότητας τους, επιμήκυνση του ριζικού τους συστήματος, αύξηση του υπέργειου μέρους και της παραγωγής των φυτών, επαγωγή του σχηματισμού αζωτοδεσμευτικών φυματίων και βελτίωση της απορρόφησης απαραίτητων θρεπτικών στοιχείων (Glick, 2012, Nadeem et al., 2007; Shaharoon et al., 2008; Siddikee et al., 2011; Siddikee et al., 2015; Win et al., 2018).



Εικόνα 1.5 Σχηματική αναπαράσταση των ωφέλιμων βακτηρίων (PGPB) τα οποία παράγουν το ένζυμο ACC απαμινάση (1-aminocyclopropane-1-carboxylate, ACC) deaminase και ταυτόχρονα συνθέτουν την αυξητική φυτοορμόνη ινδολ-3-οξικό οξύ (indole-3-acetic acid, IAA) και πιθανώς επάγουν την ανάπτυξη των φυτών με το συνδυασμό των δύο αυτών μηχανισμών (del Carmen Orozco-Mosqueda et al., 2020).

Ένας πολύ μεγάλος αριθμός βακτηρίων που παράγει το ένζυμο ACC απαμινάση ανήκουν σε ένα ευρύ φάσμα γενών συμπεριλαμβανομένων των *Acinetobacter*, *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Serratia* και *Rhizobium* (Kang et al., 2010; Nadeem et al., 2007; Shaharoon et al., 2008; Siddikee et al., 2011; Win et al., 2018; Zahir et al., 2008; Zahir et al., 2009; Zhao et al., 2015).

1.3.5.3 Γιββερελλίνη (GA) και κυτοκίνη (CA)

Η γιββερελλίνη (GA) είναι φυτική ορμόνη η οποία ρυθμίζει μεγάλο εύρος αναπτυξιακών φαινομένων, όπως είναι η επιμήκυνση των κυττάρων και η βλαστικότητα των σπόρων (Santoyo et al., 2019). Η κυτοκίνη (CA) αποτελεί επίσης μια σημαντική φυτοορμόνη, η οποία επηρεάζει ένα πλήθος αναπτυξιακών φαινομένων συμπεριλαμβανομένων της κυτταρικής διαίρεσης, της επιμήκυνσης και ανάπτυξης του βλαστού, της πορείας ωρίμανσης και γήρανσης των φύλλων, τη κυριαρχία της κορυφής, της απορρόφηση απαραίτητων θρεπτικών συστατικών και του σχηματισμού φυματίων (Sasaki et al., 2014).

Ένα μεγάλο πλήθος ωφέλιμων ριζοσφαιρικών και ενδοφυτικών βακτηρίων μπορούν να παράγουν είτε γιββερελλίνες, είτε κυτοκίνες, είτε και τις δύο φυτοορμόνες (de Garcia Salamone et al., 2005; Gutiérrez-Mañero et al., 2001; Manoel da Silva et al. 2015; Shore & Sathisha, 2010). Από αρκετές μάλιστα έρευνες έχει βρεθεί ότι οι παραγόμενες φυτοορμόνες

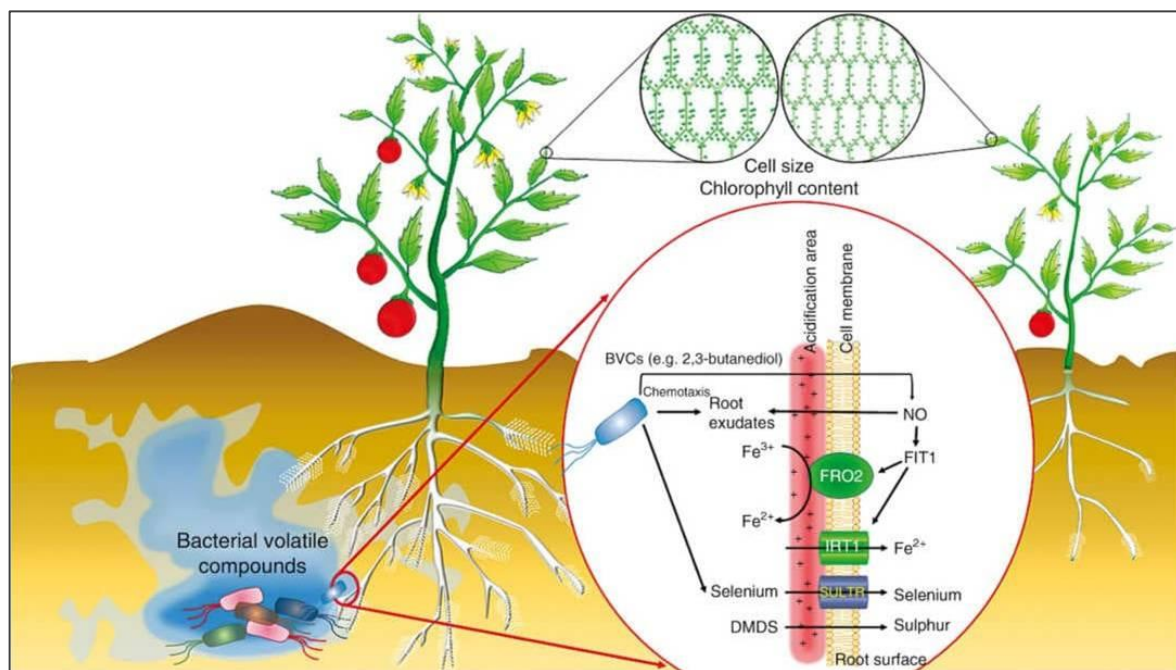
από ωφέλιμα βακτήρια επηρεάζουν τα αναπτυξιακά και τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των φυτών (Atzorn et al., 1988; Joo et al., 2005; Kang et al., 2009). Έως τώρα δεν έχει βρεθεί ο πλήρης μηχανισμός που ρυθμίζει την παραγωγή των φυτοορμονών GA και CA από ωφέλιμα βακτήρια, με αποτέλεσμα η γνώση μας για την επίδρασή τους στις αναπτυξιακές λειτουργίες των φυτών, να βασίζεται σε έρευνες που μελετούν τα φυσιολογικά και αναπτυξιακά χαρακτηριστικά των φυτών μετά από την εξωγενή εφαρμογή των καθαρών ορμονών (Glick, 2012; Karadeniz et al., 2006).

1.3.6 Παραγωγή βακτηριακών πτητικών ενώσεων (BVCs)

Οι παραγόμενες βακτηριακές πτητικές ενώσεις (Bacterial Volatile Compounds, BVCs) παρουσιάζουν πολλαπλές λειτουργίες οι οποίες επηρεάζουν άμεσα ή έμμεσα την ανάπτυξη των φυτών (Audrain et al., 2015). Το κάθε βακτηριακό στέλεχος συνθέτει ένα μίγμα πτητικών ενώσεων, το οποίο παίζει σημαντικό ρόλο στον κύκλο ζωής του βακτηρίου καθώς και την αλληλεπίδρασή του με τα φυτά. (Audrain et al., 2015; Bitas et al., 2013). Κάθε παραγόμενη πτητική ένωση μπορεί να επιτελέσει παραπάνω από μια λειτουργίες. Η πρώτη μελέτη που ανέδειξε το ρόλο των βακτηριακών πτητικών ενώσεων στην ανάπτυξη των φυτών πραγματοποιήθηκε από τους Ryu et al. (2003), παρουσιάζοντας τη θετική επίδραση των πτητικών οργανικών ενώσεων ακετοΐνη (3-υδροξυ-2-βουτανόνη) και της οξειδωμένης της μορφής 2,3-βουτανεδιόνη, στην ανάπτυξη του φυτού *Arabidopsis thaliana* (Ryu et al., 2003).

Οι πτητικές οργανικές ενώσεις (Volatile Organic Compounds, VOCs) διαχέονται σημαντικά τόσο στο έδαφος όσο και στο εσωτερικό των φυτών, παίζοντας σημαντικό ρόλο στα φυσιολογικά χαρακτηριστικά των φυτών (Sharifi & Ryu, 2018). Τα φυτά είτε απορροφούν ορισμένες VOCs ως πηγή θρεπτικών στοιχείων, είτε τις αντιλαμβάνονται ως χημικό σήμα από πλήθος οργανισμών συμπεριλαμβανομένων των βακτηρίων, των μυκήτων και των φυτών (Aziz et al., 2016; Bailly et al., 2014; Matsui, 2016; Meldau et al., 2013; Sharifi & Ryu, 2018; Zhou et al., 2016). Μέχρι σήμερα, έχουν βρεθεί πάνω από 1000 πτητικές οργανικές και ανόργανες ενώσεις, οι οποίες παράγονται από ωφέλιμα ριζοσφαιρικά και ενδοφυτικά βακτήρια (Audrain et al., 2015; Gao et al., 2017; Rojas-Solis et al., 2018). Οι ενώσεις αυτές μπορεί να εμπλέκονται στην κίνηση, το σχηματισμό βιοϋμενίου και την ανθεκτικότητα των βακτηρίων σε αντιβιοτικά, να δράσουν ως ρυθμιστές των παραγόντων μολυσματικότητας για τα παθογόνα βακτήρια (π.χ. αμμωνία), καθώς και να βελτιώσουν την ανάπτυξη και προστασία των φυτών (Audrain et al., 2015; Kim et al., 2013; Ryu et al., 2003; Sharifi & Ryu, 2016; Weise et al., 2013).

Ένας μεγάλος αριθμός βακτηριακών πτητικών ενώσεων, όπως είναι οι ακετοΐνη, 2,3-βουτανεδιόνη, αλβουτερόλη, 1,3-προπανοδιόλη, διμεθυλεξαδεκυλαμίνη (dimethylhexadecylamine, DMHDA), διμέθυλο δισουλφίδιο (dimethyl disulphide, DMDS) και ινδόλιο, έχουν μελετηθεί εκτενώς για την άμεση επίδρασή τους στα αναπτυξιακά χαρακτηριστικά των φυτών. Οι ενώσεις αυτές μπορούν να επιτελέσουν παραπάνω από μία λειτουργίες όπως είναι η επαγωγή της βλαστικότητας των σπόρων, η αύξηση της φυλλικής επιφάνειας, του αριθμού των φύλλων, της φυτικής βιομάζας και της συγκέντρωσης των φυτών σε χλωροφύλλη, η επαγωγή της πρώιμης ανθοφορίας, η αύξηση του αριθμού των ανθέων, καθώς και η βελτίωση της παραγωγής των φρούτων και των καρπών (Εικ. 1.6) (Asari et al., 2016; Bavaresco et al., 2020; Castulo-Rubio et al., 2015; Gopinath et al., 2015; Meldau et al., 2013; Rath et al., 2018; Rojas-Solis et al., 2018; Tahir et al., 2017; Velázquez-Becerra et al., 2011; Xie et al., 2009; Yu & Lee, 2013; Zhang et al., 2007).



Εικόνα 1.6 Σχηματική αναπαράσταση της επίδρασης των βακτηριακών παραγόμενων πτητικών ενώσεων (Bacterial Volatile Compounds, BVCs) στα αναπτυξιακά χαρακτηριστικά του φυτού (Sharifi & Ryu, 2018).

Παράλληλα, αρκετές βακτηριακές πτητικές ενώσεις, όπως είναι η DMHDA, το ινδόλιο και το DMDS, επηρεάζουν ταυτόχρονα και τα αναπτυξιακά χαρακτηριστικά του ριζικού συστήματος των φυτών. Ως αποτέλεσμα αυτού είναι η αύξηση του μήκους της κεντρικής ρίζας, του μήκους και του αριθμού των πλευρικών ριζών καθώς και της πυκνότητας των ριζικών τριχιδίων, με αποτέλεσμα να αυξάνει ο όγκος και η επιφάνεια εξάπλωσης της ρίζας (Bailly et al., 2014; Bavaresco et al., 2020; Chu et al., 2020; Tyagi et al., 2019). Η αύξηση της επιφάνειας της ρίζας βελτιώνει κατ' επέκταση τόσο την απορρόφηση των θρεπτικών

συστατικών του εδάφους όσο και τα επίπεδα υγρασίας των φυτών (Castulo-Rubio et al., 2015; Meldau et al., 2013; Wang et al., 2017).

Την ίδια στιγμή πολλές BVCs που επηρεάζουν την ανάπτυξη των φυτών, μπορούν είτε να λειτουργήσουν άμεσα ως ισχυροί αναστολείς της ανάπτυξης φυτοπαθογόνων μικροοργανισμών, όπως το υδροκυάνιο (HCN), η DMHDA και το DMDS, είτε να επάγουν τη διασυστηματική αντοχή των φυτών (Induced Systemic Resistance, ISR), όπως η 2,3-βουτανεδιόνη, η ακετοΐνη, το DMDS (Cho et al., 2008; Huang et al., 2012; Lee et al., 2012; Rojas-Solís et al., 2018; Rudrappa et al., 2010; Ryu et al., 2003; Zheng et al., 2013). Ο ISR μηχανισμός των φυτών αποτελεί τον κύριο μηχανισμό παρεμπόδισης των φυτοπαθογόνων μικροοργανισμών ως αποτέλεσμα της παραγωγής βακτηριακών πτητικών ενώσεων (Sharifi & Ryu, 2016).

1.4 Βιολογική αντιμετώπιση

Τα βακτήρια τα οποία μειώνουν τις επιπτώσεις ή τη σοβαρότητα της ασθένειας των φυτών, συχνά αναφέρονται ως παράγοντες βιολογικού ελέγχου (bio-control agents, BCAs) ή ως ανταγωνιστικά στελέχη αν παρουσιάζουν ανταγωνιστική δραστηριότητα εναντίον κάποιου φυτοπαθογόνου οργανισμού (Baker & Cook, 1974; Beattie, 2007). Η χρήση και εφαρμογή βακτηρίων ως παράγοντες βιολογικού ελέγχου για την αντιμετώπιση φυτικών ασθενειών, αποτελεί μια φιλική προς το περιβάλλον προσέγγιση και μια ισχυρή εναλλακτική επιλογή αντί της εφαρμογής χημικών συνθετικών φυτοπροστατευτικών σκευασμάτων. (Lugtenberg & Kamilova., 2009).

Η αντιμετώπιση των φυτοπαθογόνων οργανισμών συμπεριλαμβανομένων των μυκήτων, βακτηρίων, εντόμων και ζιζανίων, από τα ανταγωνιστικά βακτήρια μπορεί να πραγματοποιηθεί με ένα πλήθος άμεσων και έμμεσων μηχανισμών δράσης (Chattopadhyay et al., 2017; Fira et al., 2018; Flores-Vargas & O'hara, 2006; Gokturk et al., 2018; Liu, et al., 2017; Lugtenberg & Kamilova., 2009). Ο βιολογικός έλεγχος μπορεί να πραγματοποιηθεί με άμεση αντιμετώπιση των φυτοπαθογόνων οργανισμών όπως είναι η παραγωγή λυτικών ενζύμων, πτητικών ενώσεων (BVCs) και αντιμικροβιακών ενώσεων, είτε έμμεσα με τον ανταγωνισμό για θρεπτικά συστατικά ή την επαγωγή της διασυστηματικής αντοχής των φυτών (ISR) (Jadhav et al., 2017; Lugtenberg & Kamilova., 2009; Liu, et al., 2017; Pérez-Montaña et al., 2014; Rojas-Solís et al., 2018; Ryu et al., 2003).

1.4.1 Λυτικά ένζυμα

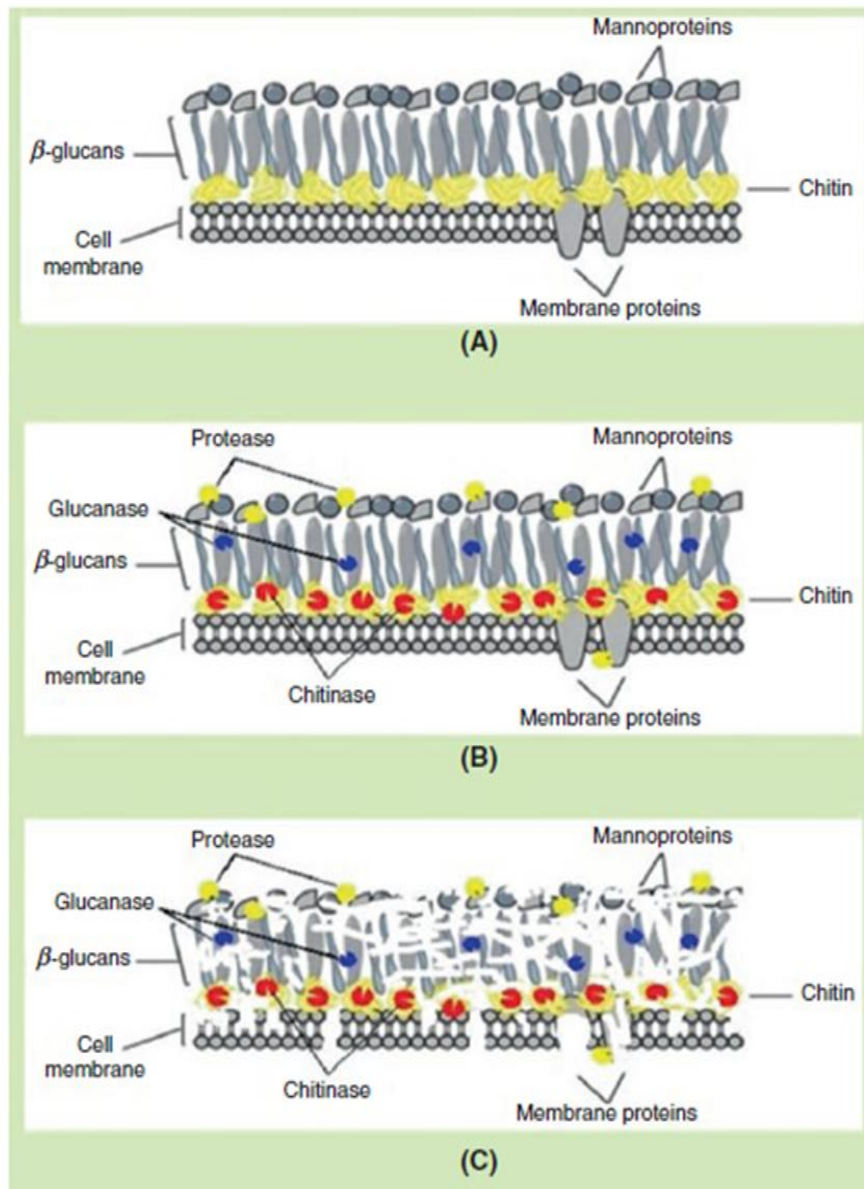
Η παραγωγή λυτικών ενζύμων αποτελεί έναν από τους πιο σημαντικούς μηχανισμούς βιολογικής αντιμετώπισης που εφαρμόζεται από τα ανταγωνιστικά βακτήρια εναντίον φυτοπαθογόνων μυκήτων (Shaikh & Sayyed, 2015; Villarreal-Delgado et al., 2018). Το κυτταρικό τοίχωμα των περισσότερων μυκήτων, συμπεριλαμβανομένων των φυτοπαθογόνων μυκήτων, αποτελείται από γλυκοπρωτεΐνες, πολυσακχαρίτες κυρίως χιτίνη, γλυκάνες, μαννάνες και γαλακτομαννάνες, καθώς και άλλα συστατικά, τα οποία διαφοροποιούνται ανάλογα με το είδος του μύκητα (Bowman & Free, 2006; Free, 2013; Vega & Kalkum, 2012; Villarreal-Delgado et al., 2018). Περίπου το 80% του κυτταρικού τοιχώματος αποτελείται από ένα μίγμα πολυσακχαριτών, το οποίο καθορίζει τα δομικά χαρακτηριστικά του κυτταρικού τοιχώματος, μέσω ενός εκτεταμένου δικτύου γλυκοσιδικών δεσμών (Jadhav et al., 2017; Latgé, 2007).

Το κυτταρικό τοίχωμα των περισσότερων φυτοπαθογόνων μυκήτων (εκτός των ωομυκήτων) αποτελείται κυρίως από χιτίνη, ένα γραμμικό χωρίς διακλαδώσεις πολυμερές που αποτελείται από β-1, 4-N-ακετυλο-γλυκοζαμίνη. Τα παραγόμενα λυτικά ένζυμα των ανταγωνιστικών βακτηρίων παρεμβαίνουν στο δίκτυο γλυκοσιδικών δεσμών αποδομώντας τελικά το κυτταρικό τοίχωμα των φυτοπαθογόνων μυκήτων (Jadhav et al., 2017) (Εικ. 1.7) Τα λυτικά ένζυμα που έχουν μελετηθεί εκτενέστερα μεταξύ εκείνων που παράγονται από τα ανταγωνιστικά βακτήρια είναι οι χιτινάσες, οι κυτταρινάσες, οι πρωτεάσες και οι β-1,3 γλουκανάσες, οι οποίες αποδομούν, διατρύπουν και τροποποιούν τη δομή του κυτταρικού τοιχώματος.

Με το μηχανισμό αυτό τα ανταγωνιστικά βακτήρια παρουσιάζουν ισχυρή λυτική δράση του κυτταρικού τοιχώματος, του βλαστικού σωλήνα (germ tube) και του άκρου των υφών (hyphal tips), προκαλούν μερική διόγκωση (swelling) των υφών και του άκρου των υφών οδηγώντας σε συστροφή και διάλυσή τους, ενώ αναστέλλουν τη βλαστικότητα και την επιμήκυνση των σπορίων (Akocak et al., 2015; Begum et al., 2008; Budi et al., 2000; Compant et al., 2005; Kim et al., 2003; Kim et al., 2008; Ordentlich et al., 1988; Yen et al., 2006).

Ένας σημαντικός αριθμός λυτικών ενζύμων παράγεται από πλήθος ανταγωνιστικών βακτηρίων που ανήκουν στα γένη *Bacillus*, *Enterobacter*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, *Serratia* και *Stenotrophomonas*. Τα λυτικά ένζυμα επηρεάζουν τα μορφολογικά χαρακτηριστικά και τη ζωτικότητα των μυκηλιακών υφών και των σπορίων σημαντικού

αριθμού φυτοπαθογόνων μυκήτων συμπεριλαμβανομένων των *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum truncatum*, *Sclerotium rolfii*, *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora* spp., *Pythium aphanidermatum*, *Pythium ultimum*, *Rhizoctonia solani* και *Sclerotium rolfii* (Begum et al., 2008; Compant et al., 2005; Kim et al., 2008; Ordentlich et al., 1988; Sindhu & Dadarwal, 2001; Someya et al., 2000).



Εικόνα 1.7 Μηχανισμοί υδρόλυσης κυτταρικού τοιχώματος μυκήτων. Α) Τυπική δομή κυτταρικού τοιχώματος μυκήτων. Β) Υδρόλυση χιτίνης, β - γλυκάνης και πρωτεϊνών με υδρολυτικά ένζυμα (χιτρινάση, γλυκανάση και πρωτεάση). Γ) Αποδόμηση του κυτταρικού τοιχώματος μετά την υδρόλυση (Jadhav et al., 2017).

1.4.2 Αντιβιοτικές ενώσεις

Οι αντιβιοτικές ενώσεις είναι δευτερογενείς μεταβολίτες και αποτελούν ετερογενείς ομάδες οργανικών ενώσεων χαμηλού μοριακού βάρους, οι οποίες παράγονται από μικροοργανισμούς και μπορούν ακόμη και σε χαμηλές συγκεντρώσεις να επηρεάσουν την

ανάπτυξη ή τη μεταβολική δράση άλλων μικροοργανισμών, όπως βακτήρια, μύκητες και ιούς (Raaijmakers & Mazzola, 2012; Thomashow & Weller, 1996). Τα περισσότερα βακτήρια συνθέτουν και εκκρίνουν περισσότερες από μια ενώσεις με αντιβιοτική δράση (Raaijmakers & Mazzola, 2012). Η σύνθεση ωστόσο των αντιβιοτικών ενώσεων επηρεάζεται από ένα σύνολο αβιοτικών παραγόντων, όπως είναι το επίπεδο οξυγόνου, η θερμοκρασία, το pH, οι πηγές αζώτου και άνθρακα, καθώς και τα ιχνοστοιχεία του εδάφους (Raaijmakers, 2002). Ταυτόχρονα, το φυτό ξενιστής, το είδος του παθογόνου, η γηγενής μικροχλωρίδα και η πυκνότητα των κυττάρων του ανταγωνιστικού στελέχους, παίζουν εξίσου καθοριστικό ρόλο στη σύνθεση των αντιβιοτικών, ως εξωγενείς βιοτικοί παράγοντες (Raaijmakers, 2002). Εξαιτίας της μακροχρόνης συμβίωσης και συνεξέλιξης των ενδοφυτικών βακτηρίων με το φυτό ξενιστή τους, οι φυσικοχημικές ιδιότητες των παραγόμενων δευτερογενών μεταβολιτών των ενδοφυτικών βακτηρίων επηρεάζονται από τους παραγόμενους δευτερογενείς μεταβολίτες των φυτών (Mohamad et al., 2018; Shurigin et al., 2018; Rustamova et al., 2020). Η βιοσύνθεση των δευτερογενών μεταβολιτών από ενδοφυτικά βακτήρια που προέρχονται από αρωματικά και φαρμακευτικά φυτά έχει ξεχωρίσει εξαιτίας των πολυδιάστατων ιδιοτήτων τους (Nasopoulou et al., 2014; Singh et al., 2017).

Η παραγωγή αντιμικροβιακών δευτερογενών μεταβολιτών με ευρύ πεδίο δράσης, έχει παρουσιαστεί από ισχυρά ανταγωνιστικά βακτήρια των γενών *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Stenotrophomonas*, *Streptomyces* και πολλά άλλα γένη (Köhl et al., 2019). Μεταξύ των ισχυρών BCA βακτηρίων, τα πιο διαδεδομένα είναι εκείνα των γενών *Bacillus* και *Pseudomonas*, με τα βακτήρια του γένους *Bacillus* να αποτελούν τα πιο επιτυχημένα εμπορικά στελέχη σε σκευάσματα βιολογικού ελέγχου (Pérez-García et al., 2011). Τα βακτήρια του γένους *Pseudomonas* συνθέτουν ένα σημαντικό αριθμό αντιβιοτικών ενώσεων όπως είναι οι φεναζίνες (phenazine), οι φλορογλυκινόλες (phloroglucinols), η πυολουτεορίνη (pyoluteorin), η πυρρολνιτρίνη (pyrrolnitrin) και τα λιποπεπτίδια (lipopeptides, LPs) (Raaijmakers & Mazzola, 2012). Αντίστοιχα, τα βακτήρια του γένους *Bacillus* παράγουν μεγάλο αριθμό δευτερογενών μεταβολιτών με αντιβιοτική δράση συμπεριλαμβανομένων των βακτηριοσινών, αντιμικροβιακών πεπτιδίων και λιποπεπτιδίων (iturin, fengycin, bacillomycin, surfactin) καθώς και πολυκετιδίων (bacillaene, marolactin, oxydifficidin) (Fira et al., 2018). Ιδιαίτερη έμφαση έχει δοθεί στη μελέτη των λιποπεπτιδίων που παράγονται από τα βακτηριακά στελέχη των δύο κυρίαρχων γενών, τη διαδικασία της βιοσύνθεσής τους καθώς και το ευρύ φάσμα των αντιμικροβιακών ιδιοτήτων τους.

1.4.2.1 Μη ριβοσωμικά πεπτίδια (NRPs) και λιποπεπτίδια (LPs)

Τα μη ριβοσωμικά πεπτίδια (Non Ribosomal Peptides, NRPs) και τα λιποπεπτίδια (Lipopeptides, LPs) αποτελούν μια εξαιρετικά ετερογενή ομάδα ενώσεων με εμφανή δομική ποικιλομορφία (από γραμμική ως κυκλική ή με διακλαδισμένη δομή), η οποία οφείλεται στη διαφορά του αριθμού και της διάταξης των αμινοξέων, της σύνθεσης και του αριθμού των λιπαρών οξέων και του διαφορετικού μήκους της ανθρακικής αλυσίδας (Fira et al., 2018; Raaijmakers et al., 2006; Raaijmakers et al., 2010).

Τα μη ριβοσωμικά πεπτίδια ή λιποπεπτίδια παράγονται τόσο από Gram θετικά όσο και Gram αρνητικά βακτήρια και αποτελούν μια ομάδα δευτερογενών μεταβολιτών με σημαντικές αντιμικροβιακές, σιδηροφόρες, αντικαρκινικές, ανοσοκατασταλτικές και επιφανειοδραστικές ιδιότητες (Raaijmakers et.al., 2010). Η δομική ποικιλομορφία που παρουσιάζεται μεταξύ των LPs που παράγονται από βακτήρια των γενών *Pseudomonas*, *Bacillus* και άλλων ανταγωνιστικών γενών, καθορίζει σημαντικά τις βιολογικές δράσεις των μεταβολιτών, ξεχωριστά για κάθε βακτήριο (Raaijmakers et.al., 2010). Από τις κυριότερες λειτουργίες στις οποίες εμπλέκονται τα LPs είναι η ισχυρή ανταγωνιστική δράση εναντίον πλήθους οργανισμών, η επαγωγή της κινητικότητας των βακτηρίων, ο σχηματισμός βιοϋμενίων και η επαγωγή της διασυστηματικής αντοχής των φυτών (Aleti et al., 2016; Chowdhury et al., 2015; Henry et al., 2011; Jourdan et al., 2009; Ma et al., 2016; Ongena et al., 2007; Raaijmakers et.al., 2010; Rodríguez et al., 2018; Tran et al., 2007).

Τα λιποπεπτίδια είναι ισχυρές αμφίφυλες επιφανειοδραστικές ενώσεις οι οποίες μειώνουν την επιφανειακή τάση μεταξύ του υποστρώματος και του βακτηριακού κυττάρου, ευνοώντας έτσι την κινητικότητα και την επιφανειακή προσκόλληση των βακτηρίων, ενώ ταυτόχρονα παίζουν καθοριστικό ρόλο στο σχηματισμό των βιοϋμενίων (Kearns, 2010; Raaijmakers et.al., 2010). Η βιοσύνθεση των λιποπεπτιδίων πραγματοποιείται κυρίως μέσω των μη ριβοσωμικών πεπτιδικών συνθετασών (Non- Ribosomal Peptide Synthetases, NRPSs), οι οποίες αποτελούν ένα μεγάλο πολυσύνθετο σύμπλοκο ενζύμων με διαδοχικές ενότητες (modules) ενσωμάτωσης των αμινοξέων, τα οποία παράγουν γραμμικά ή κυκλικά πεπτίδια (Baltz, 2014). Ωστόσο, κάποια μέλη λιποπεπτιδίων της οικογένειας των iturin, παρουσιάζουν ένα σύνθετο βιοσυνθετικό μονοπάτι, στο οποίο συμμετέχουν τόσο οι πολυκετιδικές συνθάσες (Polyketide Synthases, PKSs), όσο και οι συνθετάσες των λιπαρών οξέων, από το οποίο προκύπτει το μονοπάτι μη ριβοσωμικής/ πολυκετιδικής σύνθεσης των πεπτιδίων (NRPS/PKS) (Duitman et al., 1991; Hansen et al., 2007). Τα κυκλικά λιποπεπτίδια (Cyclic

lipopeptides, CLPs) είναι ολιγοπεπτίδια τα οποία αποτελούνται από μια λιπιδιακή ουρά, η οποία συνδέεται με ένα γραμμικό ή κυκλικό ολιγοπεπτίδιο και κυκλοποιείται από το σχηματισμό ενός λακτονικού δακτυλίου μεταξύ δύο αμινοξέων της πεπτιδικής αλυσίδας (van de Mortel et al., 2009). Ωστόσο, η ποικιλομορφία των CLPs οφείλεται στις διαφορές του αριθμού των λιπαρών οξέων, του αριθμού και της διάταξης των αμινοξέων καθώς και της οργάνωσης του λακτονικού δακτυλίου (Raaijmakers et.al., 2010).

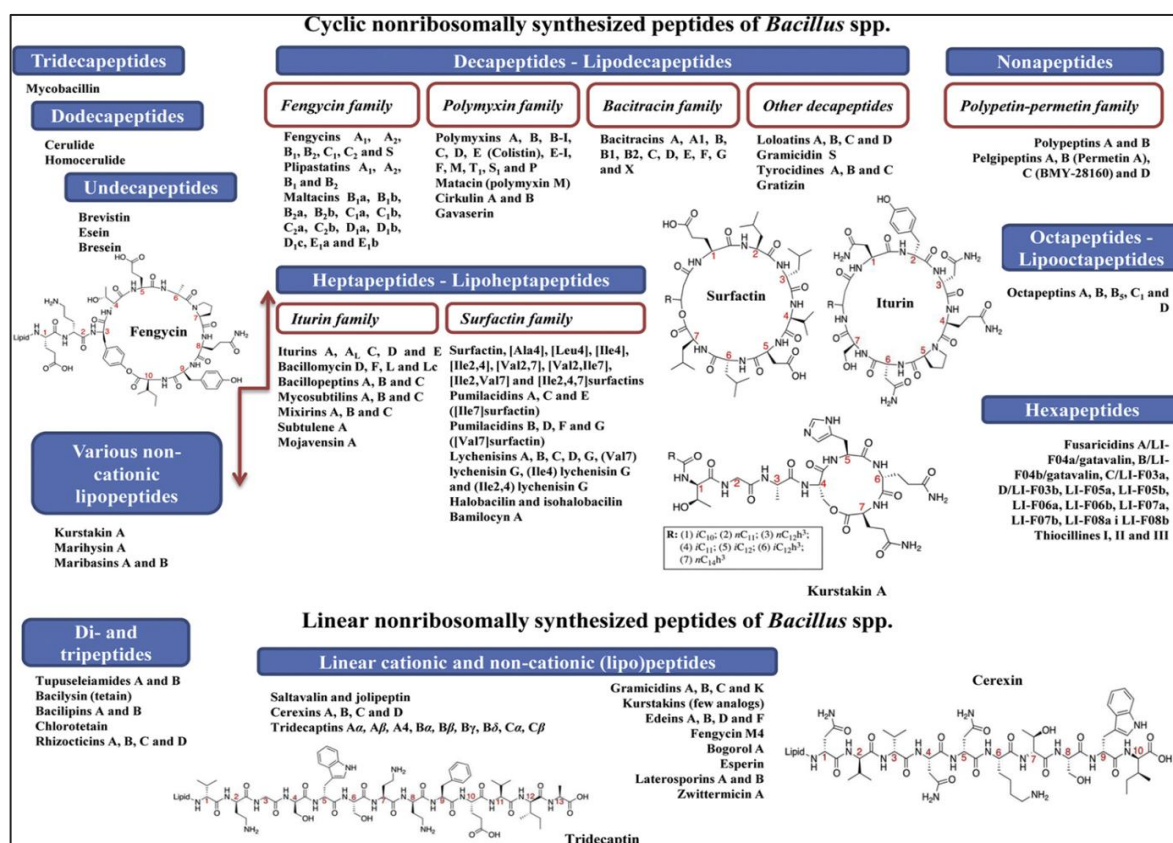
Βάσει των παραπάνω δομικών χαρακτηριστικών έχει βρεθεί μεγάλος αριθμός διαφορετικών CLPs που παράγονται από τα βακτήρια του γένους *Pseudomonas* όπως, τα viscosin, amphisin, tolaasin, syringomycin, arthrofactin, putisolvins I και II, orfamide, pseudodesmin A και B και massetolide A (Raaijmakers et.al., 2010) (Εικ. 1.8).

Group/Name	Structure
Viscosin^A	
Viscosin	FA-β-OH-L-Leu-D-Glu-D-σThr-D-Val-L-Leu-D-Ser-L-Leu-D-Ser-L-Ile
Viscosinamide	FA-β-OH-L-Leu-D-Gln-D-σThr-D-Val-L-Leu-D-Ser-L-Leu-D-Ser-L-Ile
Massetolide A	FA-β-OH-L-Leu-D-Glu-D-σThr-D-αIle-L-Leu-D-Ser-L-Leu-D-Ser-L-Ile
Pseudophomin A	FA-β-OH-L-Leu-D-Glu-D-σThr-D- Ile-D-Leu-D-Ser-L-Leu-D-Ser-L-Ile
Pseudodesmin A	FA-β-OH-L-Leu-D-Gln-D-σThr-D-Val-D-Leu-D-Ser-L-Leu-D-Ser-L-Ile
Syringomycin^B	
Syringomycin A	FA-β-OH-L-Ser-D-Ser-D-Dab-L-Dab-L-Arg-L-Phe-Z-Dhb-L-Asp _(3-OH) -L-Thr _(4-CI)
Syringostatin A	FA-β-OH-L-Ser-D-Dab-L-Dab-D-Hse-L-Orn-L-σThr-Z-Dhb-L-Asp _(3-OH) -L-Thr _(4-CI)
Syringotoxin B	FA-β-OH-L-Ser-D-Dab-L-Gly-D-Hse-L-Orn-L-σThr-Z-Dhb-L-Asp _(3-OH) -L-Thr _(4-CI)
Pseudomycin A	FA-β-OH-L-Ser-D-Dab-L-Asp-D-Lys-L-Dab-L-σThr-Z-Dhb-L-Asp _(3-OH) -L-Thr _(4-CI)
Cornycin A	FA-β-OH-L-Ser-D-Orn-L-Asn-D-Hse-L-His-L-σThr-Z-Dhb-L-Asp _(3-OH) -L-Thr _(4-CI)
Amphisin^A	
Arthrofactin	FA-β-OH-D-Leu-D-Asp-D-σThr-D-Leu-D-Leu-D-Ser-L-Leu-D-Ser-L-Ile-L-Ile-L-Asp
Amphisin	FA-β-OH-D-Leu-D-Asp-D-σThr-D-Leu-D-Leu-D-Ser-L-Leu-D-Gln-L-Leu-L-Ile-L-Asp
Lokisin	FA-β-OH-D-Leu-D-Asp-D-σThr-D-Leu-D-Leu-D-Ser-L-Leu-D-Ser-L-Leu-L-Ile-L-Asp
Pholipeptin	FA-β-OH-D-Leu-L-Asp-L- Thr-D-Leu-D-Leu-D-Ser-D-Leu-D-Ser-D-Leu-L-Ile-D-Asp
Tensin	FA-β-OH-D-Leu-D-Asp-D-σThr-D-Leu-D-Leu-D-Ser-L-Leu-D-Gln-L-Leu-L-Ile-L-Glu
Putisolvin^C	
Putisolvin I	CH ₃ (CH) ₄ CO-D-Leu-D-Glu-D-Leu-D-Ile-D-Gln-D-Ser-D-Val-D-Ile-D-Ser-L-Leu-L-Val-X-Ser
Putisolvin II	CH ₃ (CH) ₄ CO-D-Leu-D-Glu-D-Leu-D-Ile-D-Gln-D-Ser-D-Val-D-Ile-D-Ser-L-Leu-L-XIe-X-Ser
Tolaasin^A	
Tolaasin I	FA-β-OH-Dhb-Pro-Ser-Leu-Val-Ser-Leu-Val-Val-Gln-Leu - - - Val-Dhb-σThr-Ile-Hse-Dab-Lys
Fuscopeptin	FA-β-OH-Dhb-Pro-Leu-Ala-Ala-Ala-Ala-Val-Gly-Ala-Val-Ala - - - Val-Dhb-σThr-Ala-Dab-Dab-Phe
Corpeptin	FA-β-OH-Dhb-Pro-Ala-Ala-Ala-Val-Val-Dhb-Hse-Val-αIle-Dhb-Ala-Ala-Ala-Val-Dhb-σThr-Ala-Dab-Ser-Ile

Εικόνα 1.8 Πρωτοταγής δομή αντιπροσωπευτικών λιποπεπτιδίων (LPs) των βακτηρίων του γένους *Pseudomonas* spp. (Roongsawang et al., 2011).

Αντίστοιχα, τα αντιμικροβιακά λιποπεπτίδια του γένους *Bacillus* ταξινομούνται σε τρεις βασικές οικογένειες λιποπεπτιδίων, τις iturin, surfactin και fengycin. Κάθε μία από τις παραπάνω οικογένειες κυκλικών λιποπεπτιδίων, έχει αρκετές ισομερείς μορφές, οι οποίες παρουσιάζουν ίδιο μήκος πεπτιδικής αλυσίδας αλλά διαφορετικά υπολείμματα αμινοξέων σε κάθε θέση, καθώς και διαφορετικό μήκος και ισομέρεια της αλυσίδας των λιπαρών οξέων, δημιουργώντας έτσι σημαντική δομική ετερογένεια μεταξύ τους (Ongena & Jacques, 2008). Έτσι, η οικογένεια surfactin αντιπροσωπεύεται από πεπτίδια επτά αμινοξέων τα οποία συνδέονται σε ένα β-υδροξυλιωμένο λιπαρό οξύ που αποτελείται από δεκατρία με δεκαέξι άτομα άνθρακα (C₁₃-C₁₆) και περιλαμβάνει τις ισομερείς μορφές surfactin, pumilacidin,

lychenisin και halobacilin (Hu et al., 2019). Οι πιο αντιπροσωπευτικές ενώσεις της οικογένειας iturin είναι οι iturin A, C, D και E και οι ισομερείς ενώσεις mycosubtilin και bacillomycin. Τα κυκλικά λιποπεπτίδια της οικογένειας των iturin, έχουν επίσης μια πεπτιδική αλυσίδα επτά αμινοξέων που είναι προσαρτημένα στο β-άμινο λιπαρό οξύ που αποτελείται από δεκατέσσερα με δεκαεπτά άτομα άνθρακα (C₁₄-C₁₇) (Hu et al., 2019; Raaijmakers et.al., 2010). Η οικογένεια της fengycin αντιπροσωπεύεται κυρίως από ισομερείς ενώσεις των fengycin, plipastatin και maltacin. Αυτά τα κυκλικά λιποπεπτίδια αποτελούνται από δέκα αμινοξέα στη πεπτιδική τους αλυσίδα, τα οποία συνδέονται στο β-υδροξυλιωμένο λιπαρό οξύ που αποτελείται από συνολικό αριθμό ατόμων άνθρακα μεταξύ δεκατεσσάρων και δεκαοκτώ (C₁₄-C₁₈) (Hu et al., 2019; Raaijmakers et.al., 2010) (Εικ. 1.9).



Εικόνα 1.9 Μη ριβοσωμικά πεπτίδια και λιποπεπτίδια των βακτηρίων του γένους *Bacillus* spp. (Fira et al., 2018).

1.4.2.1.1 Αντιμικροβιακή δράση των LPs

Ο μηχανισμός που είναι υπεύθυνος για την αντιμικροβιακή δράση των LPs σχετίζεται με την αμφίφιλη φύση τους και με την ικανότητά τους να αλληλεπιδρούν με την κυτταρική μεμβράνη των οργανισμών στόχων (Fira et al., 2018). Τα LPs των βακτηρίων των γενών *Pseudomonas* και *Bacillus* εμφανίζουν σημαντική λυτική όσο και ανασταλτική δράση εναντίον πλήθους μικροοργανισμών, συμπεριλαμβανομένων των ιών, μυκοπλασμάτων, βακτηρίων, μυκήτων και ωομυκήτων (Raaijmakers et.al., 2010).

Πολλά ανταγωνιστικά βακτήρια του γένους *Pseudomonas* παράγουν σημαντικό αριθμό ενεργών LPs τα οποία επηρεάζουν τη μορφολογία και τη φυσιολογία των κυττάρων στόχων (Raaijmakers et.al., 2010). Τα CLPs των ομάδων tolaasin και syringomycin λειτουργούν ως κυτταρικές τοξίνες με το σχηματισμό πόρων ή σιράγγων εναντίον του κυττάρου στόχου (Nielsen et al., 2005). Τα LPs της ομάδας των viscosin αντιβιοτικών (viscosinamide και pseudodesmin), επηρεάζουν σημαντικά τη μορφολογία των φυτοπαθογόνων μυκήτων με την παραμόρφωση των μυκηλιακών υφών, ή/και την αποσύνθεση των μυκήτων *Rhizoctonia solani* και *Pythium myriotylum*, ενώ μετά από ανάλογη εφαρμογή του WLIP της ομάδας των viscosin, παρατηρείται πλήρης λύση των κυττάρων και των δύο παθογόνων μυκήτων (Oni et al., 2020). Σημαντικός αριθμός CLPs των ομάδων tolaasin, syringomycin, viscosin και putisolvin, επιδρά εντός των κυτταρικών μεμβρανών του κυττάρου στόχου, σχηματίζοντας πόρους, ικανούς να οδηγήσουν σε κυτταρική λύση (Raaijmakers et.al., 2010). Σε πειράματα που πραγματοποιήθηκαν με CLPs της ομάδας των λιποπεπτιδίων viscosin (viscosin, viscosinamide και massetolide A), putisolvins και orfamide A, παρατηρείται η σημαντική επίδραση τους εναντίον των φυτοπαθογόνων ωομυκήτων *Phytophthora* και *Pythium*. Προκαλείται άμεση αναστολή της κινητικότητας των ζωοσπορίων και λύση των κυττάρων τους με το σχηματισμό διαμεμβρανικών πόρων (De Bruijn et.al., 2007; Van de Mortel et.al., 2009). Ταυτόχρονα, από την εφαρμογή των LPs viscosinamide και massetolide A, παρατηρείται η εμφάνιση διογκώσεων στις μυκηλιακές υφές, με ταυτόχρονη μείωση του ξηρού βάρους του μυκηλίου και ιδιαίτερη αύξηση των διακλαδώσεων των υφών (Van de Mortel et.al., 2009).

Τα LPs που παράγονται από τα βακτήρια του γένους *Bacillus* έχουν παρουσιάσει ιδιαίτερο ενδιαφέρον για την αντιμικροβιακή τους δράση. Τα LPs επιδρούν σημαντικά στη φυσιολογία και μορφολογία πολλών φυτοπαθογόνων μυκήτων προκαλώντας το σχηματισμό πόρων στην κυτταρική μεμβράνη, αναστέλλουν την ενίσχυση του κυτταρικού τοιχώματος, ενώ μπορούν να επηρεάσουν την πρόσφυση των μικροοργανισμών.

Τα λιποπεπτίδια της οικογένειας surfactin είναι πολύ ισχυρές επιφανειοδραστικές ενώσεις που αλληλεπιδρούν με τη λιπιδική διπλοστοιβάδα και κατά συνέπεια παρεμβαίνουν στη δομή της μεμβράνης με διαφορετικό τρόπο ανάλογα με τη συγκέντρωση του αντιβιοτικού. Οι υψηλές συγκεντρώσεις των λιποπεπτιδίων προκαλούν το μη αναστρέψιμο σχηματισμό πόρων και οδηγούν στη συνέχεια στην πλήρη κατάρρευση και διαλυτοποίηση της λιπιδικής διπλοστοιβάδας (Ongena & Jacques, 2008). Η ενσωμάτωση του λιποπεπτιδίου surfactin στην κυτταρική μεμβράνη ξεκινά με την υδρόφοβη αλληλεπίδραση μεταξύ των λιπαρών οξέων και

της υδρογονανθρακικής αλυσίδας των φωσφολιπιδίων της μεμβράνης, γεγονός που αποσταθεροποιεί τη δομή της μεμβράνης. Έπειτα ακολουθούν διαμορφωτικές αλλαγές στο κυκλικό τμήμα του πεπτιδίου του λιποπεπτιδίου surfactin, το οποίο διευκολύνει την ενσωμάτωση του στην κυτταρική μεμβράνη (Maget-Dana & Ptak, 1995). Σύμφωνα με το μηχανισμό δράσης του λιποπεπτιδίου, πραγματοποιείται αφυδάτωση των πολικών κεφαλών των φωσφολιπιδίων της μεμβράνης, διασπάται η διπλοστοιβάδα, με αποτέλεσμα να χάνεται το κυτταρικό περιεχόμενο (Carrillo et al., 2003). Πολλά ισόμορφα λιποπεπτίδια της οικογένειας surfactin παρουσίασαν σημαντικές αντι-βακτηριακές, αντι-μυκητιακές και αντι-ιικές ιδιότητες. Συγκεκριμένα, καταστέλλουν πλήθος παθογόνων βακτηρίων συμπεριλαμβανομένων των *Acidovorax citrulli*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, καθώς και των φυτοπαθογόνων μυκήτων *Aspergillus flavus*, *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium oxysporum*, *F. moniliforme*, *F. solani*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Zymoseptoria tritici* (Bais et al., 2004; Fan et al., 2017; Fernandes et al., 2007; Le Mire et al., 2018; Li et al., 2014; Luo et al., 2015; Mohammadipour et al., 2009; Sarwar et al., 2018).

Η ανταγωνιστικότητα των κυκλικών λιποπεπτιδίων της οικογένειας iturin παρουσιάζει διαφορετικό μηχανισμό δράσης. Η δράση τους βασίζεται στο σχηματισμό ιοντικών πόρων και όχι στη διάσπαση και διαλυτοποίηση της κυτταρικής μεμβράνης (Aranda et al., 2005). Τα LPs επιδρούν στα φυσιολογικά χαρακτηριστικά των μυκήτων, οι οποίοι παρουσιάζουν διάτρηση των σπορίων τους, χαμηλή βλαστικότητα, καθώς και τραυματισμένες, παραμορφωμένες και διογκωμένες υφές (Chitarra et al., 2003; Lin et al., 2010). Συγκεκριμένα, τα LPs της οικογένειας iturin (iturin A, bacillomycin C, bacillomycin D) αναχαιτίζουν σημαντικό αριθμό φυτοπαθογόνων μυκήτων συμπεριλαμβανομένων των *Aspergillus flavus*, *Colletotrichum dematium*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium oxysporum*, *Gloeosporium gloeosporioides*, *Penicillium roqueforti*, *Phomopsis* sp., *Podosphaera fusca*, *Rhizoctonia solani*, καθώς και εναντίον των βακτηρίων *Pectobacterium carotovorum*, *Pseudomonas syringae* και *Xanthomonas campestris* (Chitarra et al., 2003; Cho et al., 2003; Dimkić et al., 2017; Gong et al., 2015; Kita et al., 2005; Moyne et al., 2001; Romero et al., 2007; Yu et al., 2002; Zerrouh et al., 2011).

Τα λιποπεπτίδια της οικογένειας fengycin αλληλεπιδρούν επίσης με την κυτταρική μεμβράνη του μικροοργανισμού στόχου, προκαλώντας αλλαγή στη δομή και τη διαπερατότητά της (Deleu et al., 2008). Συγκεκριμένα, αλυσίδα λιπαρών οξέων του

λιποπεπτιδίου διαπερνά την κυτταρική μεμβράνη, ενώ το κυκλικό πεπτιδίο προεξέχει με αποτέλεσμα να προκαλείται αύξηση του όγκου της μεμβράνης (Deleu et al., 2008). Σε μεγάλες συγκεντρώσεις μάλιστα, αυξάνεται ο σχηματισμός πόρων που μπορεί να οδηγήσει σε πλήρη διάλυση της κυτταρικής μεμβράνης και διάχυση του κυτταρικού περιεχομένου του, ενώ σε χαμηλές συγκεντρώσεις παρατηρείται αναποτελεσματικότητα της δράσης της μεμβράνης (Deleu et al., 2008; Patel et al., 2011). Τα LPs της οικογένειας fengycin επιδρούν σημαντικά σε μεγάλο αριθμό φυτοπαθογόνων μυκήτων όπως οι *Botrytis cinerea*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium oxysporum*, *Monilinia* spp., *Penicillium digitatum*, *Podosphaera fusca* και *Rhizoctonia solani*, καθώς και παθογόνων βακτηρίων όπως τα *Clavibacter michiganensis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Xanthomonas axonopodis* (Guo et al., 2014; Hanif et al., 2019; Hu et al., 2007; Luo et al., 2015; Medeot et al., 2020; Mora et al., 2015; Romero et al., 2007; Touré et al., 2004; Waewthongrak et al., 2015; Yáñez-Mendizábal et al., 2012).

1.4.2.1.2 Μη ριβοσωμικές πεπτιδικές συνθετάσες (NRPS)

Τα βακτήρια του γένους *Bacillus* και *Pseudomonas* παράγουν ένα σημαντικό αριθμό λιποπεπτιδίων (LPs), η βιοσύνθεση των οποίων πραγματοποιείται κυρίως μέσω των μη ριβοσωμικών πεπτιδικών συνθετασών (Non Ribosomal Peptide Synthetases, NRPSs). Οι NRPS διαθέτουν ένα μεγάλο πολυσύνθετο σύμπλοκο ενζύμων με διαδοχικές δομικές μονάδες (modules) ενσωμάτωσης των αμινοξέων στην πεπτιδική αλυσίδα (Baltz, 2014; Gewolb, 2002; Sieber & Marahiel, 2005). Τις περισσότερες φορές η διάταξη και ο αριθμός των δομικών μονάδων μιας NRPS είναι συγγραμμική με την αλληλουχία των αμινοξέων της πεπτιδικής αλυσίδας των λιποπεπτιδίων. Οι δομικές μονάδες μπορούν περαιτέρω να υποδιαιρεθούν σε μονάδες έναρξης και επιμήκυνσης της διαδικασίας (Finking και Marahiel, 2004). Οι μονάδες έναρξης για τη σύνθεση των λιποπεπτιδίων, αποτελούνται συνήθως από μια δομή αδενυλίωσης (A), η οποία είναι υπεύθυνη για την αναγνώριση και την ενεργοποίηση των αμινοξέων, μια δομή θειολίωσης (T ή PCP), η οποία ρυθμίζει τη θειοεστεροποίηση του ενεργοποιημένου αμινοξέος και τέλος μια δομή συμπύκνωσης (C), η οποία καταλύει την N-ακυλίωση του πρώτου αμινοξέος του λιποπεπτιδίου, συνδέοντας έτσι τη λιπιδιακή αλυσίδα με το ολογοπεπτιδίο (Konz et al., 1999; Raaijmakers et al., 2010; Roongsawang et al., 2005). Οι μονάδες επιμήκυνσης έχουν και τις τρεις δομές A, T και C, με τη δομή συμπύκνωσης C να είναι υπεύθυνη για το σχηματισμό ενός πεπτιδικού δεσμού μεταξύ δύο γειτονικών αμινοξέων, για την επιμήκυνση της πεπτιδικής αλυσίδας (Raaijmakers et al., 2010). Αυτές οι δομές παράγουν ένα γραμμικό λιποπεπτιδίο το οποίο κυκλοποιείται και απελευθερώνεται από μια

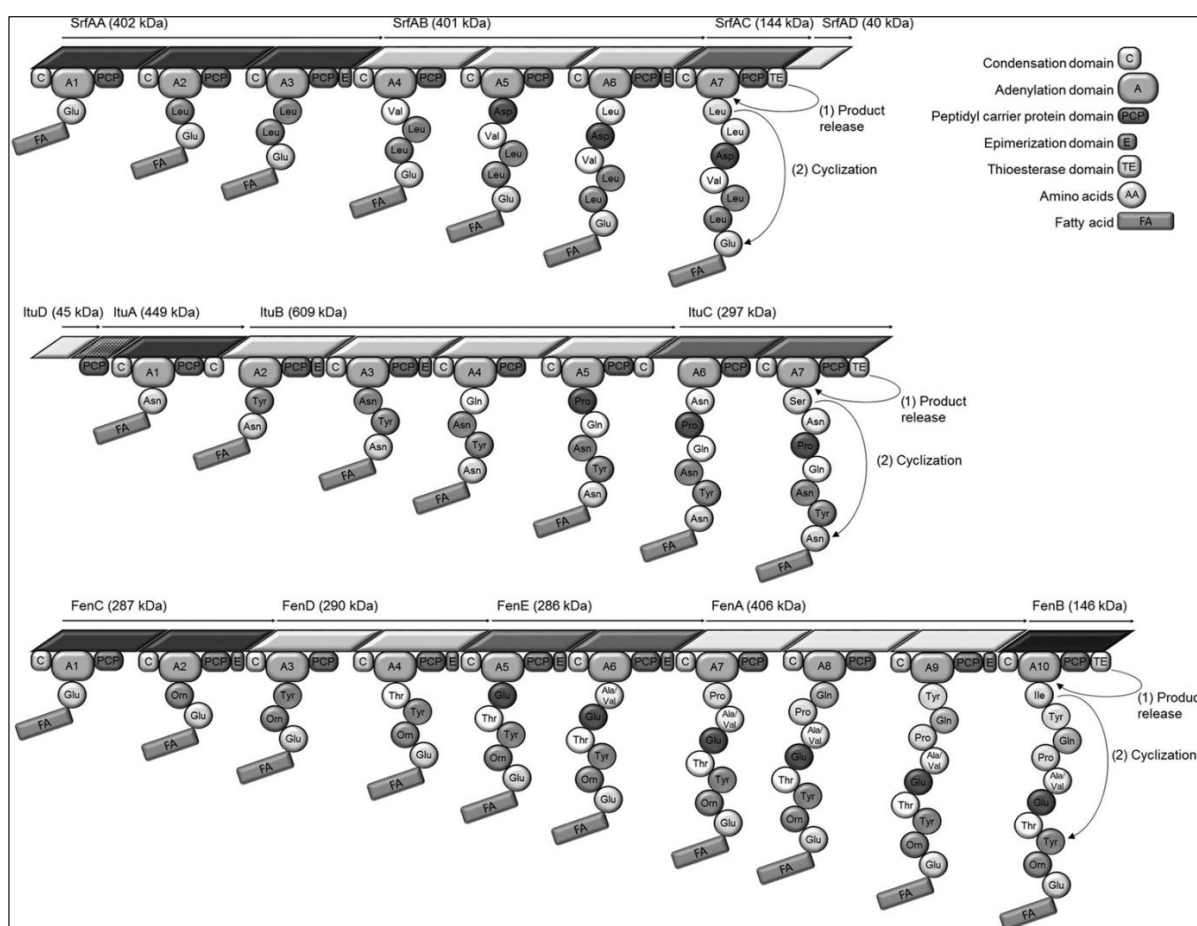
θειοεστεράση (TE) που σχετίζεται με μια μονάδα τερματισμού, ενώ υπάρχει και ένας δεύτερος τύπος TE που λειτουργεί και ως επιδιορθωτικό ένζυμο (Raaijmakers et al., 2010; Schwarzer et al., 2001). Ταυτόχρονα, οι NRPSs κάποιων λιποπεπτιδίων μπορεί να φέρουν και δομές επιμερισμού (E), οι οποίες καθορίζουν τη διάταξη (L ή D) του ενσωματωμένου αμινοξέος.

Έχουν αναφερθεί πολλές μορφές του λιποπεπτιδίου surfactin, οι οποίες παρουσιάζουν διαφορετική θέση ενσωμάτωσης των αμινοξέων στην πεπτιδική αλυσίδα (2, 4 και 7 θέση) (Bonmatin et al., 2003). Η surfactin αποτελεί μία ισχυρή επιφανειοδραστική ένωση, απαραίτητη για το σχηματισμό βιοϋμενίου, τον αποικισμό των βακτηρίων, την ομαδική κινητικότητα και το σχηματισμό βακτηριακών ενδοσπορίων (Aleti et al., 2016; Bais et al., 2004; Branda et al., 2001; Kearns & Losick, 2003; Zerrouh et al., 2014). Οι συστάδες γονιδίων βιοσύνθεσης του αντιβιοτικού surfactin (*srfA*) είναι εξαιρετικά ομόλογες και περιέχουν τέσσερα ανοιχτά αναγνωστικά πλαίσια (Open Reading Frames, ORFs), τα *srfAA*, *srfAB*, *srfAC* και *srfAD* (Εικ. 1.10) (Roongsawang et al., 2011). Οι αμινοξικές αλληλουχίες των τριών πρώτων ORFs είναι ομόλογες άλλων NRPSs, ενώ το τελευταίο ORF κωδικοποιεί μια τύπου II TE, η οποία είναι υπεύθυνη για την κυκλοποίηση και απελευθέρωση του ολιγοπεπτιδίου (Roongsawang et al., 2011). Τα ORF των *srfA-A/B/C* αποτελούνται από τρεις, τρεις και μία δομικές μονάδες αντίστοιχα, κάθε μία από τις οποίες υποδιαιρείται σε λειτουργικές δομές.

Η οικογένεια των iturin περιλαμβάνει τα κυκλικά λιποπεπτίδια bacillomycin, iturin και mycosubtilin, τα οποία αποτελούν ισχυρές αντιμικροβιακές και επιφανειοδραστικές ενώσεις και επάγουν την ομαδική κινητικότητα των βακτηρίων (Leclère et al., 2006; Roongsawang et al., 2011). Οι συστάδες γονιδίων των NRPS των bacillomycin D (*bam/bmy*), mycosubtilin (*myc*), and iturin A (*itu*) αποτελούνται από τέσσερα ανοιχτά αναγνωστικά πλαίσια, τα *bmyD*, *bmyA*, *bmyB* και *bmyC* για το bacillomycin D, τα *fenF*, *mycA*, *mycB*, and *mycC* για το mycosubtilin και τα *ituD*, *ituA*, *ituB*, και *ituC* για το iturin A (Εικ. 1.10) (Duitman et al., 1999; Koumoutsis et al., 2004; Moyne et al., 2004; Tsuge et al., 2001). Όπως και στο οπερόνιο του surfactin, τα ORF των *bmyA/B/C*, *mycA/B/C* και *ituA/B/C* κωδικοποιούν τα NRPS και αποτελούνται από μία, πέντε και δύο δομικές μονάδες αντίστοιχα. Το γονίδιο *bmyA/mycA/ituA* κωδικοποιεί για ένα πολυλειτουργικό υβρίδιο ενζύμων, μιας PKS και NRPS, ενώ φέρουν και μια επιπρόσθετη PCP και C δομή (Aron et al., 2005). Το λιποπεπτίδιο fengycin αποτελεί επίσης μια ισχυρή επιφανειοδραστική ένωση, η οποία συμβάλλει

σημαντικά στο σχηματισμό βιοϋμενίου και τον αποικισμό των βακτηρίων στις ρίζες των φυτών (Bais et al., 2004; Ongena & Jacques, 2008; Rivardo et al., 2009).

Το λιποπεπτίδιο fengycin κωδικοποιείται από πέντε ORFs, που ακολουθούν την παρακάτω σειρά: *fenC*, *fenD*, *fenE*, *fenA* και *fenB* (Εικ. 1.10) (Tapi et al., 2010; Wu et al., 2007). Η γενική οργάνωση των λειτουργικών δομών των αντίστοιχων δομικών μονάδων είναι ανάλογη με τη NRPS του surfactin. Κάθε ένα από τα FenC, FenD, και FenE προσθέτει δύο αμινοξέα στην oligopeptidic αλυσίδα, ενώ τα FenA και FenB προσθέτουν τρία αμινοξέα και ένα αντίστοιχα (Ongena & Jacques, 2008; Wu et al., 2007). Η κυκλοποίηση και απελευθέρωση του λιποπεπτιδίου πραγματοποιείται από μια TE η οποία βρίσκεται στο FenB.



Εικόνα 1.10 Σχηματική αναπαράσταση των οπερονίων που κωδικοποιούν για τις μη ριβοσωμικές πεπτιδικές συνθετάσες (NRPSs) των λιποπεπτιδίων (LPs) surfactin, iturin και fengycin. Απεικονίζονται οι δομικές μονάδες (modules) με τις αντίστοιχες δομές αδεनυλίωσης (A), θειολίωσης (PCP), συμπύκνωσης (C) και θειοεστεροποίησης (TE), καθώς τα αμινοξέα που ενσωματώνονται στην πεπτιδική αλυσίδα από την κάθε δομική μονάδα (Geissler et al., 2019).

Τα γονίδια που κωδικοποιούν για την παραγωγή αρκετών CLP's των βακτηρίων του γένους *Pseudomonas* μπορούν να υπάρχουν είτε ως ενιαίες συστάδες γονιδίων, όπως είναι το orfamide- A, είτε σε δύο ξεχωριστές θέσεις, όπως τα CLPs massetolide A και viscosin, αντίστοιχα (Εικ. 1.11) (De Bruijn et.al., 2007; De Bruijn et.al., 2008).

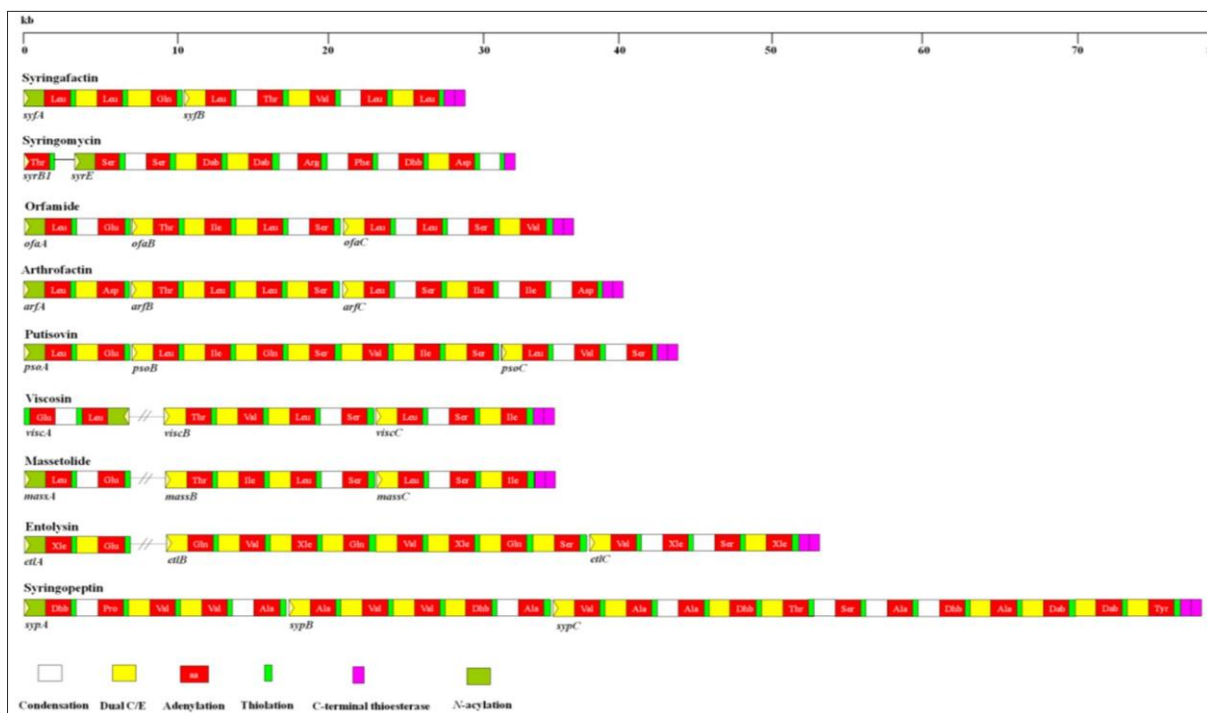
Η syringomycin αποτελείται από δύο NRPSs τις SyrB1 και SyrE, καθώς και τρία τροποποιημένα πρωτεϊνικά συστήματα (SyrB2, SyrC και SyrP). Τα SyrB1 και SyrE δεν ακολουθούν τον κανόνα της συγραμμικότητας ενώ στερούνται και τις δομές επιμερισμού (Roongsawang et al., 2011). Για τα πρώτα οκτώ αμινοξέα της SyrE, οι αντίστοιχες οκτώ δοκιμές μονάδες βρίσκονται στη σειρά, ενώ η ένατη δομική μονάδα (SyrB1), η οποία είναι απαραίτητη για την ενσωμάτωση του τελευταίου αμινοξέος, βρίσκεται σε άλλη θέση (Guenzi et al., 1998). Το λιποπεπτίδιο arthrofactin, αποτελεί μια από τις πιο ισχυρές επιφανειοδραστικές ενώσεις και συμβάλλει σημαντικά στην ομαδική κινητικότητα και το σχηματισμό βιοϋμενίου των βακτηρίων (Morikawa et al., 1993; Roongsawang et al., 2003). Η arthrofactin καταλύεται από τη συνθετάση της arthrofactin (Arf), η αποτελείται από τρεις υπομονάδες NRPS, τις ArfA, ArfB και ArfC, οι οποίες περιέχουν δύο, τέσσερις και πέντε δομικές μονάδες, αντίστοιχα (Roongsawang et al., 2003). Η πρώτη δομική μονάδα (ArfA), έχει μια επιπλέον δομή συμπύκνωσης C, η οποία είναι απαραίτητη για τη βιοσύνθεση του λιποπεπτιδίου. Επιπλέον η Arf περιέχει διπλές C/E δομές που συμβάλλουν στη μετατροπή των L-αμινοξέων σε D-μορφή (Balibar et al., 2005).

Τα κυκλικά λιποπεπτίδια viscosin και massetolide A, αποτελούν σημαντικές επιφανειοδραστικές ενώσεις οι οποίες ευνοούν την ομαδική κινητικότητα των βακτηρίων και το σχηματισμό βιοϋμενίου, ενώ αποτελούν ισχυρές αντιμικροβιακές ενώσεις (De Bruijn et.al., 2007; De Bruijn et.al., 2008). Είναι δομικά όμοια λιποπεπτίδια, τα οποία βιο-συντίθενται από το σύστημα NRPS που κωδικοποιείται από τρία μεγάλα ORFs, τα viscA/massA, viscB/massB, και viscC/massC και αποτελούνται από δύο, τέσσερις και τρεις δομικές μονάδες, αντίστοιχα (De Bruijn et.al., 2007; De Bruijn et.al., 2008). Το viscA/massA δεν αποτελούν μια ενιαία συστάδα γονιδίων με τα υπόλοιπα, αλλά βρίσκεται σε διαφορετική θέση στο γονιδίωμα. Κάθε δομική μονάδα αποτελείται από A, T και C δομές, όπως και τα υπόλοιπα NRPS. Όπως παρατηρήθηκε στην Arf, καμία δομική μονάδα δε διαθέτει δομή επιμερισμού E, ωστόσο έχει διπλές C/E δομές που συμβάλλουν στη μετατροπή των L-αμινοξέων σε D-μορφή.

Το λιποπεπτίδιο orfamide αποτελεί σημαντική επιφανειοδραστική ένωση που επάγει την ομαδική κινητικότητα των βακτηρίων αλλά δεν εμπλέκεται με το σχηματισμό βιοϋμενίου (Gross et al., 2007). Το LP orfamide αποτελείται από ένα β-υδρόξυ λιπαρό οξύ, που συνδέεται σε ένα κυκλικό πεπτίδιο των δέκα αμινοξέων, εκ των οποίων τα πέντε είναι στην D-μορφή (Roongsawang et al., 2011). Παρ' όλο που το orfamide αποτελείται από δέκα αμινοξέα, η δομή του μοιάζει πολύ με εκείνη του λιποπεπτιδίου viscosin (Roongsawang et al.,

2011). Ταυτόχρονα, η γονιδιακή δομή των γονιδίων για τη βιοσύνθεση του orfamide, *ofaABC*, είναι παρόμοια με εκείνη των *arfABC*. Η δομική ανάλυση του συμπλόκου OfaA/B/C των NRPS εντόπισε δέκα δομικές μονάδες, με την OfaA να αποτελείται από δύο και τα OfaB και OfaC από τέσσερις δομικές μονάδες το καθένα (Roongsawang et al., 2011). Όπως και στις υπόλοιπες NRPSs των βακτηρίων του γένους *Pseudomonas*, καμία δομική μονάδα του Ofa δε διαθέτει δομή επιμερισμού E, ενώ φέρει συνολικά έξι διπλές δομές C/E (Roongsawang et al., 2011).

Το αντιβιοτικό putisolvin είναι ένα κυκλικό λιποπεπτίδιο με δώδεκα αμινοξέα στην πεπτιδική αλυσίδα. Συνολικά τρία γονίδια (*psoA*, *psoB* και *psoC*) κωδικοποιούν για τις NRPSs που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση του αντιβιοτικού putisolvin (Dubern et al., 2008). Τα PsoA, PsoB και PsoC περιέχουν δύο, επτά και τρεις δομικές μονάδες, αντίστοιχα, με την τερματική C δομή του PsoC να φέρει πιθανώς διαδοχικά μια δομή TE. Εννέα από τα δώδεκα αμινοξέα βρίσκονται στη D-μορφή τους, με τις εννέα πρώτες T δομές της Pso συνθετάσης να είναι υπεύθυνες για τη μεταφορά των D αμινοξέων και στο τέλος κάθε C δομής είναι οργανωμένες διπλές C/E δομές (Roongsawang et al., 2003).



Εικόνα 1.11 Σχηματική αναπαράσταση των οπερονίων που κωδικοποιούν για τις μη ριβοσωμικές πεπτιδικές συνθετάσες (NRPSs) των λιποπεπτιδίων (LPs) του γένους *Pseudomonas* spp. Απεικονίζονται οι δομικές μονάδες (modules) με τις αντίστοιχες δομές αδενυλίωσης (A), θειολίωσης (PCP), συμπύκνωσης (C), θειοεστεροποίησης (TE) και διπλού C/E (Roongsawang et al., 2011).

1.4.3 ISR

Τα φυτά φέρουν ένα ευρύ φάσμα φυσικοχημικών μηχανισμών αυτοπροστασίας, με την επαγωγή της αντοχής τους να αποτελεί έναν από τους κυριότερους αμυντικούς μηχανισμούς ενάντια σε βιοτικές και αβιοτικές καταπονήσεις (Köhl et al., 2019). Οι επαγόμενοι αμυντικοί μηχανισμοί ενεργοποιούνται με την αναγνώριση συγκεκριμένων σηματοδοτικών μορίων από ειδικούς εξωκυτταρικούς υποδοχείς αναγνώρισης, τους PRRs (Pattern Recognition Receptors) (Köhl et al., 2019). Τα σηματοδοτικά μόρια είναι χαρακτηριστικά για κάθε μικροοργανισμό και είναι γνωστά ως MAMPs (Microbe Associated Molecular Patterns) ή PAMPs (Pathogen Associated Molecular Patterns), όταν σχετίζονται με φυτοπαθογόνα στελέχη (Boller & Felix, 2009; Newman et al., 2013).

Τα σηματοδοτικά μόρια PAMPs των φυτοπαθογόνων μικροοργανισμών, ενεργοποιούν τα αμυντικά μονοπάτια του φυτού και επάγουν την ανθεκτικότητα του, είτε τοπικά στον προσβεβλημένο ιστό, είτε στο υπόλοιπο φυτό και σε διπλανά φυτά, οδηγώντας σε επίκτητη διασυστηματική αντοχή των φυτών (Systemic Acquired Resistance, SAR) (Εικ. 1.12) (Conrath et al., 2015; Ross, 1961).

Η εφαρμογή ωφέλιμων ανταγωνιστικών βακτηρίων (PGPB) είτε στην περιοχή της ριζόσφαιρας, είτε σε ιστούς και καρπούς σε μετασυλλεκτικό στάδιο, μπορεί επίσης να ενεργοποιήσει τον αμυντικό μηχανισμό των φυτών, χωρίς παράλληλα την εμφάνιση συμπτωμάτων παθογένειας. Ο μηχανισμός αυτός ορίζεται ως επαγόμενη διασυστηματική αντοχή (Induced Systemic Resistance, ISR) (Εικ. 1.12) και ενεργοποιείται είτε στον ιστό επαφής με το μικροοργανισμό, είτε στο υπόλοιπο φυτό (Kloepper et al., 1992; Ryu et al., 2004; Van Loon et al., 1998; Van Peer et al., 1991; Wei et al., 1991).

Τα πιο συχνά μελετώμενα MAMPs/ PAMPs είναι η Flagellin (Flg;flg22), ο παράγοντας επιμήκυνσης TU (EF-Tu;elf18/26), η πεπτιδογλυκάνη (PGN), οι λιποπολυσακχαρίτες (LPS), οι πρωτεΐνες ψυχρού σοκ των βακτηρίων (RNP1motif), το υπεροξείδιο της δισμουτάσης (SOD), οι β-γλυκάνες και η χιτίνη, τα οποία επάγουν την ενδοκυτταρική σηματοδότηση, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της πρώτης γραμμής άμυνας των φυτών γνωστή ως PTI/ MTI (Pathogen/ Microbe -Triggered Immunity) (Newman et al., 2013; Rodriguez et al., 2019). Η ενεργοποίηση του μηχανισμού PTI/ MTI που επάγει την άμυνα των φυτών, βελτιώνει τα δομικά χαρακτηριστικά των ιστών και ενεργοποιεί πολλές μοριακές και βιοχημικές αμυντικές αποκρίσεις των φυτών, όπως είναι η απόκριση της ενεργοποιημένης κινάσης πρωτεΐνης μιτογόνου (Mitogen Activated Protein Kinase, MAPK), η παραγωγή δραστικών μορφών

οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, (ROS), η βιοσύνθεση αλκαλοειδών, τερπενοειδών και φυτοαλεξινών μέσω του βιοσυνθετικού μονοπατιού των φαινυλοπροπανοειδών, η βιοσύνθεση φυτοορμονών, η παραγωγή των PR- πρωτεϊνών (Pathogenesis Related, PR), η συσσώρευση φαινολικών ενώσεων, η λιγνοποίηση του ξύλου στο σημείο της μόλυνσης και η ενίσχυση του κυτταρικού τοιχώματος του ξενιστή με το σχηματισμό γλυκοπρωτεϊνών, καλλόζης (callose), λιγνίνης και άλλων φαινολικών πολυμερών (Hao et al., 2018; Li et al., 2020; Lloyd et al., 2011; Nie et al., 2017; Pršić & Ongena, 2020; Shores et al., 2010).

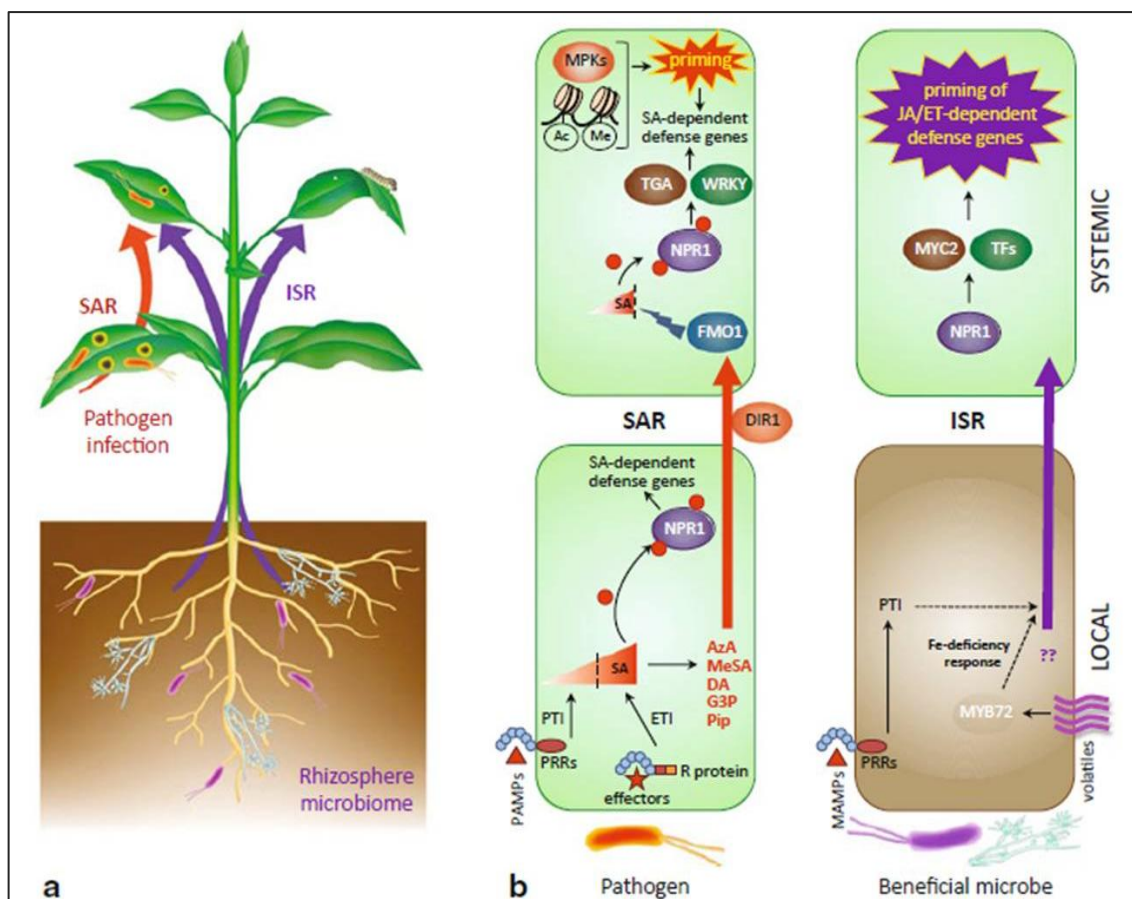
Οι φυτοορμόνες, όπως είναι το γασμονικό οξύ (Jasmonic Acid, JA), το σαλικυλικό οξύ (Salicylic Acid, SA) και το αιθυλένιο (Ethylene, ET), αποτελούν τα βασικά σηματοδοτικά μόρια για την επαγωγή της άμυνας τοπικά στον ιστό αλλά και διασυστηματικά (Bartoli et al., 2013; Nie et al., 2017). Ωστόσο, ένα πλήθος άλλων φυτοορμονών, όπως είναι οι αυξίνες, οι κυτοκινίνες, οι γιββερελλίνες, το αμπισικό οξύ (Abscissic Acid, ABA) και οι πολυυδροξυλιωμένες στεροειδείς φυτικές BR ορμόνες (Brassinosteroids, BRs), καθώς και τα σηματοδοτικά μόρια αζελαϊκό οξύ (Azelaic Acid, AZA) και στριγγολακτόνες, εμπλέκονται επίσης στο βασικό αμυντικό σηματοδοτικό μονοπάτι των φυτών (Li et al., 2020; Mhlongo et al., 2018).

Οι φυτοορμόνες παίζουν καθοριστικό ρόλο ως σηματοδοτικά μόρια για όλες τις διεργασίες των φυτών (Rodriguez et al., 2019). Οι αμυντικές αποκρίσεις των φυτών ρυθμίζονται κυρίως από τις φυτοορμόνες SA, JA και ET. Ενώ η παραγωγή του SA έχει συνδεθεί άμεσα με την επίκτητη διασυστηματική αντοχή των φυτών (SAR), η οποία ενεργοποιείται από φυτοπαθογόνους μικροοργανισμούς, οι φυτοορμόνες JA και ET έχουν συνδεθεί με την επαγόμενη διασυστηματική αντοχή των φυτών (ISR) που ενεργοποιείται από ωφέλιμους ανταγωνιστικούς μικροοργανισμούς (Pieterse et al., 2014). Στην περίπτωση που οι παθογόνοι μικροοργανισμοί ξεπεράσουν την πρώτη γραμμή άμυνας των φυτών, έρχονται αντιμέτωποι με έναν δεύτερο αμυντικό μηχανισμό ο οποίος καλείται ETI (Effector- Triggered Immunity) και ενεργοποιείται με την αναγνώριση συγκεκριμένων παραγόμενων τελεστών του παθογόνου (Dodds, & Rathjen, 2010). Ο αμυντικός μηχανισμός ETI μπορεί να περιορίσει την εξάπλωση του παθογόνου μικροοργανισμού, προκαλώντας πολλές φορές αντίδραση υπερευαισθησίας (Hypersensitive Response, HR) γύρω από το σημείο της προσβολής. Επομένως η SAR των φυτών επάγεται με έναν ή και τους δύο μηχανισμούς PTI και ETI (Shah & Zeier, 2013). Ένα ακόμη χαρακτηριστικό της ενεργοποίησης της SAR είναι η έκφραση των PR γονιδίων (Pathogenesis Related), πολλά από τα οποία κωδικοποιούν PR πρωτεΐνες με αντιμικροβιακή δράση (Van Loon et al., 2006). Κατά την ενεργοποίηση της

SAR, η μετάδοση του σήματος του SA γίνεται με τη βοήθεια της πρωτεΐνης NPR1 (Nonexpressor of Pathogenesis-Related genes 1) η οποία λειτουργεί ως μεταγραφικός συν-ενεργοποιητής (transcriptional co-activator) ενός μεγάλου συνόλου PR γονιδίων (Fu & Dong, 2013). Σε αντίθεση με τη SAR, η ενεργοποίηση της ISR συνήθως δε σχετίζεται με την παραγωγή PR πρωτεϊνών. Ωστόσο, η NPR1 πρωτεΐνη εμπλέκεται άμεσα και με την ISR των φυτών, καθώς ρυθμίζει την αλληλεπίδραση (cross-talk) μεταξύ των φυτοορμονών SA και JA (Spoel et al., 2003).

Έως τώρα δεν έχουν βρεθεί όλοι οι μοριακοί μηχανισμοί που ρυθμίζουν την αλληλεπίδραση μεταξύ ωφέλιμων βακτηρίων και φυτών- ξενιστών, ωστόσο οι κύριες οδοί με τις οποίες οι μικροοργανισμοί ενεργοποιούν την ISR των φυτών είναι τα χαρακτηριστικά σηματοδοτικά μόρια των μικροοργανισμών (MAMPs), η παραγωγή φυτοορμονών, καθώς και η σύνθεση πλήθους διεγερτικών ενώσεων (Abdul Malik et al., 2020; Pieterse et al., 2014; Rodriguez et al., 2019; Stringlis et al., 2018). Η παραγωγή σιδηροφόρων ενώσεων (pyoverdine), αντιβιοτικών ενώσεων όπως λιποπεπτίδια, πολυκετίδια, γλυκολιπίδια και διπεπτίδια, λυτικών ενζύμων, βακτηριακών πτητικών ενώσεων (BVCs) (2,3-βουτανεδιόνη, ακετοΐνη, DMDS), φυτασών και miRNAs, λειτουργούν ως παράγοντες διέγερσης της ISR των φυτών από πλήθος ωφέλιμων ανταγωνιστικών βακτηρίων (Bakker et al., 2003; De Vleeschauwer et al., 2008; Huang et al., 2012; Monnier et al., 2018; Pieterse et al., 2014; Rojas-Solís et al., 2018; Rudrappa et al., 2010; Weller et al., 2012).

Μεγαλύτερη βάση έχει δοθεί στη μελέτη των ισχυρών ανταγωνιστικών βακτηρίων του γένους *Bacillus* και *Pseudomonas* τα οποία παράγουν ένα σημαντικό αριθμό δευτερογενών μεταβολιτών και αντιβιοτικών ενώσεων. Σημαντικός αριθμός στελεχών έχουν ξεχωρίσει για την επαγωγή της άμυνας και προστασίας των φυτών είτε με την άμεση αντιμετώπιση των φυτοπαθογόνων οργανισμών, είτε μέσω του μηχανισμού ISR. Η παραγωγή των ισχυρών αντιμικροβιακών λιποπεπτιδίων (LP's) surfactin, fengycin και iturin, του γένους *Bacillus*, καθώς και των massetolide A, orfamide και sessilin, του γένους *Pseudomonas*, καταπολεμούν άμεσα σημαντικό αριθμό φυτοπαθογόνων μυκήτων, ενώ ταυτόχρονα επάγουν τη διασυστηματική ανοχή των φυτών (Chowdhury et al., 2015; Henry et al., 2011; Ma et al., 2016; Ma et al., 2017; Ongena et al., 2007; Rodríguez et al., 2018; Tran et al., 2007; Jourdan et al., 2009).



Εικόνα 1.12 Σχηματική απεικόνιση της επίκτητης (SAR) και της επαγόμενης διασυστηματικής ανοχής (ISR) των φυτών (Pierse et al., 2015).

1.4.4 Ανταγωνισμός για θρεπτικά στοιχεία και χώρο

Η περιοχή της ριζόσφαιρας αποτελεί ένα σημαντικό παράδειγμα ανταγωνιστικού περιβάλλοντος, καθώς οι μικροοργανισμοί που το αποικίζουν ανταγωνίζονται μεταξύ τους για τα θρεπτικά συστατικά του εδάφους, τις ενώσεις που απελευθερώνονται από τα ριζικά εκκρίματα, καθώς και την κατάληψη της ευνοϊκότερης θέσης στο χώρο. Η βλαστικότητα και η ανάπτυξη των φυτοπαθογόνων μικροοργανισμών εξαρτάται σημαντικά από την απορρόφηση των απαραίτητων θρεπτικών στοιχείων από το περιβάλλον (Köhl et al., 2019; Köhl & Fokkema, 1998). Ισχυρά ανταγωνιστικά βακτήρια που λειτουργούν ως παράγοντες βιολογικού ελέγχου, εφαρμόζουν τον ανταγωνισμό για θρεπτικά συστατικά και ιχνοστοιχεία, καθώς και τον ανταγωνισμό θέσης, ως αποτελεσματικό τρόπο δράσης (Köhl et al., 2019).

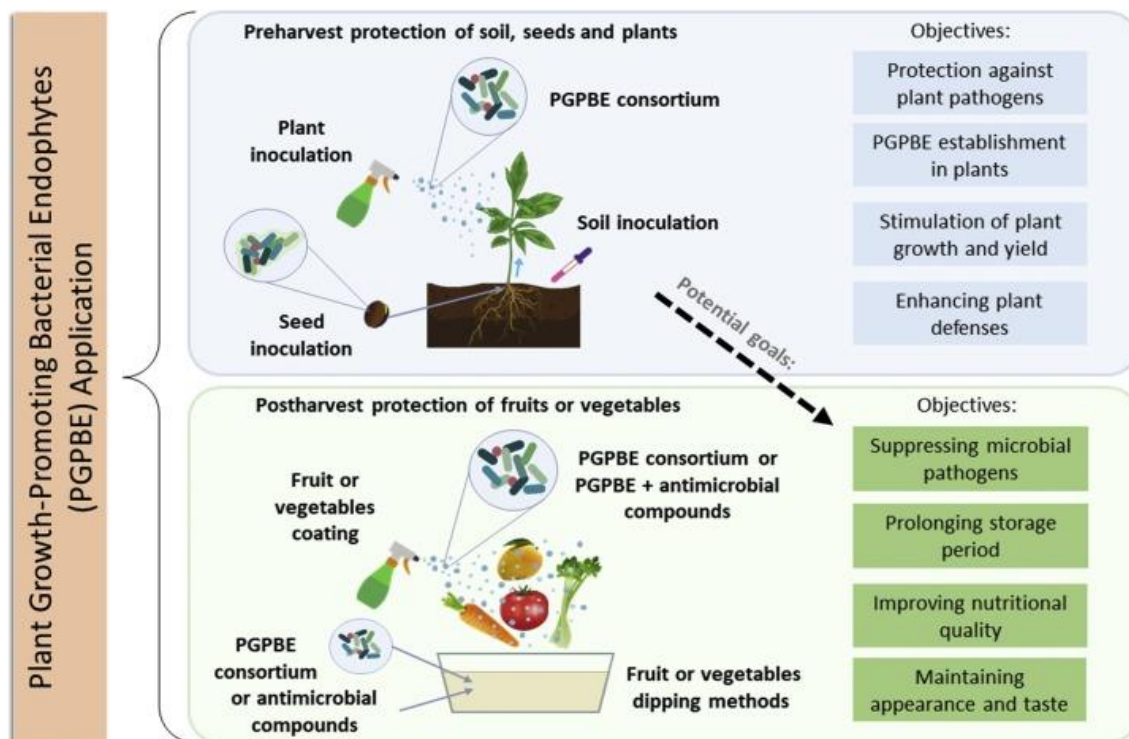
Τα BCAs που εμβολιάζονται στο έδαφος ή πάνω σε φυτικούς ιστούς, θα πρέπει να αποικίζουν αποτελεσματικά την περιοχή εμβολιασμού τους (ριζόσφαιρα, άνθη, φύλλα, καρποί), να επιβιώνουν και να καταναλώνουν ταχύως τα απαραίτητα για το φυτοπαθογόνο μικροοργανισμό θρεπτικά συστατικά, όπως σάκχαρα και φυτικά εκκρίματα, προκειμένου να επάγουν την ανάπτυξη και προστασία των φυτών (Bloemberg & Lugtenberg, 2001;

Innerebner et al., 2011; Poppe et al., 2003; Zhang et al., 2010). Ένας σημαντικός αριθμός ριζοσφαιρικών BCAs έχει βρεθεί να ανταγωνίζεται αποτελεσματικά φυτοπαθογόνα στελέχη μυκήτων, είτε καταλαμβάνοντας κυρίαρχη θέση στο χώρο, είτε καταναλώνοντας τις απαραίτητες πηγές αζώτου και άνθρακα από τα ριζικά εκκρίματα, μειώνοντας τελικά τη βλαστικότητα των σπορίων τους (Elad & Chet, 1987; Mille-Lindblom et al., 2006).

Ένα από τα πιο σημαντικά ιχνοστοιχεία που καθορίζουν την ανάπτυξη και μολυσματικότητα των φυτοπαθογόνων μυκήτων είναι ο σίδηρος (Fe^{3+}). Όπως και τα βακτήρια, έτσι και οι μύκητες έχουν την ικανότητα να δεσμεύσουν τον τρισθενή σίδηρο με τη βοήθεια των σιδηροφόρων (εξωκυτταρικών ή ενδοκυτταρικών) και να τον αφομοιώνουν με κατάλληλους διαμεμβρανικούς υποδοχείς (Winkelmann, 2001). Η παραγωγή σιδηροφόρων ενώσεων παίζει σημαντικό ρόλο στη βλαστικότητα των σπορίων και την ανάπτυξη των μυκήτων, καθώς και στη μολυσματικότητά τους (Charlang et al., 1981; Eisendle et al., 2003; Greenshields et al., 2007; Oide et al., 2006; Schrettl et al., 2007). Η εφαρμογή ανταγωνιστικών βακτηρίων μειώνει σημαντικά τη διαθεσιμότητα του σιδήρου για τους φυτοπαθογόνους μικροοργανισμούς, με αποτέλεσμα την παρεμπόδιση της ανάπτυξης και μολυσματικότητάς τους (de los Santos-Villalobos et al., 2012; Fgaier & Eberl, 2011; Kannoja et al., 2019; Yu et al., 2011).

Ταυτόχρονα, ο ανταγωνισμός των BCAs για θρεπτικά στοιχεία, όπως υδατάνθρακες, αμινοξέα και βιταμίνες, ο ανταγωνισμός για κατανάλωση οξυγόνου και για το χώρο αποικισμού, αποτελεί καθοριστικό μηχανισμό καταστολής μετασυλλεκτικών ασθενειών σε φρούτα και καρπούς (Nunes, 2012; Poppe et al., 2003; Sharma et al., 2009; Spadaro & Droby, 2016; Yu & Lee, 2015). Ο άμεσος αποικισμός των ανταγωνιστικών βακτηρίων σε φυσικά ανοίγματα και πληγές των καρπών καθώς και η συγκέντρωση των κυττάρων τους, αποτελεί κρίσιμο σημείο για τον περιορισμό των μετασυλλεκτικών ασθενειών και τελικά έναν επιτυχημένο βιολογικό έλεγχο (Dukare et al., 2019; Mercier & Wilson, 1995). Η διαθεσιμότητα καθώς και η διαφορετική σύνθεση θρεπτικών συστατικών που συναντάται σε κάθε φυτό ξενιστή επηρεάζει άμεσα τον αποικισμό των BCAs (Lima et al., 1999). Έχει βρεθεί μάλιστα, ότι σε συνθήκες όπου υπάρχει χαμηλή διαθεσιμότητα συγκεκριμένων θρεπτικών στοιχείων, τα ανταγωνιστικά βακτήρια απορροφούν αποτελεσματικότερα τα θρεπτικά συστατικά στην περιοχή του ανοίγματος των καρπών, κάνοντας αδύνατη τη βλαστικότητα, ανάπτυξη και τελικά τη μόλυνση από παθογόνους μύκητες (Bryk et al., 1998; Poppe et al., 2003).

Για όλους τους λόγους που αναφέρθηκαν παραπάνω τα ωφέλιμα ενδοφυτικά βακτηριακά στελέχη είναι κατάλληλα για χρήση τους ως παράγοντες βιολογικής αντιμετώπισης, είτε προσυλλεκτικά είτε μετα-συλλεκτικά (Εικ. 1.13).



Εικόνα 1.13 Σχηματική απεικόνιση της εφαρμογής ενδοφυτικών βακτηρίων που προάγουν την ανάπτυξη των φυτών (Plant Growth Promoting Endophytic Bacteria, PGPEB) σε προ-συλλεκτικό και μετα-συλλεκτικό στάδιο, με σκοπό την προστασία τους από παθογόνους μικροοργανισμούς και βελτιωμένα ποιοτικά χαρακτηριστικά (Morales-Cedeño, 2020).

1.5 Το φυτό *Calendula officinalis*

Το γένος *Calendula*, που ανήκει στην οικογένεια *Asteraceae*, περιλαμβάνει περίπου 25 ποώδη ετήσια ή πολυετή είδη, τα πιο συνηθισμένα από τα οποία είναι τα *Calendula officinalis* Linn., *Calendula arvensis* Linn., *Calendula suffruticosa* Vahl., *Calendula stellata* Cav., *Calendula alata* Rech. και *Calendula tripterocarpa* Rupr. Το γένος *Calendula* είναι γηγενές στις χώρες της κεντρικής Ευρώπης και της Μεσογείου (Silva et al., 2021).

Μεταξύ των ειδών του γένους *Calendula*, το είδος *Calendula officinalis* L. ξεχωρίζει για την ευρεία χρήση του στην παραδοσιακή ιατρική, τη φαρμακευτική και την κοσμετολογία (Arora et al., 2013). Το έλαιο των ανθέων του φαρμακευτικού φυτού είναι πλούσιο σε ενεργούς δευτερογενείς μεταβολίτες όπως είναι τα τερπενοειδή και τα τερπένια, τα καρτοειδή, τα φλαβονοειδή, τα φαινολικά οξέα και τα στεροειδή (Faustino et al., 2018; Silva et al., 2021). Η εφαρμογή του φυτικού εκχυλίσματος ξεχωρίζει για τις αντιμικροβιακές και αντικαρκινικές του ιδιότητες και συμβάλλει αποτελεσματικά στη θεραπεία των φλεγμονών

των εσωτερικών οργάνων, γαστρεντερολογικών ελκών, δερματολογικών ασθενειών, οιδημάτων καθώς και νευρολογικών διαταραχών (Arora et al., 2013; Safdar et al., 2010). Συνεπώς, τόσο τα αγρίου τύπου, όσο και τα καλλιεργήσιμα φυτά του είδους *Calendula officinalis* αποτελούν μια σημαντική πηγή φυτοχημικών ενώσεων οικονομικής σημασίας, για πολλαπλές εμπορικές εφαρμογές, (Nizyński et al., 2015).

1.6 Σκοπός διδακτορικής διατριβής

Η παρούσα διδακτορική διατριβή είχε σκοπό την απομόνωση και τη μελέτη των ενδοφυτικών βακτηρίων του φαρμακευτικού φυτού *Callendula officinalis* και την αξιολόγηση των άμεσων και έμμεσων μηχανισμών δράσης τους για την πιθανή εφαρμογή τους ως παράγοντες που προάγουν την ανάπτυξη και προστασία των φυτών. Παράλληλα, μελετήθηκε εκτενέστερα το ήδη χαρακτηρισμένο βακτήριο *Pseudomonas carnis* X απομονωμένο από τη ριζόσφαιρα του φυτού *Phaseolus vulgaris*, είτε μόνο του, είτε σε σύγκριση με τα ενδοφυτικά βακτήρια. Επιπλέον, επιλεγμένα βακτηριακά στελέχη μελετήθηκαν είτε ως μεμονωμένα στελέχη, είτε ως μίγματα βακτηρίων για την επίδραση τους στην ανάπτυξη και προστασία των φυτών με ενεργοποίηση της επαγόμενης διασυστηματικής αντοχής (ISR) τους. Τέλος, δόθηκε έμφαση στην εκτενή μελέτη της ανταγωνιστικής δράσης επιλεγμένων βακτηριακών στελεχών, τα αποτελέσματα των οποίων ενισχύθηκαν μετά από μεταβολομική, γονιδιωματική και *in silico* ανάλυση.

Υλικά και Μέθοδοι



2. Υλικά και μέθοδοι

2.1 Απομόνωση και χαρακτηρισμός ενδοφυτικών βακτηρίων

2.1.1 Συλλογή φυτικών δειγμάτων για την απομόνωση ενδοφυτικών βακτηρίων

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή τα ενδοφυτικά βακτήρια που μελετήθηκαν προέρχονται από το φαρμακευτικό φυτό *Calendula officinalis*. Η συλλογή των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε στον πειραματικό αγρό του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών στα Σπάτα. Τα φυτά μετά τη συλλογή τους μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο Γενικής και Γεωργικής Μικροβιολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, όπου και πραγματοποιήθηκε η απομόνωση των ενδοφυτικών μικροοργανισμών ακολουθώντας πρότυπη διαδικασία αποστείρωσης.

2.1.2 Διαδικασία απομόνωσης ενδοφυτικών βακτηρίων

Τα ενδοφυτικά βακτήρια που μελετήθηκαν στην παρούσα διδακτορική διατριβή απομονώθηκαν από ασυμπτωματικούς και επιφανειακά αποστειρωμένους ιστούς φύλλων, ανθέων και ρίζας του φαρμακευτικού φυτού *Calendula officinalis*. Μετά τη συλλογή τους πραγματοποιήθηκε καλή έκπλυση των φυτικών ιστών με συνεχή ροή νερού βρύσης για 10 min προκειμένου να απομακρυνθούν προσκολλημένοι σβώλοι χόματος στην επιφάνεια των ιστών. Στη συνέχεια τα καθαρά δείγματα διαιρέθηκαν σε μικρότερα κομμάτια και ανά ιστό μεταφέρθηκαν σε κωνικά σωληνάρια falcon (50 ml) που περιείχαν 70 % Et-OH με συνεχή ανάδευση για 5 min, προκειμένου να γίνει η επιφανειακή αποστείρωση τους. Μετά την απομάκρυνση του πρώτου αποστειρωτικού μέσου έγινε η προσθήκη του δεύτερου διαλύματος αποστείρωσης που περιείχε 10 % NaOCl και 0,2 % Tween20 στο οποίο τα δείγματα επώαστηκαν με συνεχή ανάδευση για 5 min. Μετά την απομάκρυνση του δεύτερου αποστειρωτικού μέσου έγινε η προσθήκη 70 % Et-OH όπου τα δείγματα επώαστηκαν για 30 sec. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε καλή έκπλυση των ιστών με συνεχή ανάδευση σε αποστειρωμένο dH₂O για 10 min (5 επαναλήψεις). Μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας αποστείρωσης οι ιστοί πολτοποιήθηκαν ξεχωριστά σε αποστειρωμένο γουδί πορσελάνης, ώσπου να αποκτήσουν τη μορφή πάστας. Η φυτική πάστα μεταφέρθηκε και στρώθηκε σε τρυβλία Petri που περιείχαν θρεπτικό μέσο ανάπτυξης NA (Nutrient Agar) στερεοποιημένα με 1,5 % agar, καθώς και το μυκητοκτόνο Cycloheximide (τελική συγκέντρωση 100 µg/ml). Το τελευταίο αποστειρωτικό νερό στρώθηκε ξεχωριστά ενεργώντας ως μάρτυρας επιτυχημένης διαδικασίας αποστείρωσης. Μετά από περίπου μία εβδομάδα επώασης στους 30°C επιλέχθηκαν 119 αντιπροσωπευτικές μοναδιαίες αποικίες οι οποίες μεταφέρθηκαν σε

νέο θρεπτικό μέσο ανάπτυξης. Οι καθαρές τους καλλιέργειες αποθηκεύτηκαν στους -80°C σε stock γλυκερόλης (20 % v/v) μέχρι την επόμενη χρήση τους.

2.1.3 Μορφολογική κατηγοριοποίηση βακτηρίων

Μεμονωμένες αποικίες των ενδοφυτικών βακτηρίων αναπτύσσονται σε στερεό θρεπτικό μέσο ανάπτυξης Nutrient Agar (NA, Conda) 1,5 % (w/v) σε agar, ως μοναδιαίες αποικίες. Τα βακτήρια επωάζονται στους 30°C για 20 ώρες και οι αναπτυγμένες αποικίες διαφοροποιούνται περαιτέρω με βάση τη μορφολογία, το χρώμα, το μέγεθος και την υφή τους.

2.1.4 Μοριακή ταυτοποίηση ενδοφυτικών βακτηρίων με το 16S rRNA γονίδιο αναφοράς- Εντοπισμός γονιδίων που κωδικοποιούν για τα αντιβιοτικά iturin, fengycin και surfactin

2.1.4.1 Απομόνωση γενωμικού DNA

Τα απομονωμένα βακτηριακά στελέχη αναπτύσσονται σε υγρό θρεπτικό μέσο NB για 20 h. Η απομόνωση του γενωμικού DNA πραγματοποιήθηκε με την προσαρμοσμένη μέθοδο CTAB (Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide) των Moore et al., 1999.

2.1.4.2 Προετοιμασία Διαλυμάτων

Αρχικό βήμα ήταν προετοιμασία των απαραίτητων διαλυμάτων που απαιτούνται για την απομόνωση του DNA.

- 1. 2x CTAB Lysis Buffer**
 - 2% CTAB (w/v)
 - 100 mM Tris (pH 8.0)
 - 20 mM EDTA (pH 8.0)
 - 1,4 M NaCl
 - 1% PVP (polyvinylpyrrolidone)
- 2. 5% CTAB solution**
 - 5% CTAB (w/v)
 - 0,7 M NaCl
- 3. Tris HCl (1 M, pH 8.0)**
- 4. EDTA (0,5 M, pH 8.0)**
- 5. NaCl (5 M)**
- 6. NaOH (5 M)**
- 7. Na- acetate (3 M, pH 5.2)**

2.1.4.3 Διαδικασία απομόνωσης ολικού DNA

Τα βακτήρια αναπτύσσονται σε υγρό θρεπτικό μέσο NB (Nutrient Broth) και επωάζονται για 20 h στους 28°C σε κατάλληλο θάλαμο επώασης συνεχόμενης ανάδευσης στα 200 rpm. Τα βήματα που πραγματοποιήθηκαν για την απομόνωση του DNA ήταν τα εξής:

1. Μεταφορά 1,5 ml φρέσκιας υγρής καλλιέργειας σε eppendorf 1,5 ml
2. Φυγοκέντρηση σε 11.000xg για 30 sec με σκοπό την καταβύθιση των βακτηριακών κυττάρων και την μετέπειτα απομάκρυνση του υπερκείμενου
3. Επανάληψη των βημάτων 1 και 2
4. Προσθήκη 500 µl 2x CTAB Lysis Buffer και επαναιώρηση του βακτηριακού ιζήματος με έντονο vortex για 30 sec
5. Προσθήκη 5 µl RNAase (10mg/ml)
6. Επώαση του διαλύματος στους 65°C για 30 min με ελαφριά ανάδευση ανά τακτά χρονικά διαστήματα (10 min)
7. Προσθήκη ενός όγκου chloroform: isoamyl alcohol: (24:1 v/v) και καλή ανάδευση ώστε να ομογενοποιηθεί το διάλυμα
8. Φυγοκέντρηση σε 11.000x g για 20 min
9. Μεταφορά του υπερκείμενου (υδατική φάση) σε νέο eppendorf και μέτρηση του όγκου
10. Προσθήκη 1/5 του όγκου 5% CTAB solution
11. Επανάληψη των βημάτων 6-8
12. Προσθήκη σε αυτό δύο όγκων παγωμένης αιθανόλης 100% και 1/10 του όγκου 3M Na-acetate pH 5.2
13. Επώαση στους -20°C για 30 min
14. Φυγοκέντρηση στα 11.000x g για 30min
15. Απομάκρυνση του υπερκείμενου και προσθήκη 1 ml παγωμένης αιθανόλης 75% και έντονη ανακίνηση
16. Φυγοκέντρηση για 5 min στους 4°C και απόρριψη του υπερκειμένου
17. Στέγνωμα του ιζήματος DNA στους 37°C για 30 min
18. Επαναδιάλυση σε 50 µl κατάλληλου διαλύτη (TE)

Μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας πραγματοποιείται ποσοτικός και ποιοτικός προσδιορισμός με φασματοσκοπική ανάλυση. Τέλος, το DNA αποθηκεύεται στους -20°C μέχρι την επόμενη χρήση του.

2.1.4.4 Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction-PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης, μας επιτρέπει να πολλαπλασιάσουμε εκθετικά τα τμήματα DNA που μας ενδιαφέρουν. Στο παρόν πείραμα εφαρμόστηκε προκειμένου να ενισχυθούν οι νουκλεοτιδικές αλληλουχίες των περιοχών 16S rRNA, για την περαιτέρω φυλογενετική κατάταξη των απομονωμένων ενδοφυτικών βακτηρίων.

Η μέθοδος βασίζεται σε διαδοχικούς κύκλους αντιγραφής (συνήθως 25-35) που ξεκινούν από καθορισμένες θέσεις μιας μήτρας DNA. Κάθε κύκλος αποτελείται από τρία βασικά στάδια:

- Αποδιάταξη της μήτρας DNA (Denature DNA) : 94-96°C
- Υβριδισμός των εκκινητών στις συμπληρωματικές, προς αυτούς, αλληλουχίες (Annealing) : 45-68°C
- Επιμήκυνση των εκκινητών (Extension) : 72°C

Η αναλογία των συστατικών της PCR είναι η εξής:

Πίνακας 2.1
πολυμεράσης

Αναλογία των συστατικών που απαιτούνται για την πραγματοποίηση της αλυσιδωτής αντίδρασης της

Συστατικά	Όγκος (μl)
Buffer 10x	10
dNTPs	2
Forward Primer	2
Reverse Primer	2
DNA polymerase (Hot Start)	1
DMSO	4
DNA (50 ng)	2
ddH ₂ O	77
Τελικός όγκος	100

Οι νουκλεοτιδικές αλληλουχίες των εκκινητών του 16S rRNA γονιδίου που χρησιμοποιήθηκαν για τη φυλογενετική ανάλυση των ενδοφυτικών καθώς και των εκκινητών για τον εντοπισμό των γονιδίων που εμπλέκονται στην παραγωγή των κυκλικών λιποπεπτιδίων iturin, fengycin και surfactin είναι οι εξής:

Πίνακας 2.2

Νουκλεοτιδικές αλληλουχίες των εκκινητών του 16S rRNA και των *ituA*, *fenB*, *surfC* γονιδίων.

Γονίδια	Forward Primer	Reverse Primer
16S	5'- AGAGTTTGATCCTGGCTCAG -3'	5'- AAGGAGGTGATCCAGCC -3'
<i>ituA</i>	5'- CGAGCGATGCSATCTCCWTGGATGT -3'	5'- GCATCGTCATGTGCTGCTYGAGATG -3'
<i>fenC</i>	5'- AACGTCACGGAAATGAAGCTTTGCG -3'	5'- CTGAAACGGYACGCTGTCATGGATG -3'
<i>surfA</i>	5'- AGTATGGGAGGCATGGTCGCTTTCA -3'	5'- CCATCCGTCCGCATCTTTGATACAT -3'

2.1.4.5 Ανάλυση δεοξυριβονουκλεϊκών οξέων σε πήκτωμα αγαρόζης

Μετά την ενίσχυση των τμημάτων DNA που μας ενδιαφέρουν, πραγματοποιείται ο έλεγχος του μεγέθους και της ποιότητας των τμημάτων DNA, μέσω του διαχωρισμού των μορίων σε πήκτωμα αγαρόζης (1,2 % w/v), υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου. Η προσθήκη βρωμιούχου αιθιδίου στο διάλυμα αγαρόζης είναι απαραίτητη προκειμένου τα τμήματα DNA να γίνουν ορατά υπό την έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία. Το βρωμιούχο αιθίδιο, έχει την ικανότητα να παρεμβάλλεται στην μεγάλη αύλακα του DNA, με αποτέλεσμα τμήματα DNA, που είναι τουλάχιστον 10 ng, να φθορίζουν. Με την ολοκλήρωση της ηλεκτροφόρησης, το πήκτωμα αγαρόζης τοποθετείται σε ειδικό μηχάνημα, για την έκθεσή του σε υπεριώδη ακτινοβολία. Ο φθορισμός που παράγεται ανιχνεύεται με κατάλληλη συσκευή απεικόνισης, που αποθηκεύει την εικόνα του πηκτώματος. Σε επόμενο στάδιο πραγματοποιήθηκε η αξιολόγηση της ποιότητας του γονιδιωματικού DNA, καθώς και ο προσδιορισμός του μεγέθους του.

2.1.4.6 Ποσοτικός προσδιορισμός του DNA με φασματοσκοπική ανάλυση

Μια από τις πιο συχνά χρησιμοποιούμενες τεχνικές για τον ποσοτικό προσδιορισμό του DNA είναι η φασματοφωτομετρική ανάλυση, με τη χρήση φασματοφωτόμετρου μικροποσοτήτων. Η φασματοφωτομετρική ανάλυση βασίζεται στην ιδιότητα των νουκλεϊκών οξέων να απορροφούν την υπεριώδη ακτινοβολία, σε συγκεκριμένο μήκος κύματος. Στο παρόν πείραμα όπου τα δείγματα είναι τμήματα DNA, η υπεριώδη ακτινοβολία που θα απορροφηθεί ήταν μήκους κύματος 260 nm. Η μέτρηση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση φασματοφωτόμετρου τύπου NanoDrop® ND1000 Spectrophotometer, το οποίο συνδέεται σε οθόνη υπολογιστή για την καταγραφή της οπτικής πυκνότητας (OD) και αξιολόγηση των αποτελεσμάτων.

2.1.4.7 Αλληλούχιση νουκλεοτιδικών ακολουθιών (sequencing)

Αφού έγινε καθαρισμός του γενωμικού DNA μέσω πρωτοκόλλου του *NucleoSpin® Plasmid* της Macherey- Nagel, πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση προκειμένου να επιβεβαιωθεί η παρουσία του επιθυμητού τμήματος DNA. Το υπόλοιπο δείγμα, στάλθηκε για αλληλούχιση.

2.1.4.8 Φυλογενετική κατάταξη βακτηρίων

Η φυλογενετική ανάλυση των ενδοφυτικών βακτηρίων πραγματοποιήθηκε με βάση τη νουκλεοτιδική αλληλουχία της 16S rRNA περιοχής σε σύγκριση με τις διαθέσιμες

αλληλουχίες της βάσης δεδομένων IMG (Integrated Microbial Genomes) καθώς και μεταξύ των διαφορετικών απομονωμένων στελεχών, χρησιμοποιώντας τη μηχανή αναζήτησης BLAST (Basic Local Alignment Tool) και του nBLAST (Nucleotide BLAST) (Zhang et al., 2000) του NCBI (US National Center for Biotechnological Information) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Έπειτα πραγματοποιήθηκε πολλαπλή στοίχιση των διαθέσιμων υποκλώνων των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών μέσω του αλγόριθμου πολλαπλής ευθυγράμμισης Clustal W, του προγράμματος MEGA 6.0.

Τα φυλογενετικά δέντρα κατασκευάστηκαν με τη μέθοδο Neighbor-Joining (Saitou and Nei, 1987), μέσω του προγράμματος MEGA 6.0 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) (Tamura et al., 2011). Η αξιοπιστία και η σταθερότητα των σχέσεων του δενδρογράμματος εκτιμήθηκε μέσω 1000 bootstrap δειγμάτων.

2.2 Διαφοροποίηση των βακτηρίων

2.2.1 Μέθοδος της ταυτόχρονης διπλής ομαδικής κίνησης βακτηρίων (swarm boundary assay)

Αρχικά, τα βακτηριακά στελέχη αναπτύσσονται σε 5 ml υγρού θρεπτικού μέσου NB σε θάλαμο ανάπτυξης συνεχούς ανάδευσης, ρυθμισμένος στους 28 °C. Μετά από 19-20 h, πραγματοποιείται ο εμβολιασμός των βακτηρίων (5 µl) ανά ζευγάρια, σε ημιστερεό θρεπτικό μέσο NA στερεοποιημένο με 0,5 % (w/v) άγαρ. Η απόσταση μεταξύ των δύο βακτηρίων είναι 3 cm, ενώ το κάθε σημείο εμβολιασμού απέχει 3 cm από την άκρη του τρυβλίου. Μετά την ολοκλήρωση των εμβολιασμών, τα τρυβλία τοποθετούνται σε θάλαμο ανάπτυξης, στους 28 °C για συνολικά 8 ημέρες. Η αποτύπωση των τρυβλίων πραγματοποιήθηκε σε καθημερινή βάση.

2.3 Άμεσοι και έμμεσοι μηχανισμοί που προάγουν την ανάπτυξη των φυτών (PGP- traits) *in vitro*

2.3.1 Παραγωγή σιδηροφόρων με τη μέθοδο Chrome Azurol S (CAS) Agar

Η πιο γνωστή μέθοδος ελέγχου παραγωγής σιδηροφόρων είναι η μέθοδος του Chrome Azurol S (CAS) Agar που ανέπτυξαν οι Schwyn και Neillands, (1987). Η αρχή αυτής της μεθόδου στηρίζεται στον ανταγωνισμό για σίδηρο μεταξύ του συμπλόκου σιδήρου (τρισθενούς σιδήρου) της χρωστικής chrome Azurol S και του παραγόμενου σιδηροφόρου.

A. Προετοιμασία του διαλύματος του δείκτη μεταχρωματισμού Fe-CAS

- Διάλυμα 1
Διαλυτοποίηση 0.06 g της CAS (Fluka) (1.21 mg ml^{-1}) σε 50 ml ddH₂O
- Διάλυμα 2
Διαλυτοποίηση 0.0027 g FeCl₃ · 6H₂O (1mM) σε 10 ml HCl (10 mM)
- Διάλυμα 3
Διαλυτοποίηση 0.073 g HDTMA (1.83 mg ml^{-1}) σε 40 ml ddH₂O

Μετά την ολοκλήρωση της προετοιμασίας των διαλυμάτων, το διάλυμα 2 προστέθηκε στο διάλυμα 1 με αργή ανάμιξη και ταυτόχρονη συνεχή ανάδευση σε μαγνητικό αναδευτήρα. Μετά την ομογενοποίηση των παραπάνω διαλυμάτων, έγινε η αργή προσθήκη τους στο διάλυμα 3 με συνεχή ανάδευση. Τα τρία διαλύματα καθ' όλη τη διάρκεια της προετοιμασίας τους καθώς και κατά την ανάμιξή τους ήταν καλυμμένα με αλουμινόχαρτο. Το τελικό διάλυμα αποστειρώθηκε στους 121°C για 20 min, ενώ μετά το πέρας της αποστείρωσης ψύχθηκε ως τους 50°C μέχρι την ανάμιξή του με το θρεπτικό διάλυμα (Schwyn και Neilands, 1987; Alexander D.B. και Zuberer D.A., 1991)

B. Προετοιμασία θρεπτικού διαλύματος

Το θρεπτικό μέσο ανάπτυξης που χρησιμοποιήθηκε για την ανάμιξη του με το διάλυμα του δείκτη μεταχρωματισμού Fe-CAS ήταν το King's B. Το διάλυμα Kings' B, στερεοποιημένο με άγαρ 1,5 % δημιουργήθηκε και αποστειρώθηκε ξεχωριστά από το διάλυμα του δείκτη μεταχρωματισμού. Μετά την ολοκλήρωση της αποστείρωσης τα δύο διαλύματα αναμίχθηκαν με συνεχή ανάδευση όταν η θερμοκρασία τους έφτασε τους 50°C.

Μετά τη στερεοποίηση του CAS θρεπτικού μέσου σε τρυβλία Petri, 10 μl υγρής βακτηριακή καλλιέργειας εμβολιάστηκαν σε πηγαδάκια διαμέτρου 3mm στο κέντρο του τρυβλίου. Μετά από επώαση στους 28°C για 2-5 ημέρες η παραγωγή σιδηροφόρων παρατηρήθηκε με το μεταχρωματισμό του τρυβλίου από βαθύ μπλε σε πορτοκαλί στο σημείο του εμβολιασμού.

2.3.2 Διαλυτοποίηση του φωσφόρου με τη μέθοδο Pikovskaya's Agar (PVK)

Η πιο γνωστή και ευρεία μέθοδος διαλυτοποίησης μη αφομοιώσιμου φωσφόρου *in vitro* είναι η μέθοδος Pikovskaya's Agar (Pikovskaya, 1948). Η έκκριση φωσφορικών οξέων και ενζύμων φωσφατάσης είναι οι πιο γνωστοί μηχανισμοί μετατροπής μη αφομοιώσιμου φωσφόρου σε διαθέσιμη πηγή φωσφόρου για τα φυτά. Στην παρούσα μέθοδο το φωσφορικό ασβέστιο [Ca₃(PO₄)₂] εφαρμόστηκε ως πηγή του αδιάλυτου συμπλοκοποιημένου φωσφόρου.

Η διαλυτοποίηση του φωσφόρου επιβεβαιώνεται με την εμφάνιση διαφανούς άλω γύρω από το σημείο εμβολιασμού του βακτηρίου.

Για τη δημιουργία του διαλύματος PVK αναμίχθηκαν τα παρακάτω συστατικά:

- 10 g γλυκόζη (glucose)
- 0,5 g εκχύλισμα ζύμης (yeast extract)
- 5 g φωσφορικό ασβέστιο ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$)
- 0,5 g θειικό αμμώνιο ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$)
- 0,2g χλωριούχο κάλιο (KCl)
- 0,1 g χλωριούχο μαγνήσιο (MgCl_2)
- 0,0001 g θειικό μαγγάνιο (MnSO_4)
- 0,0001 g θειικό σίδηρο (FeSO_4)
- 15 g άγαρ
- 1000 ml dH₂O

Το διάλυμα αποστειρώθηκε στους 121°C για 20 min και στη συνέχεια στερεοποιήθηκε σε τρυβλία Petri. Σε πηγαδάκι διαμέτρου 3mm έγινε ο εμβολιασμός υγρής καλλιέργειας βακτηρίου (10 μl). Τα τρυβλία επωάστηκαν στους 28°C για 3-5 ημέρες μέχρι το σχηματισμό διάφανης άλω γύρω από το σημείο εμβολιασμού του βακτηρίου (Pikovskaya 1948).

2.3.3 Παραγωγή ινδολοξικού οξέος (IAA)

Η παραγωγή ινδολοξικού οξέος σε υγρή βακτηριακή καλλιέργεια ανιχνεύθηκε με την τροποποιημένη μέθοδο που αναπτύχθηκε από τους Loper και Schroth, (1986). Τα βακτήρια αναπτύχθηκαν στους 28°C για 48 ώρες σε υγρό θρεπτικό μέσο NB (Nutrient Broth) με την προσθήκη 1% L- τρυπτοφάνης. Η L-τρυπτοφάνη αποτελεί το απαραίτητο πρόδρομο αμινοξύ για την παραγωγή του IAA ή άλλων ανάλογων ενώσεων IAA. Μετά την πλήρη ανάπτυξη των καλλιεργειών ακολούθησε φυγοκέντρηση (5000 rpm για 15 min). Το διαυγές υπερκείμενο (2ml) κάθε καλλιέργειας αναμίχθηκε με 2 σταγόνες ορθοφωσφορικού οξέος (H_3PO_4) και 4ml του αντιδραστήριου Salkowski (2% 0.5 M FeCl_2 διαλυμένο σε 35% HClO_4). Στη συνέχεια το διάλυμα επωάστηκε στο σκοτάδι για 30 min μέχρι να ολοκληρωθεί ο μεταχρωματισμός του διαλύματος από απαλό κίτρινο σε ροζ- κόκκινο. Συγκεκριμένα όταν το αντιδραστήριο αναμιγνύεται με το IAA, δημιουργείται ένα σύμπλοκο τρις-(ινδόλη-3-ακετάτο)σιδήρουIII [(tris-(indole-3-acetato)iron(III)), ($\text{Fe}[(\text{C}_8\text{H}_6\text{N})\text{CH}_2\text{COO}]_3$)], που ευθύνεται για το ροζ μεταχρωματισμό.

2.3.4 Παραγωγή αμμωνίας

Η ανίχνευση της ικανότητας των βακτηρίων να παράγουν αμμωνία παρατηρείται μετά την ανάπτυξη των βακτηρίων σε υγρό θρεπτικό μέσο PW (peptone water) που περιείχε 4%

πεπτόνη. Καλλιέργειες βακτηρίων 20 ωρών εμβολιάστηκαν σε 10ml PW και επωάστηκαν για 72 h στους 28°C. Μετά από 72 h γίνεται η προσθήκη 0.5 ml του αντιδραστηρίου Nessler που έχει ως αποτέλεσμα το μεταχρωματισμό της υγρής καλλιέργειας από κίτρινο σε σκούρο καφέ, υποδηλώνοντας την παραγωγή αμμωνίας (Dye, 1962; Carruccino και Sherman, 1992).

2.3.5 Παραγωγή ακετοΐνης

Η ανίχνευση των βακτηρίων που παράγουν ακετοΐνη πραγματοποιήθηκε με το *in vitro* τεστ Voges-Proskauer (VP-test) (McDevitt, 2009). Όγκος 10 μl από υγρή προκαλλιέργεια του βακτηρίου εμβολιάζεται σε 5 ml υγρού θρεπτικού μέσου MR-VP και επωάζεται για 48 h στους 30 °C.

Για τη δημιουργία του MR-VP αναμιγνύονται σε 1000 ml dH₂O με τελικό pH 6.9 (± 0.2) :

- 7.0 g πεπτόνη (buffered peptone)
- 5.0 g φωσφορικό κάλιο (K₂HPO₄)
- 5.0 g γλυκόζη (glucose)

Μετά από 48 h επώασης, όγκος 2,5 ml καλλιέργειας φυγοκεντρώνται (10.000 rpm/ 15 min) και το υπερκείμενο της καλλιέργειας μεταφέρεται σε γυάλινο μπουκαλάκι. Στη συνέχεια προστίθενται στο υπερκείμενο 600 μl του αντιδραστηρίου Barritt's reagent A (5% (w/v) *α*-naphthol διαλυμένη σε καθαρή αιθανόλη) και 200 μl του αντιδραστηρίου Barritt's reagent B (40% (w/v) διάλυμα NaOH). Ακολουθεί ήπια ανάδευση του διαλύματος για 1 min και στη συνέχεια παραμένει στον πάγκο για επιπλέον 30 min, μέχρι το μεταχρωματισμό του υγρού μέσου. Ο μεταχρωματισμός του υγρού μέσου από απαλό κίτρινο σε έντονο ροζ υποδεικνύει τη θετική ένδειξη για την ικανότητα παραγωγής ακετοΐνης.

2.3.6 Παραγωγή κυτταρινολυτικών ενζύμων

Η παραγωγή κυτταρινολυτικών ενζύμων ανιχνεύθηκε με τη μέθοδο που αναπτύχθηκε από τους Theater και Wood, (1981). Όγκος 10 μl υγρής βακτηριακής προκαλλιέργειας εμβολιάζεται σε πηγαδάκι διαμέτρου 3 mm σε θρεπτικό μέσο CYEA (Casein Yeast Extract Agar) με την προσθήκη 1% CMC (Carboxymethyl cellulose). Οι ακριβείς αναλογίες των συστατικών του θρεπτικού σε 1000 ml dH₂O είναι οι ακόλουθες:

- 0,5 % καζεΐνη (casein)
- 0,25% εκχύλισμα ζύμης (yeast extract)
- 0,1% γλυκόζη (glucose)
- 1% καρβοξυμεθυλοκυτταρίνη (carboxymethyl cellulose)
- 1,8% άγαρ

Αρχικά ενοποιούνται τα θρεπτικά συστατικά casein, yeast extract και glucose μέχρι την πλήρη διαλυτοποίησή τους και στη συνέχεια πραγματοποιείται η πολύ αργή προσθήκη του διαλύματος carboxymethyl cellulose. Στη συνέχεια το ομογενοποιημένο θρεπτικό διάλυμα αποστειρώνεται στους 121°C/ 20 min και στερεοποιείται σε τρυβλία Petri. Τα βακτήρια εμβολιάζονται στο κέντρο του τρυβλίου σε πηγαδάκι διαμέτρου 3mm και επωάζονται σε θάλαμο ανάπτυξης σε θερμοκρασία 30°C για 72h.

2.3.6.1 Χρώση των τρυβλίων με τη χρωστική Congo Red

Μετά το πέρας της επώασης των βακτηρίων, γίνεται η προσθήκη 2ml της διαλυμένης χρωστικής Congo Red (1mg/ml) σε κάθε τρυβλίο ξεχωριστά και αφήνονται για επώαση για 15 min. Έπειτα, απομακρύνεται η χρωστική και γίνεται η προσθήκη 1M NaCl, προκειμένου να γίνει αποχρωματισμός του τρυβλίου (15 min). Ο σχηματισμός διαφανούς άλω υδρόλυσης γύρω από το σημείο εμβολιασμού των βακτηρίων και ο χρωματισμός της με τη χρωστική Congo Red σε κόκκινο, επιβεβαιώνει την παραγωγή κυτταρολυτικών ενζύμων. Η μέθοδος βασίζεται στο ισχυρό σύμπλοκο που σχηματίζει η χρωστική Congo Red με τους πολυσακχαρίτες, το οποίο επιτρέπει και την ανίχνευση χαμηλότερων επιπέδων ενζυμικής δραστηριότητας.

2.3.7 Παραγωγή πρωτεολυτικών ενζύμων

Η παραγωγή πρωτεολυτικών ενζύμων ανιχνεύθηκε με τη μέθοδο που αναπτύχθηκε από τους Smibert και Krieg, (1994). Όγκος 10 μl υγρής βακτηριακής προκαλλιέργειας εμβολιάζεται σε πηγαδάκι διαμέτρου 3 mm του θρεπτικού μέσου ανάπτυξης CYEA (Casein Yeast Extract Agar) εμπλουτισμένο με 7% αποβουτυρωμένο γάλα σε σκόνη (Skim milk powder). Μετά από 48 h επώασης των τρυβλίων στους 30°C, παρατηρείται η εμφάνιση καθαρής άλω γύρω από το σημείο εμβολιασμού του βακτηρίου επιβεβαιώνοντας την παραγωγή πρωτεολυτικών ενζύμων.

2.3.8 Παραγωγή χιτινολυτικών ενζύμων

Η διερεύνηση παραγωγής χιτινολυτικών ενζύμων πραγματοποιήθηκε με μία παραλλαγή της μεθόδου που αναπτύχθηκε από τους Roberts και Selitrennikoff, (1988).

2.3.8.1 Παραγωγή κολλοειδών χιτίνης (Colloidal Chitin Preparation)

Τα κολλοειδή χιτίνης προετοιμάστηκαν από χιτίνη απομονωμένη από κέλυφος καβουριού (Crab-shell chitin, Sigma-Aldrich).

- Η όξινη υδρόλυση της χιτίνης πραγματοποιείται με την προσθήκη 70ml πυκνού HCl 37% σε 5 g χιτίνης με συνεχή ανάδευση
- Στη συνέχεια το μίγμα αφήνεται για επώαση στους 4°C για 24 h με συνεχή ανάδευση σε μαγνητικό αναδευτήρα
- Στο κolloειδές ίζημα που προκύπτει γίνεται η προσθήκη 250ml παγωμένης αιθανόλης (-20°C) με ταυτόχρονη συνεχή ανάδευση του μίγματος
- Τέλος, πραγματοποιείται καλό ξέπλυμα του ιζήματος με 2 L dH₂O, μέχρι την πλήρη απομάκρυνση της αιθανόλης
- Αποθήκευση των κolloειδών χιτίνης στους 4°C, μέχρι την επόμενη χρήση τους.

2.3.8.2 Προετοιμασία θρεπτικού διαλύματος

Σε στερεό θρεπτικό μέσο NA γίνεται η προσθήκη 1% κolloειδών χιτίνης με συνεχή ανάδευση, μέχρι τη πλήρη διάλυσή τους. Για τη στερεοποίηση του διαλύματος γίνεται η τελική προσθήκη 1,5 % (w/v) άγαρ. Μετά την αποστείρωση του διαλύματος στους 121 °C για 20 min, το διάλυμα στερεοποιείται σε τρυβλία Petri.

Όγκος 10 μl από υγρές καλλιέργειες βακτηρίων εμβολιάζεται στο κέντρο του τρυβλίου σε πηγαδάκι διαμέτρου 3mm και επωάζονται στους 30 °C για 72 h. Ο σχηματισμός άλω γύρω από το σημείο εμβολιασμού επιβεβαιώνει την παραγωγή χιτινάσης, ενζύμου υπεύθυνου για τη διαλυτοποίηση της χιτίνης.

2.3.9 Ανάπτυξη βακτηρίων σε ακραίες τιμές pH

Η μελέτη της επιβίωσης των βακτηρίων σε διαφορετικό εύρος pH (pH 5.5, pH 6.8 και pH 8.5) πραγματοποιείται σε στερεό θρεπτικό μέσο NA, το οποίο αποτελεί το βασικό υπόστρωμα ανάπτυξης των βακτηρίων με τιμή pH 6.8. Η οξίνιση του θρεπτικού μέσου NA γίνεται με την προσθήκη σταγόνων διαλύματος 3N-HCl φτάνοντας σε τελικό pH 5.5. Η ρύθμιση του pH του υποστρώματος σε τιμή 8.5 γίνεται με την προσθήκη κατάλληλων σταγόνων διαλύματος 10N NaOH. Μετά τη ρύθμιση του pH ακολουθεί η προσθήκη 1,5 % (w/v) άγαρ για τη στερεοποίηση των θρεπτικών, γίνεται η αποστείρωσή τους στους 121°C για 20 min και τελικά γίνεται η στερεοποίησή τους σε τετράγωνα τρυβλία Petri (11 cm x 11 cm). Όγκος 10 μl προκαλλιέργειας βακτηρίων εμβολιάζεται στη συνέχεια με τη μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων, ξεκινώντας από την πυκνή και φτάνοντας μέχρι την αραιώση 10⁻⁷. Για κάθε βακτήριο πραγματοποιείται διπλή επανάληψη του εμβολιασμού. Μετά την ολοκλήρωση των εμβολιασμών, τα τρυβλία τοποθετούνται σε θάλαμο ανάπτυξης θερμοκρασίας 30°C και τα βακτήρια επωάζονται για 24 h μέχρι την καταγραφή των αποτελεσμάτων.

2.3.10 Ανάπτυξη βακτηρίων σε ακραίες θερμοκρασίες

Η μελέτη της ανθεκτικότητας των βακτηρίων σε ακραίο θερμοκρασιακό εύρος ελέγχθηκε σε θερμοκρασίες 5°C, 25°C και 45°C. Όγκος 10 μl προκαλλιέργειας βακτηρίων εμβολιάζεται με τη μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων (με διπλή επανάληψη του εμβολιασμού), ξεκινώντας από την πυκνή και φτάνοντας μέχρι την αραιώση 10^{-6} , σε θρεπτικό μέσο NA. Μετά την ολοκλήρωση των εμβολιασμών, τα τρυβλία τοποθετούνται σε θάλαμο ανάπτυξης αντίστοιχων θερμοκρασιών και επωάζονται για 24h μέχρι την καταγραφή των αποτελεσμάτων.

2.3.11 Ανάπτυξη βακτηρίων σε υπόστρωμα με ακραία συγκέντρωση σε αλατότητα (1% και 5% NaCl)

Σε στερεό θρεπτικό μέσο NA (1,5 % (w/v) άγαρ) γίνεται η προσθήκη 1 % (w/v) NaCl ως χαμηλή συγκέντρωση σε αλατότητα και 5% (w/v) NaCl ως υψηλή. Μετά την αποστείρωση των θρεπτικών στους 121°C για 20 min γίνεται η στερεοποίηση των θρεπτικών σε τετράγωνα τρυβλία Petri (11 cm x 11 cm). Ο εμβολιασμός προκαλλιέργειας βακτηρίων (10 μl) γίνεται με τη μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων ξεκινώντας από την πυκνή και φτάνοντας μέχρι την αραιώση 10^{-6} , για την καταγραφή της ικανότητας επιβίωσης των βακτηρίων κατά την ελάχιστη δυνατή συγκέντρωσή τους. Για κάθε βακτήριο πραγματοποιείται διπλή επανάληψη του εμβολιασμού. Μετά την ολοκλήρωση των εμβολιασμών, τα τρυβλία τοποθετούνται σε θάλαμο ανάπτυξης θερμοκρασίας 30°C και τα βακτήρια επωάζονται για 24 h μέχρι την καταγραφή των αποτελεσμάτων.

2.3.12 Ανθεκτικότητα βακτηρίων σε διάφορες αντιβιοτικές ενώσεις

Η ανθεκτικότητα των βακτηρίων μελετήθηκε για τις αντιβιοτικές ενώσεις Τετρακυκλίνη (Tetracycline), Αμπικιλίνη (Ampicillin), Καναμυκίνη (Kanamycin), Στρεπτομυκίνη (Streptomycin) και Ριφαμπικίνη (Rifampicin). Αρχικά, τα βακτήρια εμβολιάζονται σε 5 ml υγρού θρεπτικού μέσου NB και επωάζονται για 24 h στους 28 °C. Στη συνέχεια, γίνεται η μεταφορά 1 ml προκαλλιέργειας σε φλάσκα των 50 ml με φρέσκο θρεπτικό NB και επωάζεται στους 30 °C μέχρι τελικό $OD_{600} = 0.45-0.55$ ($\sim 10^8$ cfu/ ml). Στη συνέχεια 1 ml βακτηριακής καλλιέργειας αναμιγνύεται σε 30 ml NA (0,7 % w/v άγαρ) και με τη μέθοδο του εμβολιασμού σε διπλή στοιβάδα (Top agar), γίνεται η επίστρωση του σε 20 ml θρεπτικού μέσου NA στερεοποιημένο με άγαρ 1,5 % (w/v) (Bottom agar). Έπειτα, γίνεται η εφαρμογή

των αντιβιοτικών ενώσεων σε διαφορετικές συγκεντρώσεις όπως αναγράφεται στον Πίνακα 2.3:

Πίνακας 2.3 Αναγραφή των αντιβιοτικών και των συγκεντρώσεων που εφαρμόστηκαν

	Συγκέντρωση αντιβιοτικού (mg/ ml)		
Τετρακυκλίνη (Tetracycline)	5	10	20
Αμπικιλλίνη (Ampicillin)	50	100	200
Καναμυκίνη (Kanamycin)	25	50	100
Στρεπτομυκίνη (Streptomycin)	50	100	200
ΡΙφαμπικίνη (Rifampicin)	25	50	100

Τέλος, τα τρυβλία τοποθετούνται σε θάλαμο ανάπτυξης των 30 °C όπου και επωάζονται για 24h μέχρι την καταγραφή των αποτελεσμάτων.

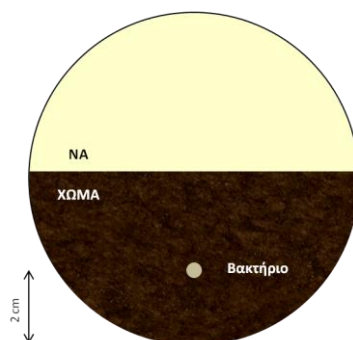
2.3.13 Κινητικότητα βακτηρίων *in vitro*

2.3.13.1 Ομαδική (swarming) και κολυμβητική κίνηση (swimming) βακτηρίων

Η μελέτη της κίνησης των βακτηρίων πραγματοποιείται σε *in vitro* συνθήκες με τον εμβολιασμό υγρής καλλιέργειας βακτηρίων σε θρεπτικό μέσο NA στερεοποιημένο με άγαρ 0,5 % (ομαδική κίνηση) και 0,3 % (κολυμβητική κίνηση). Αρχικά τα βακτήρια εμβολιάζονται σε όγκο 5 ml θρεπτικού διαλύματος NB και επωάζονται σε θάλαμο ανάπτυξης υπό ανάδευση για 19-20 h (overnight), στους 28 °C. Στη συνέχεια, όγκος 5 μl της υγρής βακτηριακής προκαλλιέργειας εμβολιάζεται στο κέντρο του τρυβλίου που περιέχει το ημιστερεό θρεπτικό μέσο και επωάζεται στους 28 °C για 24 h. Μετά την επώασή τους πραγματοποιήθηκε η φωτογραφική αποτύπωση της κίνησης των βακτηρίων (3 επαναλήψεις/ βακτηριακό στέλεχος/ μεταχείριση). Ο υπολογισμός της επιφάνειας κάλυψης του τρυβλίου που καταλαμβάνεται από τα κινούμενα βακτηριακά στελέχη έγινε με τη βοήθεια του λογισμικού προγράμματος ImageJ.

2.3.13.2 Κίνηση των βακτηρίων στο χόμα

Σε τρυβλίο Petri που περιέχει θρεπτικό μέσο NA στερεοποιημένο με άγαρ 0,5 %, χαράσσεται κάθετα με νυστέρι στο μέσο του τρυβλίου και αφαιρείτε με σπάτουλα το μισό θρεπτικό μέσο. Στη θέση του θρεπτικού γίνεται η προσθήκη αποστειρωμένου φυτοχώματος υγρασίας 50 % και 100 %, όπως φαίνεται και στο παρακάτω Σχήμα 2.1:



Σχήμα 2.1 Σχηματική αναπαράσταση για τον έλεγχο της κίνησης των βακτηρίων στο χώμα.

Ο εμβολιασμός υγρής καλλιέργειας βακτηρίου στο χώμα πραγματοποιείται σε απόσταση 2 cm από την άκρη του τρυβλίου. Μετά την ολοκλήρωση του εμβολιασμού, τα τρυβλία τοποθετούνται κάθετα στους 30 °C (αντίθετα από την κίνηση του βακτηρίου) και επωάζονται για όσες μέρες χρειαστεί προκειμένου τα βακτήρια να κινηθούν από το χώμα προς το θρεπτικό μέσο NA.

2.3.14 Σχηματισμός βιοϋμενίου (biofilm)

Τα βιοϋμένια (biofilm) είναι μικροβιακές κοινότητες στις οποίες ένας πληθυσμός διαφοροποιημένων κυττάρων είναι εγκλωβισμένα μέσα σε μία αυτοκατασκευασμένη εξωκυτταρική κατασκευή. Τα βακτήρια που έχουν την ικανότητα να σχηματίζουν βιοϋμένια, έχουν σημαντικό πλεονέκτημα στον αποικισμό των ριζών και τελικά στην ανάπτυξη και προστασία των φυτών. Η ικανότητα των βακτηρίων να σχηματίζουν βιοϋμένιο μελετήθηκε σύμφωνα με τη μέθοδο που αναπτύχθηκε από τον O'Toole (2011) και περιγράφεται παρακάτω:

1. Ανάπτυξη βακτηριακών καλλιεργειών σε υγρό θρεπτικό μέσο NB για 20 h
2. Αραίωση της καλλιέργειας 1:100 σε φρέσκο θρεπτικό μέσο NB
3. Μεταφορά 100 μl της αραιωμένης καλλιέργειας σε κάθε πηγαδάκι της πλάκας σχηματισμού βιοϋμενίου των 96- πηγαδιών (microtitre well plates), (έξι πηγαδάκια/ βακτήριο)
4. Προσθήκη 100 μl φρέσκο NB σε μία σειρά πηγαδιών ως αρνητικός μάρτυρας
5. Κάλυψη της πλάκας με ειδική κολλώδη ταινία και επώαση στους 30°C για 24h

Μετά την ολοκλήρωση της επώασης των βακτηρίων γίνεται η απομάκρυνση των αιωρούμενων κυττάρων και ο χρωματισμός εκείνων που έχουν προσκολληθεί στην επιφάνεια των πηγαδιών με το σχηματισμό βιοϋμενίου. Τα βήματα που πραγματοποιούνται είναι τα εξής:

1. Απομάκρυνση των καλλιιεργειών από κάθε πηγαδάκι με τη βοήθεια πιπέτας
2. Προσεκτικό ξέπλυμα των πηγαδιών με αποστειρωμένο dH₂O προκειμένου να απομακρυνθούν κύτταρα που δεν έχουν προσκολληθεί καλά στην πλάκα (τρεις επαναλήψεις)
3. Στέγνωμα της πλάκας σε αέρα στους 30°C για 30 min
4. Προσθήκη 200 μl χρωστικής 0,1% (w/v) κρυσταλλικού ιώδους (Crystal violet) σε κάθε πηγαδάκι και επώαση για 20 min
5. Προσεκτικό ξέπλυμα των πηγαδιών με αποστειρωμένο dH₂O προκειμένου να απομακρυνθούν κύτταρα που δεν έχουν προσκολληθεί καλά στην πλάκα (τρεις επαναλήψεις)
6. Προσθήκη 200 μl (v/v) διαλύματος ακετόνης: αιθανόλης (1:4) και επώαση για 20 min

Η ποσοτικοποίηση της έντασης της χρωστικής πραγματοποιήθηκε με τη μέτρηση της ατομικής της απορρόφησης σε OD₆₀₀ προσθέτοντας 100 μl από κάθε πηγαδάκι σε 900 μl διαλύματος ακετόνης: αιθανόλης (1:4) φτάνοντας τελικά σε όγκο 1 ml.

* Για τη δημιουργία των μιγμάτων βακτηρίων, έγινε ένα επιπλέον βήμα μετά την προκαλλιέργεια των βακτηρίων, με τον εμβολιασμό τους σε φλάσκα NB των 50 ml μέχρι να φτάσουν σε τελικό OD₆₀₀ = 0.45-0.55. Έπειτα, έγινε η ανάμιξη των βακτηριακών σε αναλογία 1:1 και ακολούθησαν τα επόμενα βήματα της μεθόδου.

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

Η μέθοδος της κατάρρευσης της σταγόνας βασίζεται στην αμφίφιλη δομή των επιφανειοδραστικών ενώσεων (de Bruijn & Raaijmakers, 2009). Οι επιφανειοδραστικές ενώσεις εξαιτίας της ταυτόχρονης υδρόφιλης και υδρόφοβης δομής τους μειώνουν την επιφανειακή και διεπιφανειακή τάση. Επομένως όταν διαλύματα που διαθέτουν ισχυρές επιφανειοδραστικές ενώσεις βρεθούν σε ελαιώδεις επιφάνειες, έχουν ως αποτέλεσμα να μη σχηματίζουν σταθερές σταγόνες και τελικά να καταρρέουν. Τα βήματα που πραγματοποιήθηκαν για την ανίχνευση της ύπαρξης ισχυρών επιφανειοδραστικών ενώσεων ήταν τα εξής:

- Μεταφορά 1 ml υγρής βακτηριακής καλλιέργειας επώασης 48h σε eppendorf των 1,5 ml
- Φυγοκέντρωση για 2 min σε 11.000x g
- Απομάκρυνση υπερκείμενου σε νέο eppendorf

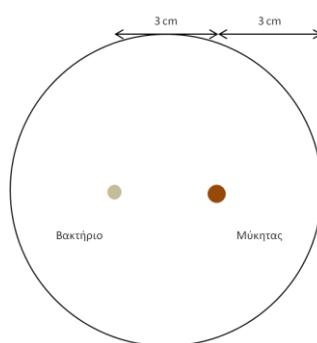
- Τοποθέτηση 25 μl καθαρού υπερκείμενου σε parafilm (ελαιώδης επιφάνεια) και αναμονή μέχρι την κατάρρευση της σταγόνας

Ως θετικός μάρτυρας εφαρμόστηκε μια σταγόνα ορυκτέλαιου και ως αρνητικός μάρτυρας μια σταγόνα dH₂O (25 μl). Για την καλύτερη αποτύπωση των αποτελεσμάτων έγινε η προσθήκη 2 μl της χρωστικής Evans Blue σε κάθε σταγόνα, η οποία δεν επηρεάζει η δομή της σταγόνας.

2.4 Ανταγωνιστική δράση βακτηρίων *in vitro*

2.4.1 Μέθοδος της ταυτόχρονης διπλής καλλιέργειας (dual culture) μεταξύ μύκητα και βακτηρίου

Η *in vitro* μέθοδος της ταυτόχρονης διπλής καλλιέργειας (dual culture) μεταξύ ανταγωνιστικών βακτηριακών στελεχών και φυτοπαθογόνων μυκήτων, πραγματοποιείται σε τρυβλία Petri, όπως περιγράφεται στη σχηματική αναπαράσταση παρακάτω (Σχ. 2.2).



Σχήμα 2.2 Σχηματική αναπαράσταση της ταυτόχρονης διπλής καλλιέργειας (Dual culture) βακτηρίου και μύκητα για τη μελέτη της αντιβιοτικής δράσης των βακτηρίων.

Το θρεπτικό μέσο ανάπτυξης που χρησιμοποιήθηκε για τη μελέτη της ανταγωνιστικής δράσης των βακτηρίων εναντίον των φυτοπαθογόνων μυκήτων είναι το ΝΑ στερεοποιημένο με άγαρ 1,5 % (w/v) και 0,5 % (w/v). Για τη μελέτη της επίδρασης των υπερκείμενων απομονωμένων ενώσεων των βακτηρίων χρησιμοποιήθηκε επίσης ΝΑ στερεοποιημένο με άγαρ 1,5 % (w/v). Η απόσταση μεταξύ του μύκητα και του βακτηρίου ή των υπερκείμενων ενώσεων ήταν 3 cm.

Κομμάτι (5 mm) στερεής καλλιέργειας μύκητα 5 ημερών τοποθετήθηκε 3 cm από την άκρη του τρυβλίου και επώσθηκε στους 25°C για 48 h μέχρι τον εμβολιασμό του βακτηρίου και τελικά τη μελέτη της ταυτόχρονης διπλής καλλιέργειας σε θρεπτικό με 0,5 % (w/v) σε άγαρ. Τα βακτήρια αρχικά εμβολιάστηκαν σε 5 ml υγρού διαλύματος ΝΒ για 19-20 h και επώσθηκαν σε θάλαμο ανάπτυξης υπό ανάδευση ρυθμισμένο στους 28 °C. Όγκος 10 μl

υγρής βακτηριακής καλλιέργειας εμβολιάσθηκε 3 cm από το σημείο εφαρμογής του μύκητα. Για τη μελέτη της ταυτόχρονης διπλής καλλιέργειας σε θρεπτικό μέσο NA στερεοποιημένο με άγαρ 1,5 % (w/v), ο εμβολιασμός του βακτηρίου (10 μl) και του φυτοπαθογόνου μύκητα, πραγματοποιήθηκε ταυτόχρονα, σε ανάλογες με τις προαναφερθέντες αποστάσεις. Τα τρυβλία μεταφέρθηκαν σε θάλαμο ανάπτυξης ρυθμισμένος στους 28 °C και επώαστηκαν για 5 ημέρες.

Για τη μελέτη της επίδρασης των βακτηριακών ενώσεων που βρίσκονται στο υπερκείμενο του μέσου ανάπτυξης, τα βακτήρια αναπτύχθηκαν αρχικά σε 5 ml υγρού θρεπτικού διαλύματος NB για 48 h, σε θάλαμο ανάπτυξης υπό ανάδευση. Στη συνέχεια, 2 ml του υπερκείμενου μέσου των υγρών καλλιεργειών μεταφέρθηκε σε erpendorf των 2 ml και φυγοκεντρήθηκε στις 13.000 rpm/ 15 min. Το υπερκείμενο υγρό μεταφέρθηκε σε καινούριο erpendorf και φυγοκεντρήθηκε ξανά φυγοκεντρήθηκε στις 13.000 rpm/ 15 min. Όγκος 1,5 ml του υπερκείμενου φιλτραρίστηκε με φίλτρο 0.22 μm προκειμένου να απομακρυνθούν πλήρως τα βακτηριακά κύτταρα από το μέσο. Έπειτα, 20 μl καθαρού υπερκείμενου μέσου εμβολιάσθηκε ταυτόχρονα με τον εκάστοτε φυτοπαθογόνο μύκητα σε στερεό θρεπτικό μέσο NA (1,5 % (w/v) σε άγαρ), σε απόσταση 3 cm μεταξύ τους. Τα τρυβλία μεταφέρθηκαν σε θάλαμο ανάπτυξης ρυθμισμένος στους 28 °C και επώαστηκαν για 5 ημέρες.

Μετά το τέλος κάθε εφαρμογής, πραγματοποιήθηκε αποτύπωση των αποτελεσμάτων. Για τον υπολογισμό του εμβαδού εξάπλωσης του μύκητα κάθε μεταχείρισης όσο και των μαρτύρων, έγινε η χρήση του λογισμικού προγράμματος ImageJ.

Η μελέτη της ανταγωνιστικότητας των βακτηρίων εναντίον των φυτοπαθογόνων μυκήτων *Botrytis cinerea* και *Colletotrichum acutatum* πραγματοποιήθηκε με την ίδια μέθοδο σε θρεπτικό μέσο NA στερεοποιημένα με άγαρ 1,5 %. Η αποτύπωση των φωτογραφιών πραγματοποιήθηκε μετά από 12 ημέρες ταυτόχρονης ανάπτυξης των βακτηρίων και του φυτοπαθογόνου μύκητα.

2.4.2 Μέθοδος αναθυμιάσης με χλωροφόρμιο (CHCl₃) (chloroform vapour method)

Η μέθοδος αναθυμιάσης με χλωροφόρμιο πραγματοποιήθηκε σε τρυβλία με θρεπτικό μέσο King's B (KB) στερεοποιημένα με 0,5% και 1,5% (w/v) σε άγαρ. Τα βακτήρια αρχικά εμβολιάσθηκαν σε 5 ml υγρού διαλύματος NB για 19-20 h και επώαστηκαν σε θάλαμο ανάπτυξης υπό ανάδευση ρυθμισμένο στους 28 °C για 24h. Όγκος 10 μl υγρής βακτηριακής καλλιέργειας εμβολιάσθηκε στο κέντρο του τρυβλίου και επώαστηκε για 5 ημέρες σε θάλαμο ανάπτυξης (30°C). Μετά το πέρασμα των 5 ημερών, γίνεται αναθυμιάση των τρυβλίων για 30 min με CHCl₃. Στη συνέχεια, με τη βοήθεια αποστειρωμένου βαμβακιού γίνεται

απομάκρυνση των νεκρών βακτηριακών κυττάρων από το μέσο ανάπτυξης. Τέλος, 10 ml PDA (0,7% (w/v) agar) που εμπεριέχει 10^5 σπόρια/ ml του φυτοπαθογόνου μύκητα, εμβολιάζεται στο μέσο ως ανώτερη στρώση θρεπτικού υλικού (Top agar). Σκέτα τρυβλία King's B μεταχειρισμένα με CHCl_3 λειτούργησαν ως θετικός μάρτυρας μετά την προσθήκη του φυτοπαθογόνου μύκητα με τον ίδιο τρόπο.

2.4.3 Μέθοδος μικτής καλλιέργειας (Mixed culture)

Η μέθοδος της μικτής καλλιέργειας πραγματοποιείται μεταξύ του μελετώμενου ανταγωνιστικού βακτηρίου και του μελετώμενου φυτοπαθογόνου μύκητα. Ο μύκητας με το βακτήριο αναμιγνύονται σε υγρή καλλιέργεια σε αναλογία 1:1 (10^8 cfu/ ml βακτηρίου : 10^6 σπόρια/ ml μύκητα) και στη συνέχεια εμβολιάζονται σε θρεπτικό μέσο NA στερεοποιημένο με άγαρ 1,5 % (w/v) και 0,5 % (w/v).

2.4.4 Μέθοδος της ταυτόχρονης διπλής καλλιέργειας σε αντικειμενοφόρο πλάκα

Η μέθοδος της ταυτόχρονης διπλής καλλιέργειας σε αντικειμενοφόρο πλάκα πραγματοποιείται με σκοπό την καλύτερη μικροσκοπική παρατήρηση της αλληλεπίδρασης μεταξύ ανταγωνιστικού βακτηρίου και φυτοπαθογόνου μύκητα. Σε επιφανειακά αποστειρωμένη αντικειμενοφόρο πλάκα γίνεται η προσθήκη 1 ml NA (1% (w/v) agar). Στη συνέχεια κομμάτι μύκητα (διαμέτρου 5 mm) τοποθετείται στο κέντρο της πλάκας. Συνολικός όγκος 10 μl προκαλλιέργειας βακτηρίου εμβολιάζεται αριστερά και δεξιά του φυτοπαθογόνου μύκητα σε απόσταση 1 cm και επωάζονται για τρεις ημέρες σε θάλαμο ανάπτυξης ρυθμισμένος στους 28°C, μέχρι τη μικροσκοπική παρατήρησή τους. Η μικροσκοπική παρατήρηση πραγματοποιήθηκε σε οπτικό μικροσκόπιο Olympus BX40 και οι εικόνες αποτυπώθηκαν με την ενσωματωμένη ψηφιακή κάμερα Olympus DP71. Για την καλύτερη μικροσκοπική παρατήρηση του βακτηρίου *P. carnis* X, χρησιμοποιήθηκε το τεχνητά φθορίζον βακτηριακό στέλεχος *P. carnis* X::gfp που χορηγήθηκε ευγενικά από το εργαστήριο Γενικής και Γεωργικής Μικροβιολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

2.4.4.1 Χρώση ζωτικότητας των μυκηλιακών υφών με τη χρωστική Evans Blue

Η χρώση ζωτικότητας των υφών του φυτοπαθογόνου μύκητα σε αντικειμενοφόρο πλάκα πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τη μεθοδολογία των Mousa et al., (2015). Η χρωστική ζωτικότητας που χρησιμοποιείται είναι η Evans blue (Sigma Aldrich, Catalog #E2129), η οποία χρωματίζει τις νεκρές υφές του μύκητα. Μετά από τρεις ημέρες επώασης του φυτοπαθογόνου μύκητα και του βακτηρίου, γίνεται εφαρμογή 100 μl της χρωστικής στην

αντικειμενοφόρο πλάκα και το δείγμα επωάζεται για 3-5 min. Στη συνέχεια, γίνεται ξέπλυμα της χρωστικής από την αντικειμενοφόρο πλάκα με απιονισμένο νερό (3-4 φορές). Τέλος, τα δείγματα καλύπτονται με καλυπτρίδα για τη μικροσκοπική τους παρατήρηση (Mousa et al., 2015). Η μικροσκοπική παρατήρηση πραγματοποιήθηκε σε οπτικό μικροσκόπιο Olympus BX40 και οι εικόνες αποτυπώθηκαν με την ενσωματωμένη ψηφιακή κάμερα Olympus DP71.

2.4.5 Υπολογισμός του ποσοστού παρεμπόδισης του μύκητα

Το ποσοστό παρεμπόδισης της ανάπτυξης του μυκηλίου (% Growth inhibition) των φυτοπαθογόνων μυκήτων υπολογίζεται από τον τύπο:

$$\% \text{ Ποσοστό παρεμπόδισης του μύκητα} = \frac{(A1-A2)}{A1} \times 100,$$

όπου A1: εμβαδόν εξάπλωσης του μύκητα μάρτυρα και A2: εμβαδόν εξάπλωσης του μύκητα σε κάθε μεταχείριση με τον εκάστοτε βιολογικό παράγοντα (Etebarian et al., 2005; Liu et al., 2020). Για κάθε μεταχείριση πραγματοποιήθηκαν συνολικά τρεις βιολογικές επαναλήψεις.

2.5 Βιολογική προστασία καρπών με τη μέθοδο detached fruit assay

Η μέθοδος βιολογικής προστασίας καρπών πραγματοποιήθηκε σε ασυμπτωματικούς και υγιείς καρπούς α) τομάτας, ποικιλίας Lobello που προήλθαν από βιολογική καλλιέργεια β) ελιάς, ποικιλίας Κορωνέικη και γ) επιτραπέζιου σταφυλιού. Η προστασία των καρπών πραγματοποιήθηκε με την τροποποιημένη μέθοδο detached fruit assay των Shi και Sun, (2017), όπως περιγράφεται παρακάτω.

2.5.1 Αποστείρωση καρπών

Τα βήματα για την αποστείρωση των καρπών που πραγματοποιήθηκαν ήταν τα εξής:

- Καλό πλύσιμο των καρπών με άφθονο νερό βρύσης (δύο επαναλήψεις)
- Ξέπλυμα των καρπών με 3% v/v NaClO για 15 min
- Ξέπλυμα με αποστειρωμένο dH₂O για 5 min (4 επαναλήψεις)
- Στέγνωμα των καρπών σε αποστειρωμένο διηθητικό χαρτί σε θάλαμο νηματικής ροής

2.5.2 Δημιουργία τεχνητής πληγής σε καρπούς

Μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας αποστείρωσης πραγματοποιείται τεχνητή πληγή σε κάθε καρπό για την αφαίρεση τμήματος της επιδερμίδας του καρπού. Το σημείο όπου πραγματοποιείται η πληγή, αποτελεί το σημείο εμβολιασμού του βακτηρίου και μόλυνσης

του μύκητα. Η πληγή πραγματοποιείται με τη βοήθεια φελλοτρυπητήρα (Cork borer) σχηματίζοντας τρύπα διαστάσεων 0,3 cm x 0,3 cm.

2.5.3 Προετοιμασία των βακτηρίων

Τα βακτήρια εμβολιάζονται αρχικά σε υγρό θρεπτικό μέσο NB των 5 ml και επωάζονται για 20 h στους 30 °C. Η προετοιμασία των βακτηρίων μέχρι την εφαρμογή τους στους αποστειρωμένους καρπούς είναι η εξής:

- Μεταφορά 1 ml προκαλλιέργειας σε φλάσκα των 50 ml με φρέσκο θρεπτικό NB και επώαση στους 30°C μέχρι τελικό OD₆₀₀= 0.4- 0.5
- Φωτομέτρηση των καλλιιεργειών και διακοπή της ανάπτυξης για τελικό αριθμό κυττάρων 10⁸ cfu/ ml, ανάλογα με το στέλεχος

2.5.4 Εμβολιασμός των βακτηρίων

Μετά την ολοκλήρωση της προετοιμασίας των βακτηρίων πραγματοποιείται ο εμβολιασμός 5 μl σε κάθε καρπό. Γίνεται ο εμβολιασμός 10 καρπών με βακτήριο ταυτόχρονα με μύκητα και 10 καρπών μόνο με μύκητα (μάρτυρας). Οι καρποί τοποθετούνται ξεχωριστά για την κάθε μεταχείριση, σε επιφανειακά αποστειρωμένα πλαστικά δοχεία. Μετά τον εμβολιασμό των βακτηρίων α) οι καρποί τομάτας επωάζονται για 3h στο θάλαμο νηματικής ροής, ενώ β) οι καρποί ελιάς και γ) οι καρποί σταφυλιού επωάζονται για 24- 48 h στους 30 °C σε θάλαμο ανάπτυξης, μέχρι την εφαρμογή του φυτοπαθογόνου μύκητα.

2.5.5 Μόλυνση με το φυτοπαθογόνο μύκητα

Οι φυτοπαθογόνοι μύκητες που εφαρμόστηκαν ήταν ο *Botrytis cinerea* για τους καρπούς τομάτας και σταφυλιού και ο μύκητας *Colletotrichum acutatum* για τους καρπούς ελιάς. Οι φυτοπαθογόνοι μύκητες αναπτύχθηκαν σε στερεή καλλιέργεια για συνολικά 10 ημέρες. Στη συνέχεια, σε κάθε τρυβλίο γίνεται η προσθήκη 10 ml αποστειρωμένου ddH₂O και με τη βοήθεια πιπέτας Pasteur πραγματοποιείται η απομάκρυνση των σπορίων του μύκητα. Μετά την προσεκτική συλλογή των σπορίων, γίνεται η προσαρμογή της συγκέντρωσής τους σε 10⁵ σπόρια/ ml. Τέλος, γίνεται ο εμβολιασμός 10 μl εναιωρήματος σπορίων του μύκητα σε κάθε πληγή.

2.5.6 Προετοιμασία των διάφανων πλαστικών δοχείων ανάπτυξης

Οι καρποί της κάθε μεταχείρισης τοποθετούνται σε ξεχωριστό διάφανο πλαστικό δοχείο ανάπτυξης, επιφανειακά αποστειρωμένο, προκειμένου να διατηρηθούν οι ασηπτικές συνθήκες του πειράματος. Σε κάθε δοχείο ανάπτυξης γίνεται η προσθήκη ενός φύλλου αποστειρωμένου διηθητικού χαρτιού στον πάτο του δοχείου, το οποίο διαβρέχεται με αποστειρωμένο dH₂O, μέχρι να κορεστεί. Τέλος, τα δοχεία σφραγίζονται με το καπάκι τους και τοποθετούνται στους 25°C.

2.5.7 Υπολογισμός της σοβαρότητας της ασθένειας

Αρχικό βήμα για τον υπολογισμό της σοβαρότητας της ασθένειας, είναι ο υπολογισμός του ορατού εμβαδού εξάπλωσης του φυτοπαθογόνου μύκητα πάνω σε κάθε αποκομμένο καρπό καθώς και το ορατό εμβαδόν του αντίστοιχου καρπού, με τη βοήθεια του λογισμικού προγράμματος ImageJ. Σύμφωνα με την εξίσωση:

$$\% \text{ Σοβαρότητας της ασθένειας (Disease severity, DS)} = \frac{\text{Εμβαδόν εξάπλωσης του μύκητα}}{\text{Συνολικό εμβαδόν καρπού}} \times 100,$$

υπολογίζεται το ποσοστό % της σοβαρότητας της ασθένειας (Disease severity) για κάθε καρπό, ως ο λόγος του εμβαδού εξάπλωσης του μύκητα πάνω στον καρπό προς το ορατό εμβαδόν του αντίστοιχου καρπού. Ο υπολογισμός του δείκτη της σοβαρότητας της ασθένειας πραγματοποιήθηκε βάσει της κλίμακας H-B (Horsfall- Barrat) που αναπτύχθηκε από τους Barratt και Horsfall, (1945) και τροποποιήθηκε ανάλογα με τα αποτελέσματα (Barratt & Horsfall, 1945; Bock et al., 2008; Horsfall, 1945; Horsfall & Cowling, 1978; Nutter & Esker, 2006; Slopek, 1989). Από το ποσοστό της σοβαρότητας της ασθένειας που υπολογίζεται, προκύπτει μια ποσοστιαία διαβαθμισμένη κλίμακα της σοβαρότητας στην ασθένειας (Rating scale). Με γνώμονα την κλίμακα που προκύπτει και με τη βοήθεια της εξίσωσης:

$$\% \text{ Δείκτης σοβαρότητας της ασθένειας (Disease severity index, DSI)} = \frac{\Sigma(\text{Αριθμός μολυσμένων καρπών} \times \text{Αντίστοιχη τιμή της κλίμακας σοβαρότητας της ασθένειας (DS)})}{\text{Συνολικός αριθμός καρπών (N)} \times \text{Μέγιστη τιμή της κλίμακας σοβαρότητας της ασθένειας}} \times 100,$$

υπολογίζεται ο δείκτης της σοβαρότητας της ασθένειας (Disease Severity Index, DSI) για την κάθε μεταχείριση ξεχωριστά. Τέλος, η ένταση της ασθένειας (Disease incidence, DI) υπολογίζεται κάνοντας χρήση της εξίσωσης:

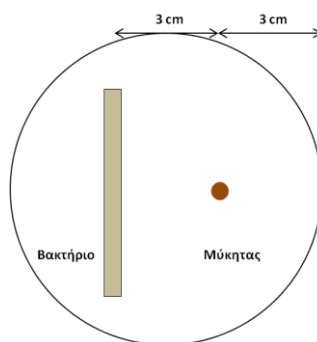
$$\% \text{ Ένταση της ασθένειας (Disease incidence, DI)} = \frac{\text{Αριθμός μολυσμένων καρπών}}{\text{Συνολικός αριθμός καρπών}} \times 100.$$

2.6 Εκχύλιση των δευτερογενών μεταβολιτών των βακτηρίων από στερεό μέσο ανάπτυξης

Η απομόνωση των διαχεόμενων αντιβιοτικών ενώσεων πραγματοποιήθηκε σε *in vitro* συνθήκες σύμφωνα με την τροποποιημένη μέθοδο των Costa και συνεργατών (Costa et al., 2019). Συγκεκριμένα απομονώθηκε τμήμα της ζώνης παρεμπόδισης που δημιουργήθηκε μεταξύ των επιλεγμένων βακτηριακών στελεχών και του φυτοπαθογόνου βακτηρίου *Botrytis cinerea* μετά την ανάπτυξη τους με τη μέθοδο της ταυτόχρονης διπλής καλλιέργειας (Dual culture), καθώς και του μετώπου των βακτηρίων ως μεμονωμένα στελέχη.

2.6.1 Εμβολιασμός βακτηρίων και φυτοπαθογόνου μύκητα

Η μέθοδος που εφαρμόστηκε για τη μελέτη της αντιβιοτικής τους δράσης ήταν παραλλαγή της μεθόδου της ταυτόχρονης διπλής καλλιέργειας (Dual culture), όπως περιγράφεται στη σχηματική αναπαράσταση παρακάτω (Σχ. 2.3).



Σχήμα 2.3 Σχηματική αναπαράσταση της ταυτόχρονης διπλής καλλιέργειας (Dual culture) βακτηρίου και μύκητα για τη μελέτη της αντιβιοτικής δράσης των βακτηρίων.

Τα βακτήρια εμβολιάζονται αρχικά σε 5 ml υγρού διαλύματος NB για 19-20 h και επωάζονται σε θάλαμο ανάπτυξης υπό ανάδευση ρυθμισμένο στους 28 °C. Όγκος 200 μl αναπτυγμένης βακτηριακής καλλιέργειας εμβολιάζεται σε στερεό θρεπτικό μέσο ανάπτυξης NA (1,5 % (w/v) άγαρ) σε τεχνητό πηγαδάκι (0,5 cm x 6 cm) σε απόσταση 3 cm από την άκρη του τρυβλίου, όπως παρουσιάζεται στο Σχήμα 2.3. Έπειτα, κομμάτι (διάμετρος 5 mm) στερεής καλλιέργειας μύκητα 5 ημερών τοποθετείται σε απόσταση 3 cm από το σημείο εμβολιασμού του βακτηρίου. Για την κάθε μεταχείριση χρειάζονται περίπου 20- 25 τρυβλία. Τέλος, τα τρυβλία μεταφέρονται σε θάλαμο ανάπτυξης ρυθμισμένος στους 25 °C και παραμένουν εκεί για συνολικά 6 ημέρες μέχρι την κοπή και απομάκρυνση της ενδιάμεσης ζώνης παρεμπόδισης.

2.6.2 Εκχύλιση διαχεόμενων βιοδραστικών ενώσεων

Η εκχύλιση των συσσωρευμένων εξωκυτταρικών ενώσεων στη ζώνη παρεμπόδισης μεταξύ βακτηρίου και μύκητα. Μετά την κοπή του μεγαλύτερου τμήματος της ζώνης παρεμπόδισης, ακολουθεί τεμαχισμός της σε μικρότερα κομμάτια. Το σύνολο των τεμαχισμένων ζωνών κάθε εφαρμογής, συγκεντρώνεται ξεχωριστά σε κατάλληλη φιάλη universal (100 ml) και ζυγίζεται το συνολικό τους βάρος. Για κάθε 5 g NA ακολουθείται η διαδικασία:

- Προσθήκη 1-1,5 ml ddH₂O
- Πραγματοποίηση vortex για 30 sec
- Προσθήκη 16 ml Ethyl acetate
- Προσθήκη 0,1% (v/v) Formic acid
- Πραγματοποίηση vortex για 1 min
- Μεταφορά σε λουτρό υπερήχων ρυθμισμένο σε θερμοκρασία δωματίου για 30 min
- Μεταφορά του υπερκείμενου σε κατάλληλη διαχωριστική χοάνη (χωρίς τα τεμάχια του θρεπτικού)
- Προσθήκη 2 ml ddH₂O
- Προσεκτικό άνοιγμα της βαλβίδας και απομάκρυνση της υδατικής φάσης
- Συλλογή του διαλύματος σε καθαρό ποτήρι ζέσεως
- Φιλτράρισμα του διαλύματος με φίλτρο διαμέτρου πόρων 0.22 μm και μεταφορά του σε φιάλη σφαιρική με στρογγυλό πάτο των 100 ml
- Εξάτμιση του διαλύματος με περιστροφική κίνηση υπό κενό στη συσκευή Περιστροφικός Εξατμιστής
- Προσθήκη 500 μl Methanol για συλλογή με περιστροφική ανάδευση των ενώσεων από τα τοιχώματα της σφαιρικής φιάλης
- Μεταφορά σε eppendorf των 2 ml και φύλαξη στους -80 °C

2.6.3 Έλεγχος της βιοδραστικότητας του ακατέργαστου εκχυλίσματος

Ο έλεγχος της βιοδραστικότητας των ενώσεων πραγματοποιήθηκε σε θρεπτικό μέσο NA (1,5 % (w/v) άγαρ) με τον εμβολιασμό σπορίων του φυτοπαθογόνου μύκητα *Botrytis cinerea* (10⁵ σπόρια/ ml) στο κέντρο του τρυβλίου. Στη συνέχεια 20 μl του διαλύματος των ακατέργαστων ενώσεων εμβολιάζονται σε απόσταση 2 cm από το σημείο εμβολιασμού του μύκητα. Ταυτόχρονα, όγκος 20 μl του διαλύματος Methanol εμβολιάζεται σε ίδια απόσταση

αποτελώντας το αρνητικός μάρτυρας. Τέλος, τα τρυβλία μεταφέρονται σε θάλαμο επώασης των 25 °C μέχρι την εμφάνιση ζώνης παρεμπόδισης.

2.7 Διαχωρισμός των απομονωμένων βιοδραστικών ενώσεων με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας TLC

Ο διαχωρισμός και η ανάλυση της βιοδραστικότητας των μεταβολιτών από το ακατέργαστο εκχύλισμα πραγματοποιήθηκε με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (Thin Layer Chromatography- TLC), σύμφωνα με τους Calvo και συνεργάτες (Calvo et al., 2019).

2.7.1 Προετοιμασία TLC πλάκας

- Ως στατική φάση χρησιμοποιήθηκε η TLC πλάκα που αποτελείται από λεπτή στιβάδα προσροφητικού υλικού
- Σημείωση με μολύβι της γραμμής εκκίνησης και τερματισμού του χρωματογραφήματος (μέτωπο διαλύτη), 1,5 cm από την άνω και κάτω πλευρά
- Σημείωση του σημείου εμβολιασμού των δειγμάτων σε απόσταση 2 cm μεταξύ τους
- Ενστάλαξη 25 μl συνολικού όγκου για κάθε δείγμα (σταδιακή ενστάλαξη ανά 2-3 μl)

2.7.2 Ανάπτυξη χρωματογραφήματος

- Εφαρμογή διηθητικού χαρτιού παράλληλα στο εσωτερικό τοίχωμα του γυάλινου θαλάμου αναπτύξεως
- Προσθήκη 120 ml του διαλύτη αναπτύξεως (κινητή φάση) που αποτελείται από το μίγμα διαλυτών χλωροφόρμιο: μεθανόλη: νερό σε αναλογία 65: 25: 4 (v/v/v)
- Σφράγισμα του δοχείου για διαβροχή του διηθητικού χαρτιού μέχρι τον κορεσμό του δοχείου με υδρατμούς (~ 1 h)
- Τοποθέτηση της πλάκας (στατική φάση) στον κλειστό θάλαμο ανάπτυξης σε κατακόρυφη θέση μέχρι να φτάσει το μίγμα διαλυτών στη γραμμή τερματισμού (~3 h)
- Απομάκρυνση της πλάκας από το θάλαμο ανάπτυξης και τοποθέτηση στον πάγκο του επαγωγού αερίων μέχρι να εξατμισθεί το μίγμα διαλυτών

2.7.3 Έλεγχος της βιοδραστικότητας των ενώσεων με τη μέθοδο της βιο-αυτογραφίας (Bioautography) στην TLC πλάκα

Ο έλεγχος της βιοδραστικότητας των ενώσεων που αναπτύχθηκαν σε χρωματογραφία λεπτής στιβάδας, πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της βιοαυτογραφίας (Bioautography), όπως περιγράφεται από τους Calvo και συνεργάτες (Calvo et al., 2019). Αρχικά, ο

φυτοπαθογόνος μύκητας *Botrytis cinerea* αναπτύσσεται σε στερεό θρεπτικό μέσο PDA (1, 5 % άγαρ) στους 25 °C για 10 ημέρες, μέχρι την πλήρη κάλυψη του τρυβλίου με σπόρια. Έπειτα, στο τρυβλίο γίνεται η προσθήκη 10 ml 10 mM MgCl₂ και με τη χρήση μιας λυγισμένης πιπέτας Pasteur γίνεται το ξύσιμο των υφών, προκειμένου να ελευθερωθούν τα σπόρια στο διάλυμα. Στη συνέχεια, γίνεται πέρασμα του διαλύματος των υφών και σπορίων του μύκητα από αποστειρωμένη γάζα, για την κατακράτηση των υφών και τη συλλογή των σπορίων. Έπειτα, όγκος 5 ml φιλτραρισμένης καλλιέργειας (~10⁵ σπόρια/ ml) ενσωματώνεται σε 35 ml θρεπτικού διαλύματος PDA (0, 8 % w/v άγαρ) μέχρι την ομογενοποίησή τους. Σε κατάλληλο δοχείο τοποθετείται ως κατώτερο στρώμα υγρό διηθητικό χαρτί, ακολουθεί μια διπλή στρώση αλουμινοχαρτού μέχρι τελικά την τοποθέτηση της TLC πλάκας. Τέλος, απλώνεται στην πλάκα TLC το διάλυμα PDA με τα σπόρια του μύκητα, μέχρι την πλήρη κάλυψή της. Αφού πήξει το διάλυμα καλύπτεται το δοχείο με καπάκι και επωάζεται στους 25 °C για 24 h. Την επόμενη μέρα η πλάκα βάφεται με τη χρωστική ζωτικότητα των σπορίων βρωμιούχο άλας του τετραζόλιου (MTT), η οποία αποτυπώνει τις ζώνες στις οποίες τα σπόρια του μύκητα δεν κατάφεραν να βλαστήσουν (Levitz & Diamond, 1985; Meier et al., 1993). Οι ζώνες επιβεβαιώνουν τη βιοδραστικότητα των διαχωρισμένων ενώσεων.

2.7.4 Υπολογισμός του συντελεστή επιβράδυνσης R_f (Retention factor)

Κατά την ανάπτυξη του χρωματογραφήματος ο διαλύτης ανάπτυξης κινείται προς τη γραμμή τερματισμού (μέτωπο διαλύματος) του χρωματογραφήματος συμπαρασύροντας το μίγμα των ενώσεων. Το μίγμα των επιθυμητών ενώσεων διαχωρίζεται στα επιμέρους συστατικά τους με βάση την πολικότητα των μορίων, δημιουργώντας έτσι τον ανάλογο αριθμό βιοδραστικών ζωνών (απλωμένη κηλίδα). Για να προσδιορίσουμε τη θέση της κάθε ζώνης στην TLC πλάκα γίνεται ο υπολογισμός του συντελεστή επιβράδυνσης R_f. Ο R_f των ενώσεων υπολογίζεται σύμφωνα με τον τύπο:

$$R_f = \frac{\text{Απόσταση του κέντρου βάρους της ζώνης πάνω στην TLC πλάκα}}{\text{Απόσταση του μετώπου της κινητής φάσης στην TLC πλάκα}}$$

Πραγματοποιώντας κατάλληλη βιβλιογραφική ανάλυση για την τιμή του συντελεστή κατακράτησης κάθε ζώνης, μπορεί να βρεθεί η πιθανή βιοδραστική ουσία που εμφανίζει το συγκεκριμένο R_f.

2.8 Μεταβολομική ανάλυση των εκχυλισμένων δευτερογενών μεταβολιτών με UHPLC-ESI HRMS

Η μεταβολομική ανάλυση και η ταυτοποίηση των δευτερογενών μεταβολιτών πραγματοποιήθηκε στο Μπενάκειο Φυτοπαθολογικό Ινστιτούτο, στο εργαστήριο Τοξικολογικού Ελέγχου Γεωργικών Φαρμάκων. Η μεταβολομική ανάλυση των απομονωμένων ενώσεων πραγματοποιήθηκε με 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 έκλουση ανά 30 min, με πρόγραμμα έκλουσης όπως παρουσιάζεται παρακάτω στον Πίνακα 2.4:

Χρόνος έκλουσης (min)	Διάλυμα κινητής φάσης (%)	
	A	B
0- 21	95	5
21-24	5	95
24-30	95	5

Πίνακας 2.4 Αναλογίες διαλυμάτων κινητής φάσης A (υπερκάθαρο νερό με προσθήκη 1% Formic acid) και B (acetonitrile) υπό βαθμωτή έκλουση ανά 30 min.

Η ροή έκλουσης 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, Υψίσυχνη 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 ορίσθηκε στα 35, 60 και 100. Τέλος, η θερμοκρασία της στήλης διατηρήθηκε στους 40 °C, ενώ η θερμοκρασία του δίσκου του δείγματος ορίσθηκε στους 4 °C.

2.8.1 Ταυτοποίηση δευτερογενών μεταβολιτών

Η αναζήτηση και αναγνώριση των δευτερογενών μεταβολιτών που απομονώθηκαν πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του προγράμματος Compound Discoverer Software (version 2.1). Η ταυτοποίηση των μεταβολιτών πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια της βιβλιοθήκης mzcloud (Advanced Mass Spectral Database), τη βάση δεδομένων της πλατφόρμας NORINE και την ανοιχτή βάση δεδομένων PubChem του NCBI. Η ταυτοποίηση πραγματοποιήθηκε συνδυάζοντας τη μοριακή μάζα και το χημικό τύπο της κάθε ένωσης.

2.9 Έλεγχος συμβατότητας των μακροαποικιών των βακτηρίων *in vitro*

Η *in vitro* συμβατότητα των βακτηρίων μελετήθηκε με τη μέθοδο της μικτής μακροαποικίας δύο βακτηρίων (mixed colony spot), τη μέθοδο της αλληλεπίδρασης των μακροαποικιών κατά ζεύγη (pairwise interaction) και της μέθοδο της ταυτόχρονης ομαδικής κίνησης (Double swarming assay). Η ανάπτυξη των βακτηρίων και για τις δύο μεθόδους συμβατότητας πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφεται στην ενότητα 2.4.3.

2.9.1 Μέθοδος μικτής μακροαποικίας (mixed colony spot)

Τα βακτηριακά στελέχη αναμίχθηκαν σε αναλογία 1:1 και όγκος 10 μl βακτηριακής καλλιέργειας εμβολιάσθηκε σε τρυβλίο Petri διαμέτρου 5 cm, που περιείχε θρεπτικό μέσο ανάπτυξης NA (1,5 % w/v άγαρ). Για κάθε ένα από τα μεμονωμένα στελέχη υπήρχε μια μεταχείριση- μάρτυρας, όπου το κάθε στέλεχος αναμίχθηκε σε αναλογία 1:1 με αντίστοιχο όγκο ddH₂O. Τα τρυβλία επώστηκαν σε θάλαμο ανάπτυξης, ρυθμισμένος στους 30 °C για συνολικά πέντε ημέρες και πραγματοποιήθηκε καθημερινή αποτύπωση της αναπτυσσόμενης αποικίας.

2.9.2 Υπολογισμός της συγκέντρωσης των βακτηρίων

Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης των βακτηρίων, πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων. Αρχικά, όγκος 1 ml αποστειρωμένου ddH₂O προστίθεται σε κάθε τρυβλίο και με τη βοήθεια πιπέτας Pasteur γίνεται απομάκρυνση των προσκολλημένων βακτηριακών κυττάρων από το θρεπτικό μέσο. Το κυτταρικό διάλυμα μεταφέρεται σε tube των 1,5 ml και με την πραγματοποίηση των διαδοχικών αραιώσεων, γίνεται η καταμέτρηση

των κυττάρων. Για κάθε μεταχείριση υπήρξαν συνολικά τρεις βιολογικές επαναλήψεις. Για την καλύτερη καταμέτρηση των βακτηρίων χρησιμοποιήθηκε το βακτηριακό στέλεχος Cal.1.30-rif, το οποίο είναι ανθεκτικό στο αντιβιοτικό ριφαμπικίνη.

2.9.3 Μέθοδος αλληλεπίδρασης κατά ζεύγη (Pairwise interaction)

Η μέθοδος της αλληλεπίδρασης κατά ζεύγη πραγματοποιήθηκε μεταξύ των βακτηριακών στελεχών σε στερεό θρεπτικό μέσο NA (1,5 % w/v) σε τρυβλία Petri (διάμετρος 5 cm). Όγκος 5 μl κάθε βακτηρίου εμβολιάστηκε σε απόσταση 1 cm μεταξύ τους, ενώ κάθε στέλεχος εμβολιάστηκε και μόνο του ως μάρτυρας. Μετά την ολοκλήρωση των εμβολιασμών, τα τρυβλία επωάστηκαν στους 30 °C για συνολικά επτά ημέρες. Για κάθε μεταχείριση υπήρξαν συνολικά τέσσερις βιολογικές επαναλήψεις.

2.10 Εφαρμογή βακτηρίων σε φυτά *Arabidopsis thaliana* Col-0 *in vitro*

2.10.1 Εφαρμογή μεμονωμένων βακτηριακών στελεχών σε φυτά *A. thaliana*

Οι σπόροι *Arabidopsis thaliana* Col-0 χορηγήθηκαν ευγενικά από το εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας του τμήματος Βιοτεχνολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Η εφαρμογή των βακτηρίων σε φυτά *Arabidopsis thaliana* Col-0 πραγματοποιήθηκε σε *in vitro* συνθήκες. Ο εμβολιασμός βακτηριακών στελεχών πραγματοποιήθηκε με άμεση εφαρμογή των βακτηρίων στο ακρορρίζιο των φυταρίων, σε απόσταση από το ακρορρίζιο και με την εφαρμογή των βακτηρίων σε τρυβλία petri με ενδιάμεσο χώρισμα για τη μελέτη της επίδρασης ενδεχόμενων παραγόμενων πτητικών ενώσεων στην ανάπτυξη των φυτών.

2.10.1.1 Αποστείρωση σπόρων *A. thaliana* Col-0

Βασικό βήμα πριν την εφαρμογή των βακτηρίων στα φυτά, ήταν η αποστείρωση των σπόρων ακολουθώντας τα εξής βήματα:

1. Καλό ξέπλυμα των σπόρων σε αποστειρωμένο ddH₂O με συνεχή ανάδευση
2. Φυγοκέντρηση για 15 sec και απομάκρυνση του υπερκείμενου
3. Επανάληψη των βημάτων 1 και 2
4. Εμβάπτιση σε πυκνή χλωρίνη για 5 min
5. Φυγοκέντρηση για 15 sec και απομάκρυνση του υπερκείμενου
6. Καλό ξέπλυμα σε αποστειρωμένο ddH₂O με συνεχή ανάδευση
7. Φυγοκέντρηση για 15 sec και απομάκρυνση του υπερκείμενου
8. Επανάληψη των βημάτων 6 και 7, πέντε φορές

9. Προσθήκη τελικού ddH₂O

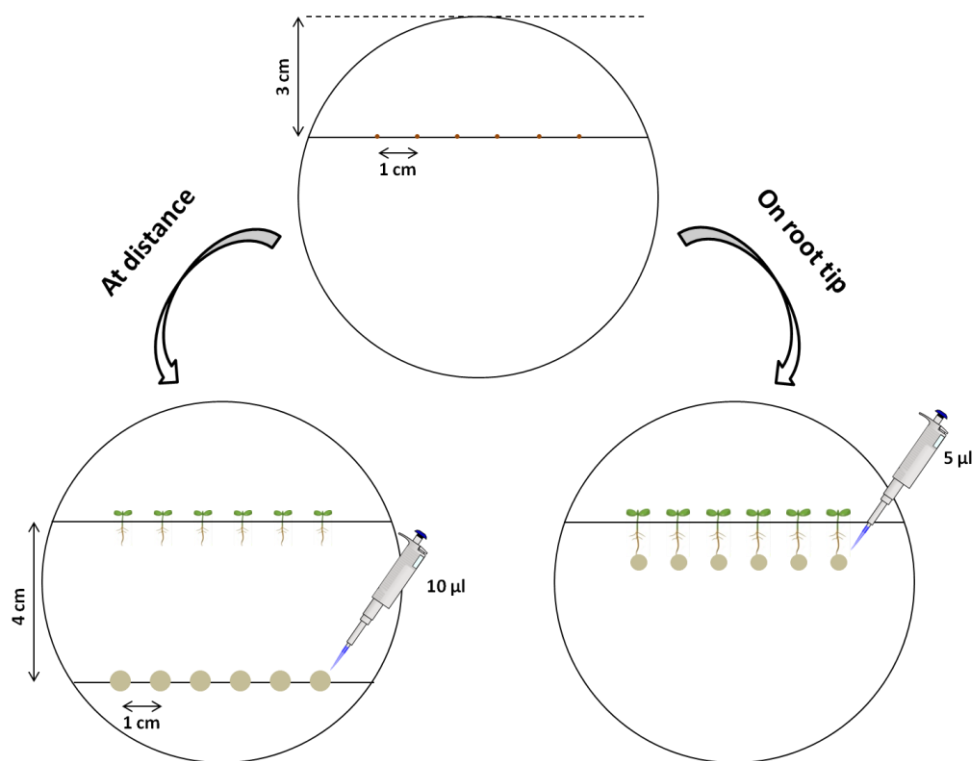
2.10.1.2 Προβλάστηση των σπόρων του *A. thaliana* Col-0 σε θρεπτικό μέσο ανάπτυξης ½ MS

Το θρεπτικό μέσο που χρησιμοποιήθηκε για την ανάπτυξη των φυτών ήταν το MS (Murashige and Skoog, Duchefa-Biochemie). Για την ανάπτυξη των φυτών *A. thaliana* χρησιμοποιήθηκε η μισή συγκέντρωση του θρεπτικού (½ MS), με την προσθήκη 0,5 % σουκρόζης, ενώ για τη στερεοποίηση του προστίθεται 0.8 % βακτηριολογικού άγαρ. Κάθε τρυβλίο Petri (9 mm) περιέχει συνολικά 25 ml θρεπτικού στο οποίο γίνεται η σπορά 6 σπόρων σε θάλαμο νηματικής ροής. Η απόσταση μεταξύ των σπόρων είναι 1 cm, ενώ η σπορά τους έγινε 3 cm από την άνω πλευρά του τρυβλίου όπως φαίνεται και στο Σχήμα 2.4. Μετά την ολοκλήρωση της σποράς, τα τρυβλία σφραγίζονται με parafilm και τοποθετούνται ανάποδα στο σκοτάδι, στους 4 °C για 24 h προκειμένου να σπάσει ο λήθαργος των σπόρων. Στη συνέχεια επωάζονται κάθετα σε θάλαμο ανάπτυξης φυτών με σταθερή φωτοπερίοδο (16h φώς /8 h σκοτάδι, με ένταση φωτός στα 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) και σε θερμοκρασία 22 °C.

2.10.1.3 Εμβολιασμός βακτηρίων σε φυτά *A. thaliana* Col-0

Η εφαρμογή των βακτηρίων στα φυτά *A. thaliana* Col-0 πραγματοποιήθηκε με δύο τρόπους, με τον εμβολιασμό τους από απόσταση και στο ακρορρίζιο των φυτών όπως παρουσιάζεται στο Σχήμα 2.4. Η ανάπτυξη των βακτηρίων γίνεται σε υγρό θρεπτικό μέσο NB για 20 h στους 28°C, υπό ανάδευση.

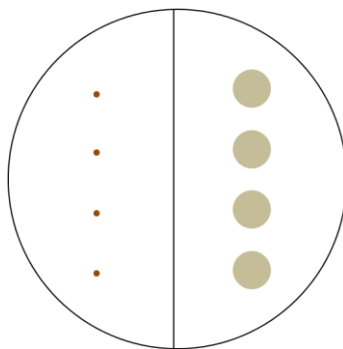
Για την εφαρμογή των βακτηρίων από απόσταση, σε προβλαστημένα φυτά *A. thaliana* Col-0 δύο ημερών, πραγματοποιείται ο εμβολιασμός 10 μl βακτηριακής προκαλλιέργειας/φυτό, όπως φαίνεται παρακάτω στο Σχήμα 2.4. Για την εφαρμογή των βακτηρίων στο ακρορρίζιο των φυτών *A. thaliana* Col-0, όγκος 5 μl υγρής βακτηριακής καλλιέργειας εφαρμόστηκε στο ακρορρίζιο κάθε φυτού, το οποίο είχε αναπτυχθεί τέσσερις ημέρες σε θάλαμο ανάπτυξης μέχρι τον εμβολιασμό του. Για τα φυτά μάρτυρες πραγματοποιείται εμβολιασμός 5 μl και 10 μl MgSO₄ (10 mM) στις αντίστοιχες αποστάσεις. Τέλος, τα τρυβλία σφραγίζονται με parafilm, τοποθετούνται σε κάθετη θέση στο θάλαμο ανάπτυξης φυτών για 16 μέρες μέχρι την τελική παρατήρησή τους. Τα τρυβλία σε θάλαμο επώασης φυτών για 16 ημέρες μέχρι την τελική παρατήρησή τους.



Σχήμα 2.4 Σχηματική αναπαράσταση της σποράς του φυτού *Arabidopsis thaliana* Col-0 σε τρυβλία Petri. Ο εμβολιασμός των βακτηρίων πραγματοποιήθηκαν σε δύο αποστάσεις από το σημείο σποράς των φυτών.

2.10.1.4 Διερεύνηση επίδρασης βακτηριακών πτητικών ενώσεων με τη χρήση τρυβλίων που διαθέτουν κεντρικό χώρισμα (I plates)

Η μελέτη της επίδρασης των παραγόμενων πτητικών ενώσεων των βακτηρίων στην ανάπτυξη των φυτών *A. thaliana* Col-0, πραγματοποιήθηκε με την εφαρμογή των βακτηρίων και των φυτών σε τρυβλία petri με κεντρικό χώρισμα (I-plates). Το θρεπτικό μέσο που χρησιμοποιήθηκε ήταν $\frac{1}{2}$ MS (0.5% Sucrose, 0.8% Agar) σε όγκο 10 ml/ ημικύκλιο τρυβλίου. Αρχικά πραγματοποιείται η σπορά των σπόρων του *A. thaliana* Col-0 (4 σπόροι/ τρυβλίο) σε απόσταση 1 cm μεταξύ τους και 2 cm από την κορυφή του τρυβλίου, όπως παρουσιάζεται σχηματικά παρακάτω (Σχ. 2.5).



Σχήμα 2.5 Σχηματική αναπαράσταση του εμβολιασμού των ενδοφυτικών βακτηρίων πάνω στο ακρορρίζιο του φυτού *Arabidopsis thaliana* Col-0 σε τρυβλία Petri.

Μετά την ολοκλήρωση της σποράς, τα τρυβλία σφραγίζονται με parafilm και τοποθετούνται ανάποδα στο σκοτάδι, στους 22° C για 24 h προκειμένου να σπάσει ο λήθαργός τους. Έπειτα πραγματοποιείται ο εμβολιασμός των βακτηρίων στο δεύτερο ημικύκλιο του τρυβλίου, συνολικού όγκου 80 μl (20 μl/ spot) όπως απεικονίζεται και στο Σχήμα 2.5. Μετά την ολοκλήρωση του εμβολιασμού τα τρυβλία σφραγίζονται με διπλό parafilm και τοποθετούνται σε οριζόντια θέση στο θάλαμο ανάπτυξης φυτών για 21 ημέρες.

2.10.2 *In vitro* αποικισμός βακτηρίων σε φυτά *A. thaliana*

2.10.2.1 Προετοιμασία των φυτών *A. thaliana* Col-0 και των βακτηριακών στελεχών

Τα αρχικά βήματα που πραγματοποιήθηκαν για τον *in vitro* αποικισμό των βακτηρίων σε φυτά *A. thaliana* ήταν τα ακόλουθα:

- Αποστείρωση των σπόρων *A. thaliana* Col-0 (ενότητα 2.10.1.1)
- Προετοιμασία στερεού θρεπτικού μέσου ½ MS
- Προβλάστηση των αποστειρωμένων σπόρων για 8 ημέρες (ενότητα 2.10.1.2)
- Προετοιμασία των βακτηρίων ως μεμονωμένα και μίγματα βακτηρίων (ενότητα 2.10.1.3) για τον εμβολιασμό τους

2.10.2.2 Εφαρμογή των βακτηρίων σε προβλαστημένα φυτά *A. thaliana* Col-0

Η *in vitro* εφαρμογή των βακτηρίων στις ρίζες προβλαστημένων φυτών 8 ημερών *A. thaliana* Col-0 πραγματοποιήθηκε με την τροποποιημένη μέθοδο Beauregard και συνεργατών (Beauregard et al. 2013), όπως περιγράφεται παρακάτω:

1. Προετοιμασία υγρού θρεπτικού μέσου ανάπτυξης φυτών ½ MS (χωρίς σουκρόζη) και αποστείρωση στους 121 °C/ 21 min
2. Μεταφορά 270 μl θρεπτικού μέσου ½ MS σε eppendorf των 2 ml
3. Προσθήκη με καλή ανάμιξη όγκου 30 μl του μεμονωμένου στελέχους ή μίγματος βακτηρίων (6 επαναλήψεις/ μεταχείριση)
4. Μεταφορά 200 μl θρεπτικού μέσου ½ MS σε eppendorf των 2 ml για τα φυτά μάρτυρες (6 επαναλήψεις)
5. Μεταφορά ενός προβλαστημένου φυτού *A. thaliana* 8 ημερών σε κάθε eppendorf
6. Εφαρμογή των eppendorf σε στατό και μεταφορά τους σε θάλαμο ανάπτυξης υπό ελαφριά ανάδευση (90 rpm) ρυθμισμένος στους 28 °C και επώαση για 18 h.

2.10.2.3 Απομάκρυνση μη προσκολλημένων βακτηριακών κυττάρων από φυτά *A. thaliana* Col-0

Μετά από 18 h επώσης των βακτηρίων στις ρίζες των φυτών *A. thaliana* ακολούθησε η διαδικασία για την καταγραφή των προσκολλημένων κυττάρων στην επιφάνεια των ριζών σύμφωνα με την τροποποιημένη μέθοδο των Beauregard και συνεργατών (Beauregard et al. 2013), όπως παρουσιάζεται παρακάτω:

1. Απομάκρυνση του διαλύματος $\frac{1}{2}$ MS μαζί με τα βακτηριακά κύτταρα που αναπτύχθηκαν στο μέσο
2. Προσθήκη 1 ml διαλύματος $\frac{1}{2}$ MS και καλή ανακίνηση για καλό ξέπλυμα των ριζών και του τοιχώματος του erpendorf
3. Απομάκρυνση του θρεπτικού διαλύματος
4. Επανάληψη των βημάτων 2 και 3
5. Προσθήκη 1 ml διαλύματος $\frac{1}{2}$ MS και καλή ανακίνηση με Vortex για 1 min για την απομάκρυνση των κυττάρων που έχουν προσκολληθεί ελαφρώς στις ρίζες των φυτών
6. Απομάκρυνση του θρεπτικού διαλύματος
7. Επανάληψη βημάτων 2 και 3
8. Προσθήκη τελικού 1 ml διαλύματος $\frac{1}{2}$ MS
9. Στρώσιμο 100 μ l της αραιώσης 10^{-6} σε θρεπτικό μέσο NA και NA-rif (4 τεχνικές επαναλήψεις)

Ο αριθμός των κυττάρων που καταμετράται αντιπροσωπεύει τον αριθμό των προσκολλημένων κυττάρων στις ρίζες των φυτών.

2.10.2.4 Μικροσκοπική παρατήρηση των προσκολλημένων βακτηριακών κυττάρων στις ρίζες των φυτών *A. thaliana*

Μετά την απομάκρυνση των μη προσκολλημένων βακτηριακών κυττάρων στις ρίζες των φυτών *A. thaliana* Col-0, έγινε η μικροσκοπική παρατήρηση εκείνων που κατάφεραν να αποικίσουν την επιφάνεια των ριζών. Συγκεκριμένα, δείγματα φυτών μεταφέρονται σε αντικειμενοφόρο πλάκα, στην οποία είχε γίνει προηγουμένως εφαρμογή 1 ml 1% (w/v) WA (Water-Agarose) και αφού καλύφθουν με καλυπτρίδα, παρατηρούνται μικροσκοπικά. Η μικροσκοπική παρατήρηση πραγματοποιήθηκε σε οπτικό μικροσκόπιο Leica DMR και οι εικόνες αποτυπώθηκαν με την ενσωματωμένη κάμερα ProgRes® Speed XT Core 5.

2.10.3 Εφαρμογή των βακτηρίων σε φυτά *A. thaliana* σε συνθήκες υψηλής αλατότητας *in vitro*

Η ανάπτυξη των φυτών *A. thaliana* σε *in vitro* συνθήκες με υψηλή συγκέντρωση σε αλατότητα, μελετήθηκε σε σύγκριση με την εφαρμογή των βακτηρίων στο ίδιο υπόστρωμα ανάπτυξης. Σε στερεό θρεπτικό μέσο ½ MS, πραγματοποιήθηκε αρχικά η σπορά των αποστειρωμένων σπόρων του φυτού *A. thaliana* σύμφωνα με την Ενότητα 2.10.1.1 και αναπτύχθηκαν για 4 ημέρες σε θάλαμο ανάπτυξης φυτών με σταθερές συνθήκες. Στη συνέχεια, προετοιμάστηκε το θρεπτικό μέσο ανάπτυξης φυτών ½ MS (0,5 % w/v sucrose και 0,8 % w/v agar), με την προσθήκη των διαφορετικών συγκεντρώσεων 0 mM, 75 mM, 150 mM και 250 mM NaCl. Μετά την προετοιμασία των βακτηρίων σύμφωνα με την Ενότητα 2.10.1.3, έγινε ο εμβολιασμός τους σε απόσταση 3 cm σύμφωνα με την ενότητα 2.10.1.5. Τα φυτά μεταφέρθηκαν σε θάλαμο ανάπτυξης για 6 ημέρες, μέχρι την τελική καταγραφή των αποτελεσμάτων.

2.10.3.1 Προετοιμασία των φυτών *A. thaliana* Col-0

Τα αρχικά βήματα που πραγματοποιήθηκαν ήταν τα ακόλουθα:

- Αποστείρωση των σπόρων *A. thaliana* Col-0 (Ενότητα 2.10.1.1)
- Προετοιμασία στερεού θρεπτικού μέσου ½ MS (Ενότητα 2.10.1.2)
- Προβλάστηση των αποστειρωμένων σπόρων για 4 ημέρες (Ενότητα 2.10.1.2)

2.10.3.2 Προετοιμασία μεμονωμένων και μιγμάτων βακτηριακών στελεχών

Τα βακτηριακά στελέχη αναπτύχθηκαν αρχικά σε υγρό θρεπτικό μέσο NB για 19- 20 h σε θάλαμο ανάπτυξης υπό ανάδευση, ρυθμισμένος στους 28 °C. Στη συνέχεια εμβολιάζονται σε φλάσκα που περιέχει 50 ml NB μέχρι να φτάσουν τα κύτταρα σε τελικό OD₆₀₀= 0.45- 0.55. Έπειτα, γίνεται μεταφορά 2 ml της καλλιέργειας τους σε erpendorf και ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 5000 rpm/ 15 min. Μετά την ολοκλήρωση της φυγοκέντρησης απομακρύνεται το υπερκείμενο μέσο και τα βακτηριακά κύτταρα επαναδιαλύονται σε 10 mM MgSO₄. Τέλος, για την εφαρμογή του εκάστοτε μίγματος γίνεται ανάμιξη των βακτηρίων σε αναλογία 1:1, ενώ για την εφαρμογή των μεμονωμένων στελεχών γίνεται η προσθήκη 10 mM MgSO₄ σε αναλογία 1:1 με το εκάστοτε βακτηριακό στέλεχος.

2.10.3.3 Εμβολιασμός των βακτηρίων σε απόσταση 3 cm από τη ρίζα των φυτών *A. thaliana* Col-0

Ο εμβολιασμός των βακτηρίων πραγματοποιήθηκε με τον ίδιο τρόπο που περιγράφεται και στην Ενότητα 2.10.1.3. Μετά την ολοκλήρωση του εμβολιασμού τα τρυβλία μεταφέρονται στο θάλαμο ανάπτυξης φυτών και αναπτύσσονται για επιπλέον 12 ημέρες μέχρι την τελική παρατήρησή τους.

2.10.3.4 Στερεοσκοπική παρατήρηση του ριζικού συστήματος των φυτών *A. thaliana* Col-0

Η απεικόνιση και αποτύπωση των μορφολογικών χαρακτηριστικών των ριζικών τριχιδίων των φυτών *A. thaliana* Col-0 που εμβολιάστηκαν με τα βακτηριακά στελέχη, πραγματοποιήθηκε σε στερεοσκόπιο Leica MZ125. Η αποτύπωση των φωτογραφιών πραγματοποιήθηκε με ενσωματωμένη στο στερεοσκόπιο κάμερα ProgRes® Speed XT Core 5.

2.10.3.5 Καταγραφή των μορφολογικών χαρακτηριστικών των φυτών

Μετά την ολοκλήρωση της ανάπτυξης των βακτηρίων με τα φυτά *A. thaliana* έγινε η καταγραφή των μορφολογικών χαρακτηριστικών των φυτών για περαιτέρω ανάλυση. Αρχικά πραγματοποιήθηκε η ψηφιακή αποτύπωση των φυτών στα τρυβλία Petri προκειμένου να γίνει ο υπολογισμός των μορφολογικών χαρακτηριστικών των φυτών (μήκος κεντρικής ρίζας, αριθμός πλευρικών ριζών, εμβαδόν φυλλικής επιφάνειας) με τη βοήθεια του λογισμικού προγράμματος ImageJ. Με το ίδιο πρόγραμμα έγινε και καταμέτρηση του αριθμού ή/και του μήκους των ριζικών τριχιδίων μετά τη στερεοσκοπική αποτύπωση των φυτών.

2.11 Εφαρμογή βακτηρίων σε φυτά τομάτας (*Solanum lycopersicum* var. *Chondrokatsari* Messinias)

Οι σπόροι *Solanum lycopersicum* var. *Chondrokatsari* Messinias χορηγήθηκαν ευγενικά από το Τμήμα Γεωπονίας του Πανεπιστημίου Πελοποννήσου, στην Καλαμάτα. Η ποικιλία χονδροκατσαρή (*Chondrokatsari* Messinias) αποτελεί μια τοπική παραδοσιακή ποικιλία τομάτας της Μεσσηνίας που ξεχωρίζει για τις πλούσιες οργανοληπτικές ιδιότητες των καρπών της.

2.11.1 Εφαρμογή των βακτηρίων σε *in vitro* συνθήκες

Η μελέτη της επίδρασης επιλεγμένων βακτηρίων στη βλαστικότητα και την ανάπτυξη φυταρίων τομάτας (*Solanum lycopersicum* var. Chondrokatsari Messinias) πραγματοποιήθηκε σε *in vitro* συνθήκες παραλλάσσοντας τη μέθοδο των Vaikuntapu et al., (2014).

2.11.1.1 Αποστείρωση των σπόρων

Η επιφανειακή αποστείρωση των σπόρων (16 σπόροι/ μεταχείριση) πραγματοποιείται σύμφωνα με το παρακάτω πρωτόκολλο:

- Εμβάπτιση των σπόρων (~150 σπόροι) σε falcon των 50 ml που περιέχει 3% NaClO και καλή ανάδευση για 5 min
- Έκπλυση των σπόρων με αποστειρωμένο ddH₂O με καλή ανάδευση για 1-2 min (6 επαναλήψεις)
- Στέγνωμα των σπόρων σε θάλαμο νηματικής ροής για ~30 min

Η αποτελεσματικότητα της αποστείρωσης ελέγχεται με την τοποθέτηση σπόρων και αποστειρωτικού μέσου σε στερεό θρεπτικό μέσο NA και επώασή τους στους 30 °C για 24 h. Η μέθοδος αποστείρωσης είναι αποτελεσματική όταν δεν εμφανίζεται μόλυνση στο μέσο.

2.11.1.2 Προετοιμασία υγρής βακτηριακής καλλιέργειας

Προκαλλιέργεια βακτηρίων αναπτύσσεται σε υγρό θρεπτικό μέσο NB των 5 ml και επώάζεται για 20 h στους 30°C. Η προετοιμασία των βακτηρίων μέχρι την εφαρμογή τους στους αποστειρωμένους σπόρους είναι η ακόλουθη:

- Μεταφορά 1 ml προκαλλιέργειας σε φλάσκα των 50 ml με φρέσκο θρεπτικό NB και επώαση στους 30°C
- Φωτομέτρηση των καλλιεργειών και διακοπή της ανάπτυξης μέχρι τελικό OD₆₀₀= 0.45- 0.55 (~10⁸ cfu/ ml)
- Φυγοκέντρηση 10 ml καλλιέργειας στα 8.000x g στους 4 °C για 15 min
- Επαναδιάλυση του βακτηριακού ιζήματος σε 2ml MgCl₂ (10 mM) και μεταφορά σε falcon που περιείχε 8 ml CMC (1% w/v), φτάνοντας τελικό όγκο τα 10 ml.

2.11.1.3 Μέθοδος βιοκάλυψης των σπόρων (Seed bio-priming)

Μετά την επιτυχημένη αποστείρωση των σπόρων και την κατάλληλη προετοιμασία των βακτηρίων, γίνεται η εφαρμογή των βακτηρίων στους σπόρους τομάτας με τη μέθοδο της βιο-

κάλυψης (Seed bio-priming), σύμφωνα με την τροποποιημένη μέθοδο των Babu και των συνεργατών (Babu et al., 2015). Η μέθοδος περιλαμβάνει τα εξής βήματα:

- Προσθήκη 20 σπόρων τομάτας στο παραπάνω falcon που περιέχει 1% CMC και το εκάστοτε βακτηριακό στέλεχος (10^8 cfu/ ml)
- Συνεχή ανάδευση για 60 min σε θερμοκρασία δωματίου
- Μεταφορά σε άδεια τρυβλία και στέγνωμα των σπόρων για ~1h
- Σπορά των εμβλαπτισμένων σπόρων σε 50 ml θρεπτικού $\frac{1}{2}$ MS (0,55% σε άγαρ) και επώαση στους 23°C για 72 h στο σκοτάδι, μέχρι να βλαστήσουν
- Τοποθέτηση των τρυβλίων (χωρίς καπάκι) σε διάφανα πλαστικά δοχεία
- Μεταφορά των κλειστών δοχείων σε θάλαμο ανάπτυξης φυτών σταθερής φωτοπεριόδου (12 h φως/ 12 σκοτάδι) και θερμοκρασίας 25°C, για 8 ημέρες

Μετά την ολοκλήρωση του πειράματος καταγράφηκε το νωπό βάρος των φυταρίων και πραγματοποιήθηκε η ψηφιακή αποτύπωσή τους προκειμένου να γίνει η μέτρηση του μήκους του βλαστού και της ρίζας των φυταρίων με τη βοήθεια του λογισμικού προγράμματος ImageJ.

2.11.2 Εφαρμογή βακτηρίων σε συνθήκες θερμοκηπίου

Μετά από τον έλεγχο της επίδρασης των επιλεγμένων ενδοφυτικών βακτηρίων και του ριζοσφαιρικού βακτηρίου *P. carnis* X στην ανάπτυξη φυταρίων τομάτας σε *in vitro* συνθήκες, πραγματοποιήθηκε μελέτη της επίδρασης τους στην ανάπτυξη φυτών τομάτας σε πείραμα θερμοκηπίου. Το πείραμα του θερμοκηπίου πραγματοποιήθηκε τη χρονική περίοδο Οκτώβριος- Δεκέμβριος 2019, στις θερμοκηπιακές εγκαταστάσεις του Τμήματος Γεωπονίας του Πανεπιστημίου Πελοποννήσου, στην Καλαμάτα.

2.11.2.1 Αποστείρωση των σπόρων

Οι σπόροι τομάτας που χρησιμοποιήθηκαν, πριν τη σπορά τους αποστειρώθηκαν σύμφωνα με τη μέθοδο αποστείρωσης που αναφέρθηκε στην παράγραφο 2.11.1.1.

2.11.2.2 Προετοιμασία υγρής βακτηριακής καλλιέργειας

Τα βακτήρια εφαρμόστηκαν σε σπόρους τομάτας ως μεμονωμένα στελέχη αλλά και ως μίγματα βακτηρίων. Τα στελέχη που μελετήθηκαν ήταν τα ενδοφυτικά βακτήρια Cal.l.30, Cal.f.4, Cal.r.29 και το ριζοσφαιρικού στελέχους X. Τα βακτήρια εμβολιάστηκαν αρχικά σε υγρό θρεπτικό μέσο NB των 5 ml και επώαστηκαν για 20 h στους 30 °C, σε θάλαμο

ανάπτυξης υπό ανάδευση. Η προετοιμασία των βακτηρίων μέχρι την εφαρμογή τους στους αποστειρωμένους σπόρους ήταν η εξής:

- Μεταφορά 1 ml προκαλλιέργειας σε φιάσκα των 50 ml με φρέσκο θρεπτικό NB και επώαση στους 30°C μέχρι τελικό OD₆₀₀ = 0.45- 0.55
- Φωτομέτρηση των καλλιιεργειών και διακοπή της ανάπτυξης για τελικό αριθμό κυττάρων 10⁸ cfu/ ml, ανάλογα με το στέλεχος
- Φυγοκέντρηση 10 ml καλλιέργειας στα 8.000 x g στους 4 °C για 15 min
- Τέλος, έγινε επαναδιάλυση των κυττάρων σε τελικό όγκο 10 ml MgCl₂ (10 mM) που περιείχε 1% w/v CMC

2.11.2.3 Μέθοδος βιοκάλυψης των σπόρων τομάτας (Seed biopriming)

Μετά την επιτυχημένη αποστείρωση των σπόρων και την κατάλληλη προετοιμασία των βακτηρίων, γίνεται η εφαρμογή των βακτηρίων στους σπόρους τομάτας με τη μέθοδο της βιοκάλυψης (Seed biopriming). Η μέθοδος περιλαμβάνει τα εξής βήματα:

- Προσθήκη 20 σπόρων τομάτας στο παραπάνω falcon που περιέχει 1% CMC και το εκάστοτε βακτηριακό στέλεχος (10⁸ cfu/ ml)
- Συνεχή ανάδευση για 60 min σε θερμοκρασία δωματίου
- Μεταφορά σε άδεια τρυβλία και στέγνωμα των σπόρων για ~1h

2.11.2.4 Σπορά εμβαπτισμένων σπόρων σε γλάστρες

Η σπορά των εμβαπτισμένων σπόρων πραγματοποιήθηκε σε γλάστρες (7 x 7 cm) σε βάθος ~1 cm από την επιφάνεια του χώματος. Το υπόστρωμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν μίγμα τύρφης και περλίτη σε αναλογία 70% και 30%. Μετά την ολοκλήρωση της σποράς οι γλάστρες της κάθε μεταχείρισης μεταφέρθηκαν σε ξεχωριστά σκαφάκια επενδυμένα με πλαστικό κάλυμμα για την αποφυγή απορροών.

2.11.2.5 Ριζοπότισμα βακτηρίων

Στο στάδιο των δύο και στο στάδιο των τεσσάρων πραγματικών φύλλων των φυτών τομάτας πραγματοποιήθηκε ριζοπότισμα με τα μεμονωμένα στελέχη και μίγματα βακτηρίων. Τα βακτήρια εμβολιάστηκαν αρχικά σε υγρό θρεπτικό μέσο NB των 5 ml και επώαστηκαν για 20 h στους 30 °C, σε θάλαμο ανάπτυξης υπό ανάδευση. Έπειτα έγινε ο εμβολιασμός 1 ml προκαλλιέργειας σε φιάσκα των 50 ml αποστειρωμένου θρεπτικού NB όπου και επώαστηκαν σε θάλαμο ανάπτυξης υπό ανάδευση στους 30°C. Τέλος, έγινε φωτομέτρηση των καλλιιεργειών και διακοπή της ανάπτυξης τους σε OD₆₀₀ = 0.45- 0.55, για τελικό αριθμό

κυττάρων 10^8 cfu/ ml, ανάλογα με το στέλεχος. Για κάθε γλάστρα έγινε ο εμβολιασμός 10 ml βακτηριακής καλλιέργειας σε ddH₂O.

2.11.2.6 Λίπανση των φυτών τομάτας με πλήρες υγρό λίπασμα

Η λίπανση των φυτών τομάτας πραγματοποιήθηκε συνολικά δύο φορές κατά τη διάρκεια του πειράματος. Η πρώτη λίπανση πραγματοποιήθηκε 3 ημέρες μετά το πρώτο ριζοπότισμα των φυτών με αγωγιμότητα 2.3 μ S και pH 6.4. Η δεύτερη λίπανση πραγματοποιήθηκε 5 ημέρες μετά το δεύτερο ριζοπότισμα με το διάλυμα να έχει αγωγιμότητα 2.45 μ S και pH 6.34.

2.11.2.7 Καταγραφή των μορφολογικών χαρακτηριστικών των φυτών

Η ανάπτυξη των φυτών σε συνθήκες θερμοκηπίου πραγματοποιήθηκε μέχρι το στάδιο των 6 πραγματικών φύλλων. Μετά την ολοκλήρωση του χρόνου ανάπτυξης των φυτών, έγινε καταγραφή των μορφολογικών χαρακτηριστικών των φυτών. Συγκεκριμένα, μετά την απομάκρυνση των φυτών από τις γλάστρες και το προσεκτικό καθαρισμό των ριζών από υπολείμματα χώματος, πραγματοποιήθηκε η ψηφιακή αποτύπωση των φυτών. Στη συνέχεια τα φυτά κόπηκαν στο σημείο του λαιμού για το διαχωρισμό του υπέργειου και ριζικού τους συστήματος. Επόμενο βήμα ήταν η τοποθέτησή τους σε ξηραντήριο ρυθμισμένο στους 70 °C για 72 h προκειμένου να γίνει η καταγραφή του ξηρού βάρους των φυτών (mg). Μετά την ψηφιακή αποτύπωση των φυτών και με τη βοήθεια του λογισμικού προγράμματος ImageJ, έγινε ο υπολογισμός του ύψους των βλαστών (cm).

2.11.2.8 Μικροσκοπική παρατήρηση των βακτηρίων στις ρίζες φυταρίων τομάτας

Μετά τον εμβολιασμό των βακτηρίων με βιο-κάλυψη των σπόρων τομάτας όπως περιγράφηκε στις ενότητες 2.11.2.2. και 2.11.2.3, δείγμα εμβολιασμένων σπόρων απομονώθηκε για μικροσκοπική παρατήρηση του αποικισμού των βακτηρίων στις ρίζες των φυταρίων τομάτας. Συγκεκριμένα, μετά από 8 ημέρες ανάπτυξης των φυταρίων τομάτας και πριν τη μικροσκοπική τους παρατήρηση, πραγματοποιήθηκε καλό ξέπλυμα των ριζών προκειμένου να απομακρυνθούν κύτταρα που δεν έχουν καταφέρει να προσκολληθούν στην επιφάνεια της ρίζας. Η μικροσκοπική παρατήρηση πραγματοποιήθηκε σε οπτικό μικροσκόπιο Olympus BX40 και οι εικόνες αποτυπώθηκαν με την ενσωματωμένη κάμερα Olympus DP71.

2.11.3 Βιολογική προστασία των φυτών *Solanum lycopersicum* var. *Chondrokatsari* Messinias με επαγωγή της διασυστηματικής ανοχής τους

Η εφαρμογή των βακτηρίων ως μεμονωμένα και μίγματα στελεχών πραγματοποιήθηκε στο σπόρο και τις ρίζες των φυτών τομάτας (*Solanum lycopersicum*). Κατά την εφαρμογή αυτή μελετήθηκε η επίδραση των βακτηρίων στην επαγωγή της διασυστηματικής ανοχής

(Induced Systemic Resistance, ISR) των φυτών. Ο έλεγχος της επαγόμενης διασυστηματικής αντοχής πραγματοποιήθηκε α) με μοριακή ανίχνευση των γονιδίων που εμπλέκονται στο ISR μονοπάτι και επάγεται η έκφρασή τους κατά την εφαρμογή των βακτηρίων και β) με τη βιολογική προστασία των φυτών τομάτας εναντίον του φυτοπαθογόνου μύκητα *Botrytis cinerea*, μετά την εφαρμογή του στα φύλλα των φυτών.

2.11.3.1 Έκφραση γονιδίων που εμπλέκονται στην ενεργοποίηση της επαγόμενης διασυστηματικής αντοχής (ISR) των φυτών

Οι δειγματοληψίες των φυτών πραγματοποιήθηκαν όταν τα φυτά ήταν στο στάδιο των δύο πραγματικών φύλλων (~15 ημέρες αργότερα), μετά την εφαρμογή των βακτηρίων με τη μέθοδο bio-priming στους σπόρους τομάτας (πριν το πρώτο ριζοπότισμα), καθώς και στις 24 h από τον επιπρόσθετο εμβολιασμό των βακτηρίων με ριζοπότισμα.

2.11.3.1.1 Απομόνωση ολικού RNA

Από την κάθε εφαρμογή αφαιρέθηκαν συνολικά 6-8 πρώτα πραγματικά φύλλα, τα οποία αμέσως μετά την κοπή τους μεταφέρθηκαν σε φιάλη με υγρό άζωτο. Για την απομόνωση του φυτικού RNA ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο όπως ορίζεται από την εταιρεία Macherey-Nagel (NucleoSpin® RNA Plus).

- Ποσότητα 100 µg φυτικού ιστού ομογενοποιήθηκε με μηχανική κονιορτοποίηση.
- προστέθηκαν 350 µl διαλύματος λύσης (Lysis Buffer, LBP) των φυτικών κυττάρων και πραγματοποιήθηκε ανάδευση στο vortex για 15 δευτερόλεπτα.
- το διάλυμα μεταφέρθηκε στην κολώνα NucleoSpin® gDNA Removal Column, φυγοκεντρήθηκε στις 11000 στροφές για 30 δευτερόλεπτα και η κολώνα απορρίφθηκε.
- 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.
- 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.
- προστέθηκε ποσότητα 250 µl διαλύματος ξεπλύματος No2 (Wash Buffer, WB2) στην κολώνα και έγινε φυγοκέντρωση στις 11000 στροφές για 2 λεπτά.

- για την έκλωση του RNA η κολώνα μεταφέρθηκε σε δοχείο eppendorf, προστέθηκε ποσότητα 30 μl νερού απαλλαγμένου από RNAses (RNase-free water) και πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση στις 11000 στροφές για 1 λεπτό.
- το τελευταίο βήμα επαναλήφθηκε και το δοχείο eppendorf με το RNA αποθηκεύτηκε στους -80 °C.

2.11.3.1.2 Καθαρισμός του ολικού RNA

Επόμενο και βασικό βήμα της διαδικασίας είναι καθαρισμός του RNA, όπως περιγράφεται παρακάτω:

- Μεταφορά 3 mg RNA σε καινούριο φιαλίδιο eppendorf και προσθήκη ddH₂O μέχρι τελικό όγκο 20 μl
- Προσθήκη 1 μl DNase stock solution και επώαση στους 37 °C για 60 λεπτά
- Προσθήκη ddH₂O μέχρι τελικό όγκο 200 μl
- Προσθήκη 200 μl φαινόλης (καλή ομογενοποίηση του δείγματος)
- Φυγοκέντρηση για 5 min, στις 15.000 rpm (απομάκρυνση του υπερκείμενου)
- Προσθήκη 100 μl φαινόλης και 100 μl χλωροφορμίου (καλή ανάδευση του δείγματος)
- Φυγοκέντρηση για 5 min στις 15.000 rpm (απομάκρυνση του υπερκείμενου)
- Προσθήκη 200 μl χλωροφορμίου (καλή ανάδευση του δείγματος)
- Φυγοκέντρηση για 5 min, στις 15.000 rpm και μεταφορά του υπερκείμενου σε νέο φιαλίδιο eppendorf (1,5 ml)
- Προσθήκη 1/10 του όγκου 3 M οξικού νατρίου pH 5.2 και 2 ½ του όγκου 100% αιθανόλη
- Καλή ανακίνηση του διαλύματος και επώαση για 60 min στους -80 °C
- Φυγοκέντρηση για 20 min, στις 15.000 rpm, στους 4 °C (απομάκρυνση του υπερκείμενου)
- Προσθήκη 200 μl 70 % αιθανόλης
- Φυγοκέντρηση για 20 min, στις 15.000 rpm, στους 4 °C (απομάκρυνση του υπερκείμενου) (x2)
- Προσθήκη 11 μl ddH₂O και αποθήκευση στους -80 °C

2.11.3.1.3 Σύνθεση του cDNA

Η αντίστροφη μεταγραφή (Reverse Transcription, RT) είναι η διαδικασία σύνθεσης μιας συμπληρωματικής αλυσίδας DNA (cDNA) έχοντας ως εκμαγείο μόριο RNA, με τη βοήθεια του ενζύμου αντίστροφη μεταγραφάση (ή αντίστροφη τρανσκριπτάση), το οποίο στη φύση

βρίσκεται σε RNA-ιούς (ρετροϊούς). Έτσι, επιτρέπεται η μετατροπή των ευαίσθητων μορίων RNA σε σταθερά, συμπληρωματικά μόρια DNA, τα οποία μπορούν να μελετηθούν περαιτέρω. Αφού ελέγχθηκε η καθαρότητα και η ποσότητα που απομονωμένου RNA, πραγματοποιήθηκε σύνθεση του cDNA με αντίστροφη μεταγραφή του mRNA, σύμφωνα με τις οδηγίες πρωτοκόλλου του PrimeScript 1st strand cDNA, Synthesis Kit (Takara Bio).

1. Διάλυμα Α

- 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)

2. Επώαση για 5 min στους 65 °C και ταχεία μεταφορά στο πάγο αμέσως μετά

3. Διάλυμα Β

- 4 μl ρυθμιστικό διάλυμα (5x Prime Script Buffer)
- 0,5 μl αναστολείς της RNase (RNase Inhibitor)
- 1 μl αντίστροφη μεταγραφάση (Prime Script RTase)
- 4,5 μl υπερκάθαρο dH₂O (χωρίς RNase)

4. Ανάμιξη του Διαλύματος Α με το Διάλυμα Β και καλή ανάδευση

5. Επώαση για 60 min στους 42 °C

6. Επώαση στους 95 °C για 5 min, για την απενεργοποίηση του ενζύμου

7. Αποθήκευση στους -20 °C

2.11.3.1.4 Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (real-time PCR)

Ως μήτρα της RT-qPCR χρησιμοποιείται το cDNA που αποκτήσαμε 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 αρνητικού μάρτυρα χωρίς προσθήκη cDNA (Non-Template Control, NTC) για να ελεγχθεί η ύπαρξη επιμόλυνσης.

Η αναλογία των συστατικών της RT-qPCR είναι η εξής:

Πίνακας 2.5 Αναλογία των συστατικών που απαιτούνται για την πραγματοποίηση της RT-qPCR.

Συστατικά	Όγκος (μl)
Forward Primer (10 μM)	1
Reverse Primer (10 μM)	1
SYBR GREEN PowerUp	10
cDNA (1:50)	5
ster. ultra pure H ₂ O	3
Τελικός όγκος	20

Το πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν το ακόλουθο :

- Ενεργοποίηση του UDG ενζύμου (Uracil-DNA Glycosylase) στους 50°C για 2 min
- Ενεργοποίηση του ενζύμου πολυμεράσης στους 95 °C για 2 min
- Αποδιάταξη της μήτρας cDNA 95 °C για 15 sec
- Υβριδισμός των εκκινητών στους 60 °C για 15 sec
- Επιμήκυνση στους 72°C για 1 min
- Επανάληψη των βημάτων 3-5 (40 φορές συνολικά)

Ως γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο της ουμπικουιτίνης (*ubi3*), ενώ ως γονίδια στόχοι εξετάστηκαν τα γονίδια *ERF1*, *ACO1* και *TomLoxA*, τα οποία εμπλέκονται στο μονοπάτι ενεργοποίησης του γιασμονικού οξέος (JA)/ αιθυλενίου (ET) και τα γονίδια *PR1*, *PR2* και *PR3* που κωδικοποιούν για τις PR πρωτεΐνες (Pathogenesis Related proteins) και οι οποίες εμπλέκονται στο μονοπάτι του σαλικυλικού οξέος (SA). Τα ζεύγη εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν παραθέτονται στον παρακάτω Πίνακα 2.6. Σε όσα γονίδια δεν αναφέρεται κάποια αναφορά σχεδιάστηκαν με το λογισμικό Beacon Designer 7.

Πίνακας 2.6 Ζεύγη εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στην RT-qPCR.

Γονίδιο	Εκκινητής Forward	Εκκινητής Reverse	Αναφορά
<i>Ubiquitin (ubi3)</i>	5'-GCAGACTATAACATCCAGAAAGAG-3'	5'-AACAACAAAGCACACAGCCATC-3'	Rotenberg et al., 2006
<i>ERF1</i>	5'-ATTGGAGTTAGAAAGAGGCCAT-3'	5'-CTCATTGATAATGCGGCTTG-3'	Jia et al., 2012
<i>ACO1</i>	5'-TTCCAGCACCAGAGTTGATTG-3'	5'-ACAGTAGTCTCCACAGCCTTC-3'	-
<i>PR1</i>	5'-GTGTCCGAGAGGCCAGACTA-3'	5'-ATTGTTGCAACGAGCCCGA-3'	Li et al., 2019
<i>PR2</i>	5'-TCCAGGTAGAGACAGTGGTAAA-3'	5'-CCTAAATATGTCGCGGTTGAGA-3'	Li et al., 2019
<i>PR3</i>	5'-AATTGTCAGAGCCAGTGTC-3'	5'-TCCAAAAGACCTCTGATTGC-3'	-
<i>TomLoxA</i>	5'-TGAACCATGGTGGGCTGAAA-3'	5'-CTGCCCGAAATTGACTGCTG-3'	Tucci et al., 2011

Μετά την πραγματοποίηση των απαιτούμενων αντιδράσεων, ακολουθεί η ανάλυση των αποτελεσμάτων. Η απόδοση της αντίδρασης (Efficiency, E) για κάθε γονίδιο-στόχο υπολογίζεται 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 που προκύπτει από την εξίσωση Pfaffl (Pfaffl, 2001):

$$\frac{E_{ref}^{Ct_{ref}}}{E_{target}^{Ct_{target}}}$$

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

Οι στατιστικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν στις λογαριθμικές τιμές της σχετικής έκφρασης, δηλαδή στα ΔCt , 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 95% διάστημα εμπιστοσύνης (Mean $\pm$ CI).

2.11.3.2 Βιολογική προστασία των φυτών *Solanum lycopersicum* εναντίον του φυτοπαθογόνου μύκητα *Botrytis cinerea*

Η εφαρμογή του φυτοπαθογόνου μύκητα *Botrytis cinerea* πραγματοποιήθηκε σε φύλλα φυτών τομάτας που αναπτύχθηκαν σε συνθήκες θερμοκηπίου στην ενότητα 2.11.2. Τα φυτά τομάτας που είχαν εμβολιασθεί με μεμονωμένα στελέχη και μίγματα βακτηρίων με τη μέθοδο της βιοκάλυψης των σπόρων αλλά και με ριζοπότισμα.

2.11.3.2.1 Μόλυνση των φυτών με το φυτοπαθογόνο μύκητα *Botrytis cinerea*

Αρχικά, ο φυτοπαθογόνος μύκητας *Botrytis cinerea* αναπτύχθηκε σε στερεό θρεπτικό μέσο PDA (1, 5 % άγαρ) στους 25 °C για 15 ημέρες, μέχρι την πλήρη κάλυψη του τρυβλίου με σπόρια. Έπειτα, στο τρυβλίο έγινε η προσθήκη 10 ml 10 mM $MgCl_2$ και με τη χρήση μιας λυγισμένης πιπέτας Pasteur πραγματοποιήθηκε το ξύσιμο των υφών, προκειμένου να ελευθερωθούν τα σπόρια στο διάλυμα. Στη συνέχεια, το διάλυμα των υφών και σπορίων του μύκητα διέρχεται από αποστειρωμένη γάζα, για την κατακράτηση των υφών και τη συλλογή των σπορίων. Συνολικός όγκος 10 μl φιλτραρισμένης καλλιέργειας ($\sim 10^5$ σπόρια/ ml) εμβολιάστηκε στο δεύτερο πραγματικό φύλλο των φυτών τομάτας, με ελαφρύ ξύσιμο της επιδερμίδας των φύλλων για τη διευκόλυνση της μόλυνσης. Μετά την ολοκλήρωση των εμβολιασμών, έγινε κάλυψη των φυτών με πλαστική διάφανη μεμβράνη για τη διατήρηση της υγρασίας και την επιτάχυνση της μόλυνσης. Η τελική παρατήρηση και αποτύπωση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε πέντε ημέρες μετά την εφαρμογή του μύκητα.

2.11.3.2.2 Αξιολόγηση της σοβαρότητας της ασθένειας

Αρχικό βήμα για τον υπολογισμό της σοβαρότητας της ασθένειας, είναι ο υπολογισμός του ορατού εμβαδού της νεκρωτικής κηλίδας που δημιουργεί ο φυτοπαθογόνος μύκητας πάνω στα φύλλα τομάτας καθώς και του ολικού εμβαδού του αντίστοιχου φύλλου, με τη βοήθεια του λογισμικού προγράμματος ImageJ. Η σοβαρότητα της ασθένειας υπολογίστηκε σύμφωνα με την εξίσωση:

$$\% \text{ Σοβαρότητα της ασθένειας (Disease severity, DS)} = \frac{\text{Εμβαδόν νεκρωτικής κηλίδας}}{\text{Συνολικό εμβαδό φύλλου}} \times 100,$$

υπολογίζεται το ποσοστό % της σοβαρότητας της ασθένειας (Disease severity) για κάθε φύλλο ξεχωριστά, ως ο λόγος του εμβαδού της νεκρωτικής κηλίδας πάνω στο φύλλο προς το αντίστοιχο ολικό εμβαδόν του φύλλου την τελική ημέρα παρατήρησης της ασθένειας. Ο υπολογισμό του δείκτη της σοβαρότητας της ασθένειας πραγματοποιήθηκε βάσει της κλίμακας H-B (Horsfall- Barrat) που αναπτύχθηκε από τους Barratt και Horsfall, (1945) και τροποποιήθηκε ανάλογα με τα αποτελέσματα (Barratt & Horsfall, 1945; Bock et al., 2008; Horsfall, 1945; Horsfall & Cowling, 1978; Nutter & Esker, 2006; Slopek, 1989). Από το ποσοστό της σοβαρότητας της ασθένειας προκύπτει μια ποσοστιαία διαβαθμισμένη κλίμακα της σοβαρότητας της ασθένειας (Rating scale). Με γνώμονα την κλίμακα που προκύπτει και με τη βοήθεια της εξίσωσης:

$$\% \text{ Δείκτης σοβαρότητας της ασθένειας (Disease severity index, DSI)} = \frac{\Sigma(\text{Αριθμός μολυσμένων φύλλων} \times \text{Αντίστοιχη τιμή της κλίμακας έντασης της ασθένειας (DS)})}{\text{Συνολικός αριθμός φύλλων (N)} \times \text{Μέγιστη τιμή της κλίμακας σοβαρότητας της ασθένειας}} \times 100,$$

υπολογίζεται ο δείκτης της σοβαρότητας της ασθένειας (Disease Severity Index, DSI) για την κάθε μεταχείριση ξεχωριστά. Τέλος, με τη βοήθεια της εξίσωσης:

$$\% \text{ Βιολογικός έλεγχος της ασθένειας (Disease control value, DCV)} = \frac{\% \text{ Δείκτης της έντασης της ασθένειας της Control μεταχείρισης}}{\% \text{ Δείκτης της έντασης της ασθένειας κάθε μεταχείρισης}} \times 100,$$

υπολογίζεται το ποσοστό του βιολογικού ελέγχου της ασθένειας (Disease control value, DCV).

2.12 Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση των δεδομένων πραγματοποιήθηκε στο πρόγραμμα στατιστικής ανάλυσης SPSS v.25.0. Αρχικό βήμα πριν από την πραγματοποίηση οποιασδήποτε

στατιστικής ανάλυσης, είναι ο έλεγχος της κανονικότητας (Normality) των δειγμάτων με την πραγματοποίηση του τεστ των *Shapiro- Wilk* καθώς και ο έλεγχος ισότητας των διακυμάνσεων των δειγμάτων (τεστ ομοιογένειας, *homogeneity test*) με την πραγματοποίηση του *Levene* τεστ. Στα δεδομένα των δειγμάτων που ακολουθούν κανονική κατανομή και ταυτόχρονα παρουσιάζουν ομοιογένεια, πραγματοποιήθηκε ανάλυση διακύμανσης (*Analysis Of Variance, ANOVA*) κατά έναν παράγοντα (*One way*). Για τον έλεγχο σημαντικότητας μεταξύ των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε α) *T-test* για τον έλεγχο της διαφοράς δύο μέσων από ανεξάρτητα δείγματα β) το παραμετρικό τεστ πολλαπλών συγκρίσεων *Tukey* ($p < 0.05$) για την ανάδειξη των στατιστικά σημαντικών διαφορών του μέσου όρου μεταξύ όλων των δειγμάτων (ίσα μεγέθη) και γ) το παραμετρικό τεστ πολλαπλών συγκρίσεων *Dunnnett* για την ανάδειξη των στατιστικά σημαντικών διαφορών του μέσου όρου των δειγμάτων ανά δύο (μεταξύ της κάθε μεταχείρισης και του δείγματος μάρτυρα).

2.13 Αλληλούχιση και επισημείωση του γονιδιώματος

Τα γονιδιώματα των ενδοφυτικών στελεχών *Cal.30*, *Cal.4* και *Cal.11* καθώς και του ριζοσφαιρικού βακτηρίου *Pseudomonas carnis* X (προηγούμενη ονομασία *Pseudomonas fluorescens* X) αλληλουχήθηκαν πλήρως από την εταιρία *SNPsaurus* (Eugene, OR), με τη χρήση του αναλυτή της *Illumina HiSeq 2000*, ακολουθώντας την τυπική ροή εργασίας που περιλαμβάνει το φιλτράρισμα (*trimming*) των αλληλουχιών του DNA- διαβάσματα (*reads*), τη συναρμολόγηση (*assembly*) των φιλτραρισμένων αλληλουχιών για τη δημιουργία των αλληλεπικαλυπτόμενων κλώνων (*contigs*) και την προετοιμασία της βιβλιοθήκης. Η κατασκευή των βιβλιοθηκών πραγματοποιήθηκαν με *Nextera tagmentation kit* και αλληλουχήθηκαν χρησιμοποιώντας 2 x 150 bp διαβάσματα (*reads*). Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε φιλτράρισμα (*trimming*) των ειδικών προσαρμογέων (*adaptors*) με *BBDuk* και στη συνέχεια συναρμολογήθηκαν με το εργαλείο συναρμολόγησης *SPAdes 3.12.0* χρησιμοποιώντας προεπιλεγμένες παραμέτρους (Bankevich et al. 2012). Το τελικό μέγεθος των συνολικών διαβασμάτων (*reads*) (2 x 150 bp *paired-end format*) που προέκυψαν ήταν 1.546.685 για το στέλεχος *Cal.l.30*, 1.251.500 για το στέλεχος *Cal.f.4*, 1.442.900 για το στέλεχος *Cal.l.11* και 15.051.127 για το στέλεχος X, με κάλυψη της ακολουθίας >60 X. Το τελικό γονιδίωμα του στελέχους *Cal.l.30* (NCBI accession: JAEACK000000000) συναρμολογήθηκε *de novo* (*de novo assembly*) σε 9 scaffolds (ενοποιημένα *contigs*) συνολικού μεγέθους 4.206.058 bp, του στελέχους *Cal.f.4* (NCBI accession: JAEACI000000000) συναρμολογήθηκε σε 12 scaffolds συνολικού μεγέθους 4.283.396 bp, του στελέχους *Cal.l.11* (NCBI accession: JAEACJ000000000) συναρμολογήθηκε σε 11

scaffolds συνολικού μεγέθους 4,212,585 bp, και του στελέχους X (NCBI accession: JAEACS000000000) συναρμολογήθηκε σε 14 scaffolds συνολικού μεγέθους 5.984.267bp.

2.13.1 Εργαλεία βιοπληροφορικής ανάλυσης (Genomic analysis tools)

Οι τιμές του *in silico* DNA-DNA υβριδισμού (digital DNA-DNA hybridization, dDDH) των βακτηρίων υπολογίσθηκαν με τη χρήση του εργαλείου Genome-to-Genome Distance Calculator (GGDC 2.1) (<http://ggdc.dsmz.de/distcalc2.php>) (Fan et al., 2017a; Meter-Kolthoff et al., 2013). Οι τιμές του ANI (Average nucleotide identity) των γονιδιωμάτων υπολογίσθηκαν στην ανοιχτή βάση γονιδιωμάτων EzGenome (<http://www.ezbiocloud.net/ezgenome/ani>) (Yoon et al., 2017). Το πρωτέομα των τριών στελεχών του είδους *B.halotolerans* Cal.l.30, Cal.l.11 και Cal.f.4 αναλύθηκε στην ανοιχτή βάση δεδομένων Carbohydrate-Active enZymes (CAZy) (<http://www.cazy.org/>) και στο διακομιστή ιστού Carbohydrate-active enzyme ANnotation dbCAN2 (<http://bcb.unl.edu/dbCAN2/>). Η ανάλυση των δευτερογενών μεταβολιτών πραγματοποιήθηκαν μέσω του antiSMASH (<https://antismash.secondarymetabolites.org>). Οι δομές αδευνλίωσης και συμπύκνωσης των των μη ριβοσωμικών πεπτιδικών συνθετασών (Non-Ribosomal Polypeptide Synthetases, NRPSs) και η αμινοξική τους αλληλουχία, ταυτοποιήθηκαν μέσω του antiSMASH και του εργαλείου PKS/NRPS Analysis Web-tool (PKS/NRPS.igs. umaryland.edu). Τα ένζυμα και γονίδια περιορισμού και τροποποίησης ταυτοποιήθηκαν μέσω της βάσης δεδομένων REBASE (<http://rebase.neb.com>), της επισημείωσης (annotation) του γονιδιώματος και με BlastP. Η ανάλυση του γονιδιώματος του στελέχους X πραγματοποιήθηκε επίσης μέσω BlastP και BlastN ανάλυση.

Αποτελέσματα



3. Αποτελέσματα

3.1 Απομόνωση ενδοφυτικών βακτηρίων του φαρμακευτικού φυτού *Calendula officinalis*

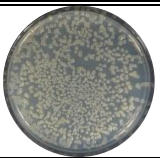
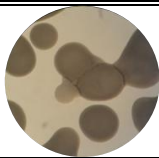
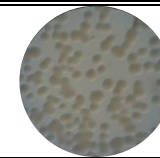
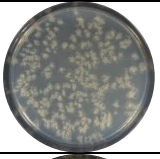
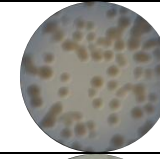
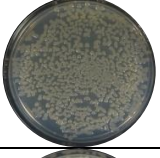
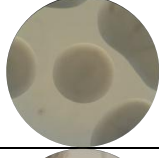
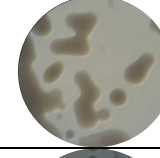
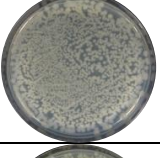
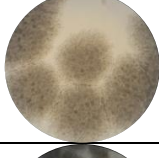
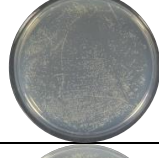
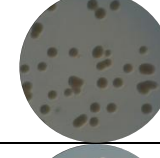
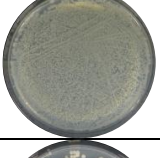
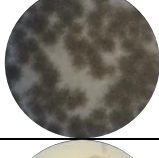
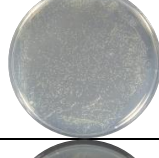
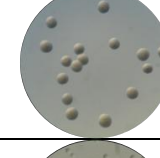
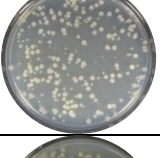
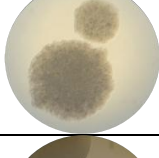
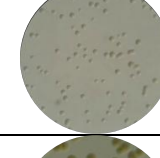
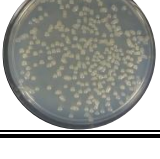
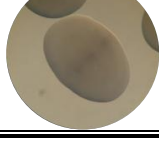
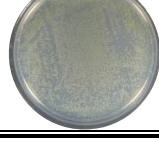
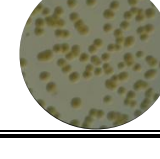
Τα ενδοφυτικά βακτήρια που μελετήθηκαν στην παρούσα διδακτορική διατριβή απομονώθηκαν από ασυμπτωματικούς ιστούς φύλλων, ανθέων και ρίζας, του φαρμακευτικού φυτού *Calendula officinalis*. Τα καλλιεργήσιμα βακτήρια που απομονώθηκαν ανέρχονται σε 119 στελέχη, τα οποία κατηγοριοποιήθηκαν με βάση τη μορφολογία το χρώμα, το μέγεθος και την υφή της αποικίας τους, σε 14 περαιτέρω μορφότυπους, εκ των οποίων 37 αντιπροσωπευτικά στελέχη στάλθηκαν για μοριακή ταυτοποίηση με βάση την περιοχή 16S rRNA.

3.1.1 Μορφολογική κατηγοριοποίηση των αντιπροσωπευτικών ενδοφυτικών βακτηρίων που απομονώθηκαν

Τα βακτήρια που απομονώθηκαν κατηγοριοποιήθηκαν με βάση τη μορφολογία της αποικίας τους, το μέγεθος, την υφή, το σχήμα και το χρώμα τους. Έτσι προέκυψαν δύο βασικές κατηγορίες η Α και η Β. Η κατηγορία Α χωρίζεται σε επτά επιμέρους κατηγορίες, όπου μετά από φυλογενετική μοριακή ταυτοποίηση βρέθηκε να ανήκουν στο γένος *Bacillus* (*B. velezensis*, *B. halotolerans*, *B. subtilis*, *B. megaterium*, *B. mycoides*, *B. proteolyticus*/ *B. wiedmannii*). Τα υπόλοιπα βακτήρια (Κατηγορία Β, Γ, Δ, Ε) που απομονώθηκαν ανήκουν στα γένη *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Stenotrophomonas* και *Pantoea* αντίστοιχα (Πίν. 3.1).

Όπως παρατηρείται και στις παρακάτω εικόνες του Πίνακα 3.1, τα βακτήρια των κατηγοριών Α3 και Α7 έχουν αποικίες στρογγυλού σχήματος, λευκού χρώματος, λείας επιφάνειας και μεγάλου μεγέθους. Τα βακτήρια της κατηγορίας Α1 έχουν αποικίες ακανόνιστου σχήματος, λευκού χρώματος, λείας επιφάνειας και μεγάλου μεγέθους. Τα βακτήρια των κατηγοριών Α4 και Α6 έχουν λευκό χρώμα αποικίας, στρογγυλό σχήμα, τραχιά υφή και μεγάλο μέγεθος. Τα βακτήρια της κατηγορίας Α5 έχουν επίσης τραχιά υφή, στρογγυλό σχήμα και λευκό χρώμα αποικίας αλλά το μέγεθός τους είναι μικρότερο σε σχέση με εκείνο των Α4 και Α6. Τέλος, έχουμε τα βακτήρια της κατηγορίας Α2 τα οποία εμφανίζουν αποικία λευκού- κίτρινου χρώματος, ακανόνιστου σχήματος με μακριές απολήξεις, παραπέμποντας σε υφές μυκήτων, σχηματίζοντας έτσι αποικίες μεγάλου μεγέθους.

Πίνακας 3.1 Κατηγοριοποίηση των ενδοφυτικών βακτηρίων με βάση τη μακροσκοπική και στερεοσκοπική παρατήρηση των αποικιών τους. Οι κατηγορίες των στελεχών περιλαμβάνουν βακτήρια των γενών *Bacillus* (A1-7), *Pseudomonas* (B1-4), *Rhizobium* (Γ1), *Stenotrophomonas* (Δ1) και *Pantoea* (Ε1).

<i>Bacillus</i> spp.			<i>Pseudomonas</i> spp., <i>Rhizobium</i> sp., <i>Pantoea</i> sp., <i>Stenotrophomonas</i> sp.		
Βακτηριακά Στελέχη	Μακροσκοπικά	Στερεοσκόπιο 4x	Βακτηριακά στελέχη	Μακροσκοπικά	Στερεοσκόπιο 4x
A1 Cal.r.29, Cal.l.33			B1 Cal.r.20, Cal.r.30, Cal.r.38.1		
A2 Cal.r.31.1, Cal.r.17			B2 Cal.r.21, Cal.r.37.1, Cal.r.15		
A3 Cal.r.19, Cal.r.22			B3 Cal.r.6, Cal.r.3		
A4 Cal.f.5, Cal.r.1, Cal.l.1, Cal.f.1			B4 Cal.l.6, Cal.f.9		
A5 Cal.r.27, Cal.r.7			Γ1 Cal.r.35		
A6 Cal.r.33, Cal.r.28, Cal.f.2			Δ1 Cal.r.8.2		
A7 Cal.f.4, Cal.l.11, Cal.f.6.3, Cal.f.2.1, Cal.l.20, Cal.l.30, Cal.r.11, Cal.f.6.1, Cal.l.21			Ε1 Cal.l.7a		

Στην κατηγορία B, βρέθηκαν τέσσερις επιμέρους κατηγορίες βακτηρίων οι οποίες ανήκουν στα γένη *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Stenotrophomonas* και *Pantoea*. Τα στελέχη των κατηγοριών που προέκυψαν εμφανίζουν κοινά χαρακτηριστικά στις αποικίες τους οι οποίες είναι μικρού μεγέθους, στρογγυλού σχήματος και λείας επιφάνειας, με τις κυριότερες διαφορές τους να εντοπίζονται στο χρώμα των αποικιών. Τα βακτήρια του γένους *Pseudomonas* έχουν αποικίες διάφανου προς κρεμ χρώματος, του γένους *Pantoea* χρώμα κίτρινο, ενώ του γένους *Stenotrophomonas* και *Rhizobium* είναι απαλό λευκό. Τέλος, το μέγεθος των αποικιών των βακτηρίων του γένους *Stenotrophomonas* είναι το πιο μικρό μέγεθος σε σχέση με τα βακτήρια των υπόλοιπων γενών.

3.1.2 Φυλογενετική ανάλυση με βάση το 16S rRNA

Μετά τη μορφολογική κατηγοριοποίηση των βακτηρίων, αντιπροσωπευτικά στελέχη όλων των κατηγοριών ταυτοποιήθηκαν περαιτέρω με την πραγματοποίηση φυλογενετικής ανάλυσης. Ως φυλογενετικός δείκτης επιλέχθηκε η συντηρημένη περιοχή 16S rRNA. Προέκυψαν επομένως δύο βασικές κατηγορίες βακτηρίων με την πρώτη να περιλαμβάνει 24 στελέχη του γένους *Bacillus*, ενώ η δεύτερη περιλαμβάνει 10 στελέχη του γένους *Pseudomonas* και από ένα αντιπροσωπευτικό στέλεχος των γενών *Agrobacterium*/*Rhizobium*, *Stenotrophomonas* και *Pantoea*. Στους παρακάτω πίνακες (Πίνακας 3.2, 3.3) παρουσιάζονται τα γένη και τα πιο κοντινά είδη βακτηρίων που προέκυψαν μετά τη φυλογενετική ανάλυση του 16S rRNA καθώς και η ομολογία που εμφανίζουν με το κάθε στέλεχος.

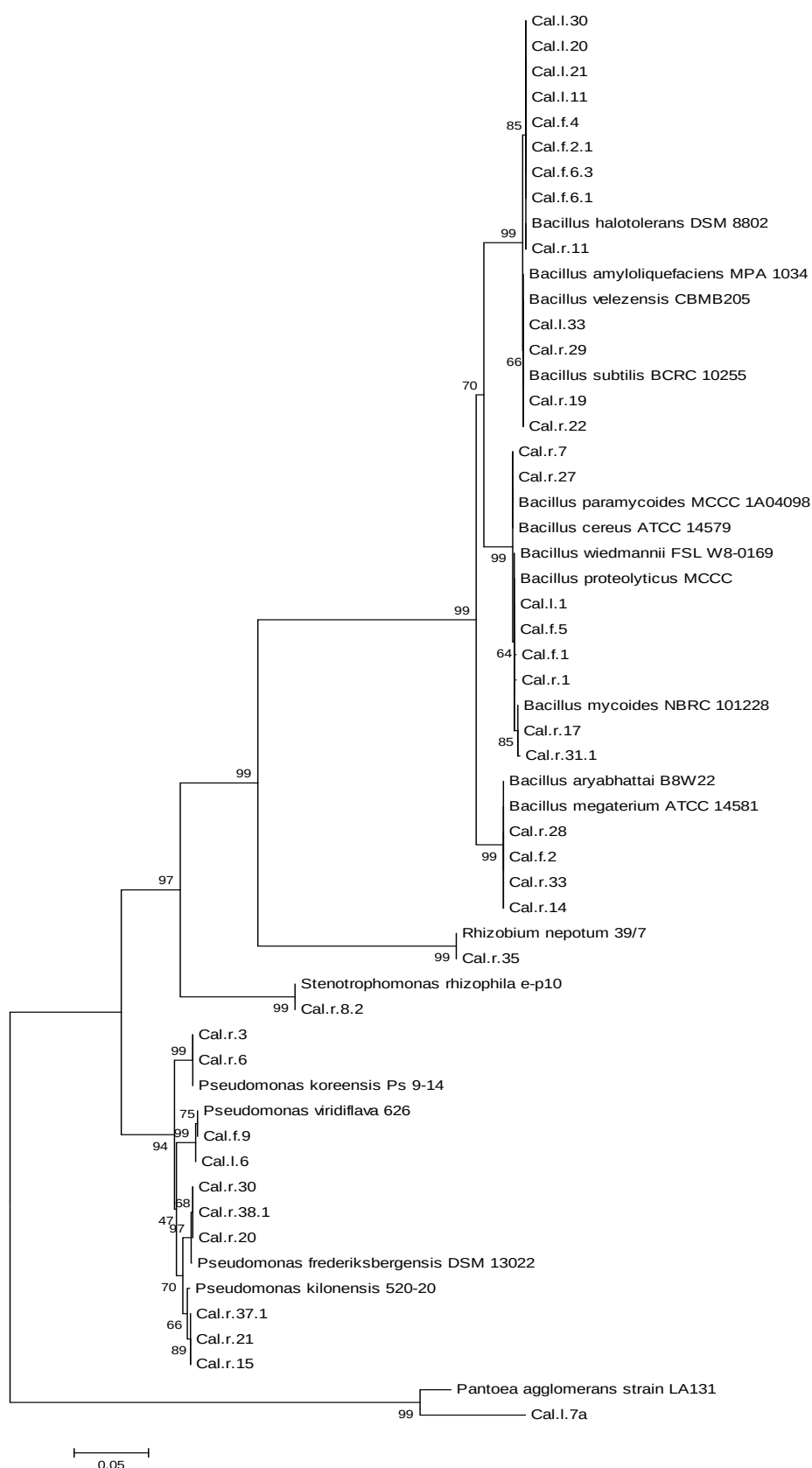
Πίνακας 3.2 Ταυτοποίηση των βακτηριακών στελεχών της Α κατηγορίας με βάση τη νουκλεοτιδική αλληλουχία του γονιδίου 16S rRNA.

Κατηγορία	Στέλεχος	Κοντινότερο είδος με βάση το γονίδιο 16S rRNA	% Ομολογία	Κωδικός GenBank
A1	Cal.r.29	<i>Bacillus velezensis</i> CBMB205 (NR_116240.1)	99.73	MW267297
	Cal.l.33	<i>Bacillus velezensis</i> CBMB205 (NR_116240.1)	99.73	MW266119
A2	Cal.r.31.1	<i>Bacillus mycoides</i> NBRC 101228 (NR_113990.1)	99.46	MW273495
	Cal.r.17	<i>Bacillus mycoides</i> NBRC 101228 (NR_113990.1)	99.46	MW273439
A3	Cal.r.19	<i>Bacillus subtilis</i> BCRC 10255 (NR_116017.1)	99.28	MW266538
	Cal.r.22	<i>Bacillus subtilis</i> BCRC 10255 (NR_116017.1)	99.64	MW267132
A4	Cal.f.5	<i>Bacillus proteolyticus</i> 4275 (MT544821.1)	99.46	MW267743
	Cal.r.1	<i>Bacillus proteolyticus</i> MCCC 1A00365 (NR_157735.1)	98.58	MW267751
	Cal.l.1	<i>Bacillus proteolyticus</i> MCCC 1A00365 (NR_157735.1)	99.37	MW267272
	Cal.f.1	<i>Bacillus wiedmannii</i> FSL W8-0169 (NR_152692.1)	98.75	-
A5	Cal.r.7	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579 (NR_074540.1)	99.73	MW267752
	Cal.r.27	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579 (NR_074540.1)	99.19	MW268768
A6	Cal.r.33	<i>Bacillus megaterium</i> ATCC 14581 (NR_116873.1)	99.28	MW266394
	Cal.r.28	<i>Bacillus megaterium</i> ATCC 14581 (NR_116873.1)	99.02	MW266126
	Cal.f.2	<i>Bacillus megaterium</i> ATCC 14581 (NR_116873.1)	99.37	MW266131
A7	Cal.r.11	<i>Bacillus halotolerans</i> DSM 8802 (NR_115063.1)	99.37	MW271042
	Cal.l.11	<i>Bacillus halotolerans</i> DSM 8802 (NR_115063.1)	99.55	MW269980
	Cal.l.21	<i>Bacillus halotolerans</i> DSM 8802 (NR_115063.1)	99.01	MW273383
	Cal.l.30	<i>Bacillus halotolerans</i> DSM 8802 (NR_115063.1)	99.01	MW273438
	Cal.l.20	<i>Bacillus halotolerans</i> DSM 8802 (NR_115063.1)	99.28	MW271029
	Cal.f.2.1	<i>Bacillus halotolerans</i> DSM 8802 (NR_115063.1)	99.10	MW27292
	Cal.f.6.1	<i>Bacillus halotolerans</i> DSM 8802 (NR_115063.1)	99.82	MW268769
	Cal.f.6.3	<i>Bacillus halotolerans</i> DSM 8802 (NR_115063.1)	99.19	MW268770
	Cal.f.4	<i>Bacillus halotolerans</i> DSM 8802 (NR_115063.1)	99.73	MW273370

Πίνακας 3.3 Ταυτοποίηση των βακτηριακών στελεχών της Β κατηγορίας με βάση τη νουκλεοτιδική αλληλουχία του γονιδίου 16S rRNA.

Κατηγορία	Στέλεχος	Κοντινότερο είδος με βάση το γονίδιο 16S rRNA	% Ομολογία	Κωδικός GenBank
B1	Cal.r.20	<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i> DSM 13022 (NR_117177.1)	98.73	MW286788
	Cal.r.30	<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i> DSM 13022 (NR_117177.1)	99.55	MW287260
	Cal.r.38.1	<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i> DSM 13022 (NR_117177.1)	99.37	MW287271
B2	Cal.r.21	<i>Pseudomonas kilonensis</i> 520-20 (NR_028929.1)	99.64	MW288015
	Cal.r.37.1	<i>Pseudomonas kilonensis</i> 520-20 (NR_028929.1)	99.64	MW287272
	Cal.r.15	<i>Pseudomonas kilonensis</i> 520-20 (NR_028929.1)	99.64	MW288016
B3	Cal.r.6	<i>Pseudomonas koreensis</i> Ps 9-14 (NR_025228.1)	99.28	MW286787
	Cal.r.3	<i>Pseudomonas koreensis</i> Ps 9-14 (NR_025228.1)	99.19	MW286768
B4	Cal.l.6	<i>Pseudomonas viridiflava</i> (NR_117825.1)	99.73	MW287322
	Cal.f.9	<i>Pseudomonas viridiflava</i> (NR_117825.1)	99.73	MW287324
Γ1	Cal.r.35	<i>Rhizobium nepotum</i> 39/7 (NR_117203.1) <i>Agrobacterium tumefaciens</i> ISSDS-755 (EF620460.1)	99.62	MW286763
Δ1	Cal.r.8.2	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i> e-p10 (NR_121739.1)	99.28	MW287326
E1	Cal.l.7a	<i>Pantoea agglomerans</i> LA131 (MN006238.1)	89.73	-

3.1.2.1 Φυλογενετικό δέντρο επιλεγμένων ενδοφυτικών βακτηρίων



Εικόνα 3.1 Φυλογενετικό δέντρο των ενδοφυτικών βακτηρίων και στελεχών αναφοράς κατασκευασμένο με βάση τη νουκλεοτιδική αλληλουχία του γονιδίου 16S rRNA. Οι εξελικτικές αποστάσεις υπολογίστηκαν με τη μέθοδο Kimura 2-parameter model (Tamura *et al.*, 2011) του προγράμματος MEGA6 και η κλίμακα αντιπροσωπεύει τον αριθμό υποκαταστάσεων ανά θέση.

3.1.4 Διαφοροποίηση των ενδοφυτικών στελεχών ανά είδος με *in vitro* αλληλεπιδράσεις (Kin discrimination)

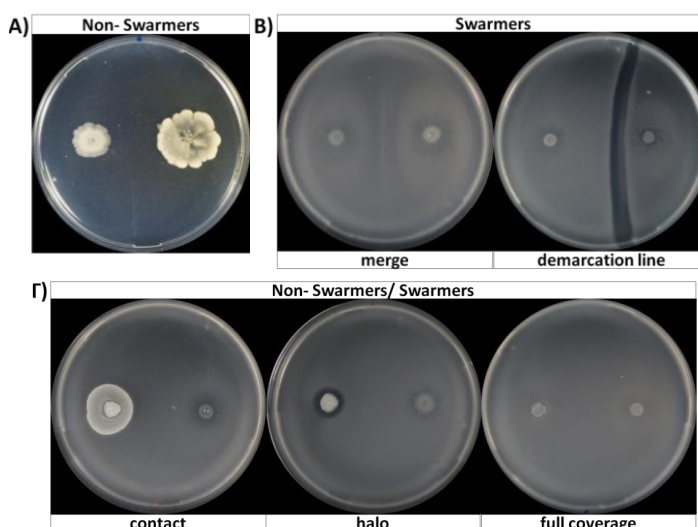
Από τη φυλογενετική ανάλυση βρέθηκε ότι τα βακτήρια του γένους *Bacillus* κατατάσσονται στα είδη *B. subtilis*, *B. velezensis*, *B. halotolerans*, *B. megaterium*, *B. cereus*, *B. viedmani* και *B. mycoides*. Η διαφοροποίηση μεταξύ των ειδών του γένους *Bacillus*, ενισχύθηκε μέσω του Kin discrimination, το οποίο στηρίζεται στη διαφοροποίηση μεταξύ των πιο απομακρυσμένων φυλογενετικά στελεχών. Η εδαφική κυριαρχία των επιφανειακά κινούμενων βακτηρίων, αποτελεί μία μέθοδο διαφοροποίησης των μη συγγενικών στελεχών μεταξύ τους (Armbruster & Mobley, 2012; Budding et al., 2009; Stefanic et al. 2015). Στην παρούσα μελέτη, όλα τα στελέχη του γένους *Bacillus* μελετήθηκαν για τη συγγένειά τους *in vitro*, με τη μέθοδο της ταυτόχρονης ομαδικής κινητικότητας των βακτηρίων (swarm boundary assay).

Σύμφωνα με τη θεωρία της διαφοροποίησης του kin discrimination για τα βακτηριακά στελέχη που είναι κοντά φυλογενετικά, κατά την ανάπτυξή τους σε στερεό θρεπτικό μέσο που ευνοεί την ομαδική κίνηση, παρατηρείται συνένωση των κινούμενων κυττάρων (merge) στο σημείο συνάντησης των μετώπων τους. Σε αντίθετη περίπτωση, τα βακτήρια που φυλογενετικά είναι πιο απομακρυσμένα, κατά τη συνάντηση των μετώπων τους, σχηματίζουν μια διαχωριστική ζώνη (demarcation line).

Με τη μέθοδο της ταυτόχρονης ομαδικής κίνησης των βακτηρίων μελετήθηκαν μόνο τα στελέχη του γένους *Bacillus* spp., τα οποία βρέθηκαν σε μεγαλύτερο ποσοστό ικανά για πραγματοποίησης ομαδικής κινητικότητας.

3.1.4.1 Μέθοδος της ταυτόχρονης ομαδικής κίνησης (swarm boundary line) των βακτηρίων του γένους *Bacillus*

Η δημιουργία διαχωριστικής ζώνης κατά την ταυτόχρονη ομαδική κίνηση των βακτηρίων μελετήθηκε σε θρεπτικό μέσο NA (0,5% (w/v) άγαρ), όπου ευνοείται η ομαδική κινητικότητα των βακτηρίων. Από το σύνολο των αλληλεπιδράσεων που πραγματοποιήθηκε μεταξύ όλων των αντιπροσωπευτικών στελεχών του κάθε είδους του γένους *Bacillus* (κατηγορία Α), προκύπτουν τρεις κατηγορίες αλληλεπιδράσεων, όπως παρουσιάζονται στην Εικόνα 3.2.



Εικόνα 3.2 Διαφοροποίηση των βακτηριακών ειδών (Kin discrimination) με τη μέθοδο της ταυτόχρονης ομαδικής κίνησης των βακτηρίων. Προέκυψαν τρεις κατηγορίες αλληλεπιδράσεων μεταξύ Α) βακτηρίων που δεν κινούνται ομαδικά (Non-Swarmers), Β) βακτηρίων που κινούνται ομαδικά (Swarms) και Γ) βακτηρίων που κινούνται και δεν κινούνται ομαδικά (Non-swarms/Swarms). Σε κάθε περίπτωση αναφέρεται το αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης.

Οι τρεις κατηγορίες περιλαμβάνουν αλληλεπιδράσεις που πραγματοποιήθηκαν μεταξύ στελεχών που δεν έχουν ικανότητα ομαδικής κινητικότητας (non-swarms, NSw), αλληλεπιδράσεις μεταξύ στελεχών που πραγματοποιούν ομαδική κινητικότητα (swarms, Sw) και τέλος, αλληλεπιδράσεις μεταξύ κινούμενων και μη κινούμενων ομαδικά στελεχών (swarms/ non-swarms, Sw/NSw). Τα βακτήρια της κατηγορίας NS κινούνται ως ένα σημείο δημιουργώντας ένα κενό (gap) μεταξύ τους (Εικ. 3.2Α), σε αντίθεση με τα βακτήρια της κατηγορίας Sw, τα οποία κατά τη συνάντηση των μετώπων τους, είτε συνενώνονται (merge, m), είτε σχηματίζουν διαχωριστική ζώνη (demarcation line, dl) μεταξύ τους (Εικ. 3.2Β). Στην τελευταία κατηγορία (Sw/NSw), τα βακτηριακά στελέχη είτε έρχονται σε επαφή στο σημείο συνάντησης των κυττάρων (contact, c), είτε σχηματίζεται ευκρινής άλως περιορισμού (halo, h) γύρω από το μη κινούμενο ομαδικά στέλεχος, είτε τα κινούμενα στελέχη καλύπτουν πλήρως τα μη κινούμενα ομαδικά (full coverage, fc) (Εικ. 3.2Γ). Στον παρακάτω πίνακα (Πίν. 3.4) παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των αλληλεπιδράσεων μεταξύ όλων των επιλεγμένων αντιπροσωπευτικών στελεχών κάθε είδους.

Πίνακας 3.4 Αλληλεπιδράσεις όλων των βακτηριακών στελεχών του γένους *Bacillus*, σε συνθήκες που ευνοείται η ομαδική κινητικότητα των βακτηρίων. Οι αλληλεπιδράσεις πραγματοποιήθηκαν μεταξύ όλων των βακτηριακών στελεχών είτε κινούνται ομαδικά (Sw), είτε όχι (NSw). Εντός του κάθε πλαισίου αναγράφεται το αποτέλεσμα κάθε αλληλεπίδρασης μεταξύ των ειδών (-: gap, m: merge, dl: demarcation line, h: halo, c: contact, fc: full coverage).

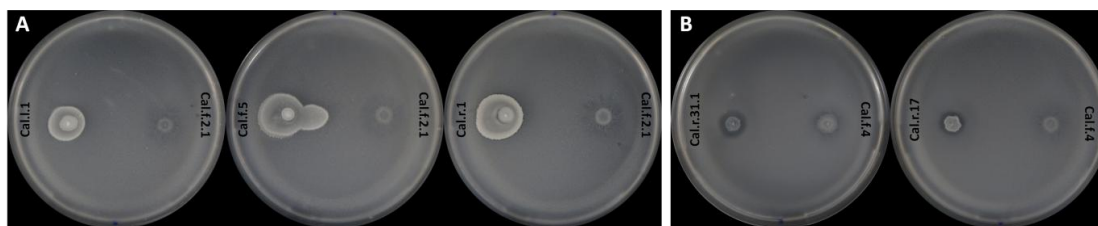
Swarm boundary line		<i>B. amyloliquefaciens</i> <i>B. velezensis</i>	<i>B. mycoides</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>B. wiedmannii</i> <i>B. proteolyticus</i>	<i>B. cereus</i> <i>B. paramycoides</i>	<i>B. megaterium</i> <i>B. aryabhattai</i>	<i>B. halotolerans</i>
		-A1-Sw	-A2-NSw	-A3-Sw	-A4-NSw	-A5-NSw	-A6-NSw	-A7-Sw
<i>B. amyloliquefaciens</i> <i>B. velezensis</i>	-A1-Sw	m						
<i>B. mycoides</i>	-A2-NSw	fc	-					
<i>B. subtilis</i>	-A3-Sw	dl	fc	m				
<i>B. wiedmannii</i> <i>B. proteolyticus</i>	-A4-NSw	c	-	h	-			
<i>B. cereus</i> <i>B. paramycoides</i>	-A5-NSw	h	-	h	-	-		
<i>B. megaterium</i> <i>B. aryabhattai</i>	-A6-NSw	c	-	h	-	-	-	
<i>B. halotolerans</i>	-A7-Sw	dl	h	dl	c/h	h	c/h	m/dl

Τα βακτηριακά στελέχη που ανήκουν στα είδη *B. mycoides* (A2), *B. wiedmannii*/*B. proteolyticus* (A4), *B. cereus* (A5) και *B. megaterium* (A6) δεν έχουν την ικανότητα πραγματοποίησης ομαδικής κίνησης. Κατά την αλληλεπίδρασή μη κινούμενων στελεχών της ίδιας κατηγορίας μεταξύ τους καθώς και με αντίστοιχα μη κινούμενα στελέχη άλλης κατηγορίας, σχηματίζεται ένα κενό μεταξύ των βακτηρίων (A2, A4, A5, A6: «-»).

Η αλληλεπίδραση μεταξύ των βακτηριακών στελεχών που δεν έχουν την ικανότητα πραγματοποίησης ομαδικής κινητικότητας (NSw) και στελεχών που κινούνται ομαδικά (Sw), είχε ως αποτέλεσμα είτε την επαφή των δύο στελεχών (A1-A4, A1-A6, A4-A7, A6-A7: «c»), είτε το σχηματισμό διαχωριστικής άλω γύρω από το μη κινούμενο ομαδικά στέλεχος (A1-A5, A3-A4, A3-A5, A3-A6, A7-A5, A2-A7: «h»), είτε την πλήρη κάλυψη του μη κινούμενου στελέχους από το κινούμενο στέλεχος (A1-A2, A2-A3: «fc»).

Τέλος, όσον αφορά τα βακτηριακά στελέχη που αλληλεπιδράσαν μεταξύ τους και έχουν την ικανότητα ομαδικής κίνησης (Sw), είτε συνενώθηκαν τα μέτωπά τους (A1-A1, A3-A3, A7-A7: «m»), είτε σχημάτισαν διαχωριστική ζώνη (A1-A3, A1-A7, A3-A7, A7-A7: «dl»).

Ο διαχωρισμός των ειδών με βάση την ταυτόχρονη ομαδική κινητικότητα των στελεχών τους μπορεί να ληφθεί υπόψη μόνο για τις κατηγορίες A1, A3 και A7 των οποίων τα στελέχη κινούνται ομαδικά. Ωστόσο, αξίζει να σημειωθεί ότι στις υποκατηγορίες μη κινούμενων βακτηρίων, όλα τα στελέχη ανά είδος βακτηρίου παρουσίασαν σταθερό φαινότυπο κατά την αλληλεπίδρασή τους με κινούμενα στελέχη άλλου είδους (Εικ. 3.3).



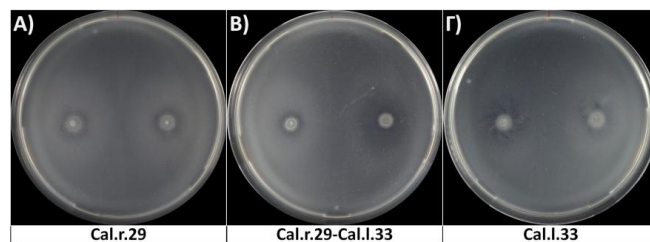
Εικόνα 3.3 Αλληλεπίδραση μεταξύ στελεχών διαφορετικών ειδών που πραγματοποιούν και δεν πραγματοποιούν ομαδική κινητικότητα. Α) Συνένωση των βακτηριακών στελεχών Cal.l.1, Cal.f.5 και Cal.r.1 του είδους *B. wiedmannii*/*B. proteolyticus* (αριστερά) κατά την αλληλεπίδρασή τους με το αντιπροσωπευτικό στέλεχος Cal.f.2.1 του είδους *B. halotolerans* (δεξιά). Β) Δημιουργία διάφανης halo γύρω από τα μη κινούμενα ομαδικά στελέχη Cal.r.31.1 και Cal.r.17 του είδους *B. mycoides*, κατά την αλληλεπίδρασή του με το αντιπροσωπευτικό στέλεχος Cal.f.4 του είδους *B. halotolerans*.

Συγκεκριμένα, όπως παρατηρείται και στην Εικόνα 3.4Α, τα βακτηριακά στελέχη του είδους *B. wiedmannii*/*B. proteolyticus* (Cal.l.1, Cal.f.5 και Cal.r.1) κατά την αλληλεπίδρασή τους με το αντιπροσωπευτικό στέλεχος Cal.f.2.1 του είδους *B. halotolerans*, εμφάνισαν τον ίδιο φαινότυπο. Τα τρία στελέχη στο σημείο συνάντησης των κυττάρων τους με το στέλεχος Cal.f.2.1, συνενώθηκαν χωρίς την εμφάνιση διαχωριστικής άλω. Η σταθερότητα του φαινοτύπου παρατηρήθηκε και κατά την αλληλεπίδραση των στελεχών Cal.r.31.1 και Cal.r.17 του είδους *B. mycoides* με το βακτήριο *B. halotolerans* Cal.f.4. Το κινούμενο ομαδικά στέλεχος Cal.f.4, περικύκλωσε τα μη κινούμενα ομαδικά στελέχη Cal.r.31.1 και Cal.r.17, με αποτέλεσμα το σχηματισμό διαχωριστικής άλω γύρω τους.

3.1.4.1.1 Αλληλεπίδραση των ομαδικά κινούμενων στελεχών (Sw) με τη μέθοδο της ταυτόχρονης ομαδικής κίνησης

3.1.4.1.1.1 Βακτηριακά στελέχη του είδους *B. velezensis* και *B. subtilis*

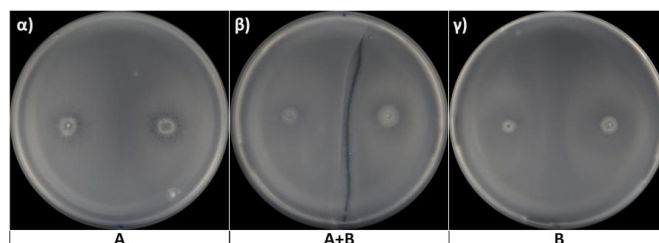
Τα βακτηριακά στελέχη που ανήκουν στα είδη *B. velezensis* (A1) και *B. subtilis* (A3) βρέθηκαν θετικά στην ικανότητα πραγματοποίησης ομαδικής κινητικότητας. Η συνένωση των κυτταρικών μετώπων κατά την ταυτόχρονη ομαδική κίνηση των στελεχών ανά είδος, παρατηρήθηκε και στα δύο μελετώμενα είδη. Τόσο τα στελέχη του είδους *B. velezensis*, όσο και του *B. subtilis* επιβεβαιώνουν την αρχή της μεθόδου που στηρίζει πως τα στελέχη που ανήκουν στο ίδιο είδος συνενώνονται κατά την ταυτόχρονη ομαδική κίνησή τους στο ίδιο θρεπτικό μέσο. Όπως παρατηρείται και στην Εικόνα 3.4, τα βακτήρια του είδους *B. velezensis* συνενώνουν τα μέτωπα τους τόσο κατά την εφαρμογή των διαφορετικών στελεχών του ίδιου είδους μεταξύ τους όσο και κατά την εφαρμογή του ενός στελέχους με τον εαυτό του.



Εικόνα 3.4 Αλληλεπίδραση μεταξύ των στελεχών του είδους *B. amyloliquefaciens*/ *B. velezensis*. Α) Αλληλεπίδραση του στελέχους Cal.r.29 με τον εαυτό του, Β) αλληλεπίδραση του στελέχους Cal.r.29 με το στέλεχος Cal.l.33 (merge) και Γ) αλληλεπίδραση του στελέχους Cal.l.33 με τον εαυτό του.

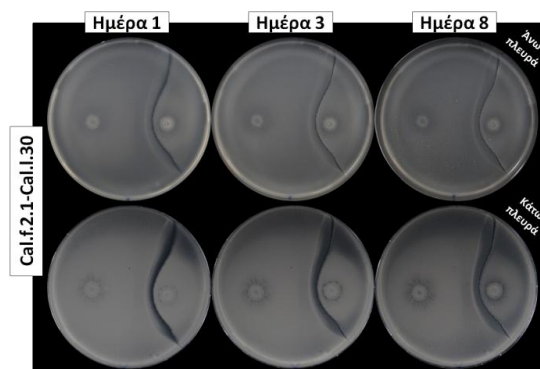
3.1.4.1.2 Βακτήρια του είδους *B. halotolerans*

Κατά την αλληλεπίδραση των στελεχών του είδους *B. halotolerans*, παρατηρήθηκαν διαφορετικά από τα αναμενόμενα αποτελέσματα. Τα στελέχη που περιλαμβάνονται στην κατηγορία, παρ' όλο που φυλογενετικά βρέθηκαν να ανήκουν στο είδος *B. halotolerans*, κατά την ταυτόχρονη ομαδική κινητικότητα δεν συνενώθηκαν όλα τα στελέχη μεταξύ τους. Συγκεκριμένα τα στελέχη χωρίστηκαν σε δύο βασικές ομάδες, την Α και Β, με την ομάδα Α να περιλαμβάνει τα στελέχη Cal.f.2.1, Cal.f.4, Cal.f.6.1, Cal.f.6.3, Cal.l.11 και Cal.l.20, ενώ η ομάδα Β περιλαμβάνει τα στελέχη Cal.l.30, Cal.r.11 και Cal.l.21. Κατά την αλληλεπίδραση των στελεχών μεταξύ των διαφορετικών ομάδων παρατηρήθηκε ο σχηματισμός διαχωριστικής ζώνης (Εικ. 3.5β), ενώ μεταξύ των στελεχών της κάθε ομάδας τα μέτωπα των βακτηρίων συνενώθηκαν (Εικ. 3.5α και Εικ. 3.5γ).



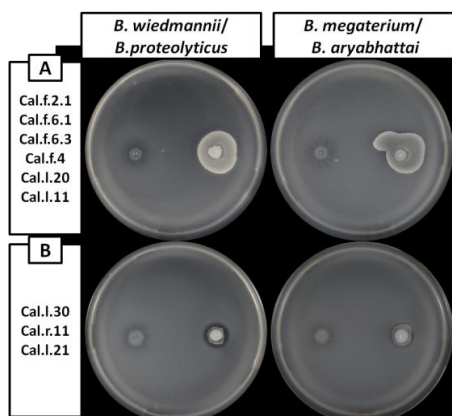
Εικόνα 3.5 Αλληλεπίδραση μεταξύ των στελεχών των ομάδων Α και Β του είδους *B. halotolerans*. Αντιπροσωπευτική φωτογραφία της αλληλεπίδρασης μεταξύ των στελεχών α) της ομάδας Α, β) της ομάδας Α με στελέχη της ομάδας Β (Α+Β) και γ) της ομάδας Β.

Η δημιουργία διαχωριστικής ζώνης μεταξύ των στελεχών της ομάδας Α και Β καταγράφηκε από την πρώτη μέρα παρατήρησης. Ωστόσο, όπως παρατηρείται και στην Εικόνα 3.6, με το πέρασμα των ημερών και φτάνοντας σε τελική παρατήρηση 8 ημερών, η ζώνη περνάει σε μια πιο ενδιάμεση κατάσταση, κατά την οποία βακτηριακά κύτταρα καλύπτουν σε μεγαλύτερο βαθμό την έκτασή της.



Εικόνα 3.6 Αλληλεπίδραση μεταξύ των στελεχών των ομάδων Α και Β του είδους *B. halotolerans*. Αντιπροσωπευτικό παράδειγμα η αλληλεπίδραση μεταξύ του στελέχους Cal.f.2.1 της ομάδας Α και του Cal.l.30 της ομάδας Β. Πραγματοποιήθηκε αποτύπωση του τρυβλίου (Ανω και κάτω πλευρά) για τις ημέρες παρατήρησης 1, 3 και 8.

Οι αλληλεπιδράσεις των στελεχών και των δύο ομάδων του είδους *B. halotolerans* με στελέχη των ειδών *B. wiedmannii*/ *B. proteolyticus* και *B. megaterium*, είχε ως αποτέλεσμα την εμφάνιση δύο διαφορετικών αποτελεσμάτων. Συγκεκριμένα τα στελέχη της ομάδας Α κατά την αλληλεπίδρασή τους με τα στελέχη και των δύο ειδών, είχε ως αποτέλεσμα την ένωση των δύο βακτηρίων ενώ, η εφαρμογή των στελεχών της ομάδας Β είχε ως αποτέλεσμα την δημιουργία διάφανης άλω γύρω από το σημείο εφαρμογής των μη κινούμενων βακτηρίων.



Εικόνα 3.7 Αλληλεπίδραση μεταξύ των στελεχών των ομάδων Α και Β του είδους *B. halotolerans*, με τα στελέχη των ειδών *B. wiedmannii*/ *B. proteolyticus* και *B. megaterium*.

Όπως παρατηρείται και στα παραδείγματα της Εικόνας 3.7, η εφαρμογή των στελεχών Cal.l.30, Cal.r.11 και Cal.l.21 της ομάδας Β μείωσε σημαντικά την εξάπλωση των στελεχών των ειδών *B. wiedmannii*/ *B. proteolyticus* και *B. megaterium* δημιουργώντας παράλληλα διαχωριστική άλω περιμετρικά αυτών. Αντιθέτως, τα στελέχη της ομάδας Α ήρθαν σε επαφή με όλα τα στελέχη των ειδών *B. wiedmannii*/ *B. proteolyticus* και *B. megaterium*, χωρίς τη δημιουργία διαχωριστικής άλω. Επομένως, τα βακτήρια της ομάδας Α παρουσίασαν πιο φιλική συμπεριφορά με τα στελέχη των ειδών *B. wiedmannii*/ *B. proteolyticus* και *B. megaterium*, σε σχέση με εκείνα της ομάδας Β.

3.1.5 Επίδραση των ενδοφυτικών βακτηρίων στην ανάπτυξη και τη μορφολογία του φυτού *A. thaliana* Col-0

Τα επιλεγμένα ενδοφυτικά βακτήρια μετά τη μοριακή ταυτοποίηση και τη μελέτη των μορφολογικών και συμπεριφοριστικών τους χαρακτηριστικών, κατηγοριοποιήθηκαν περαιτέρω με βάση την επίδρασή τους στην ανάπτυξη και τα μορφολογικά χαρακτηριστικά του φυτού *A. thaliana* Col-0, *in vitro*. Ο εμβολιασμός των βακτηρίων πραγματοποιήθηκε με δύο διαφορετικούς τρόπους, σε ενιαίο τρυβλίο για την άμεση επίδραση των βακτηρίων και των διαχειομένων ή/και των πτητικών ενώσεων τους στην ανάπτυξη των φυτών και σε τρυβλίο με κεντρικό χώρισμα για τη μελέτη των πτητικών τους ενώσεων.

Κατά την εφαρμογή των βακτηρίων σε κοινό θρεπτικό μέσο με τα φυτά, ο εμβολιασμός των βακτηρίων πραγματοποιήθηκε σε δύο διαφορετικές αποστάσεις· σε απόσταση 3 cm από το ακρορρίζιο των φυτών και επί του ακρορρίζιου. Από την εφαρμογή των βακτηρίων προέκυψαν φυτά με αυξημένο ολικό νωπό βάρος, μειωμένη ανάπτυξη της κεντρικής ρίζας, αυξημένο αριθμό πλευρικών ριζών και ριζικών τριχιδίων, αυξημένο μήκος ριζικών τριχιδίων καθώς και φυτά όπου η εφαρμογή των βακτηρίων δεν επηρέασε σημαντικά την ανάπτυξη και τα μορφολογικά τους χαρακτηριστικά. Στους παρακάτω πίνακες απεικονίζονται τα βακτηριακά στελέχη που προέκυψαν από την παραπάνω κατηγοριοποίηση και εφαρμόστηκαν στο φυτό *A. thaliana* Col-0, καθώς και αντιπροσωπευτική φωτογραφία των φυτών με τις δυο διαφορετικές εφαρμογές των βακτηρίων κάθε κατηγορίας. Στους πίνακες 3 και 5 παρουσιάζεται η μακροσκοπική απεικόνιση των φυτών, ενώ στις εικόνες 4 και 6 η στερεοσκοπική απεικόνιση της κεντρικής τους ρίζας.

3.1.5.1 Βακτήρια του γένους *Bacillus*

3.1.5.1.1 Μακροσκοπική παρατήρηση φυτών *A. thaliana* Col-0

Όπως παρατηρείται στον Πίνακα 3.5, από την εφαρμογή των βακτηρίων σε απόσταση 3 cm από το ακρορρίζιο των φυτών προκύπτουν τρεις βασικές κατηγορίες μορφοτύπων· φυτά με μακριά κεντρική ρίζα και μειωμένο αριθμό πλευρικών ριζών (A2, A4 και A5), φυτά με μακριά κεντρική ρίζα ως το σημείο εμβολιασμού των βακτηρίων και αυξημένο αριθμό πλευρικών ριζών (A1, A3 και A7) και φυτά με κοντή κεντρική ρίζα και αυξημένο αριθμό πλευρικών ριζών (A6). Από την εφαρμογή των βακτηρίων στο ακρορρίζιο των φυτών *A. thaliana* προκύπτουν επίσης τρεις βασικές κατηγορίες μορφοτύπων· φυτά με μικρή κεντρική ρίζα που δεν ξεπερνάει το σημείο εμβολιασμού του βακτηρίου και έχουν μικρό αριθμό πλευρικών ριζών (A1, A7 και A6), φυτά με μακριά κεντρική ρίζα και αυξημένο αριθμό πλευρικών ριζών (A2 και A3) και τέλος φυτά με μακριά κεντρική ρίζα και μικρό αριθμό πλευρικών ριζών (A4 και A5).

Πίνακας 3.5 Εφαρμογή ενδοφυτικών βακτηρίων του γένους *Bacillus* σε απόσταση 3 cm από το ακρορρίζιο και στο ακρορρίζιο του φυτού *A. thaliana* *in vitro*.

	Βακτηριακά Στελέχη	At distance	On root tip
A1 (<i>B. velezensis</i>)	Cal.r.29, Cal.l.33		
A2 (<i>B. mycoides</i>)	Cal.r.31.1, Cal.r.17		
A3 (<i>B. subtilis</i>)	Cal.r.19, Cal.r.22		
A4 (<i>B. wiedmannii</i> / <i>B. proteolyticus</i>)	Cal.f.5, Cal.r.1, Cal.l.1, Cal.f.1		
A5 (<i>B. cereus</i>)	Cal.r.27, Cal.r.7		
A6 (<i>B. megaterium</i>)	Cal.r.33, Cal.r.28, Cal.f.2		
A7 (<i>B. halotolerans</i>)	Cal.f.4, Cal.l.11, Cal.f.6.3, Cal.f.2.1, Cal.l.20, Cal.l.30, Cal.r.11, Cal.f.6.1, Cal.l.21		

Για κάθε κατηγορία βακτηρίων που προέκυψε μελετήθηκε η επίδρασή των στελεχών της στα μορφολογικά χαρακτηριστικά του φυτού *A. thaliana*. Πραγματοποιήθηκε σύγκριση των μέσων όρων του νωπού βάρους, του μήκους της κεντρικής ρίζας και του αριθμού των πλευρικών ριζών και με τους δύο τρόπους εφαρμογής των βακτηρίων εντός της κάθε κατηγορίας.

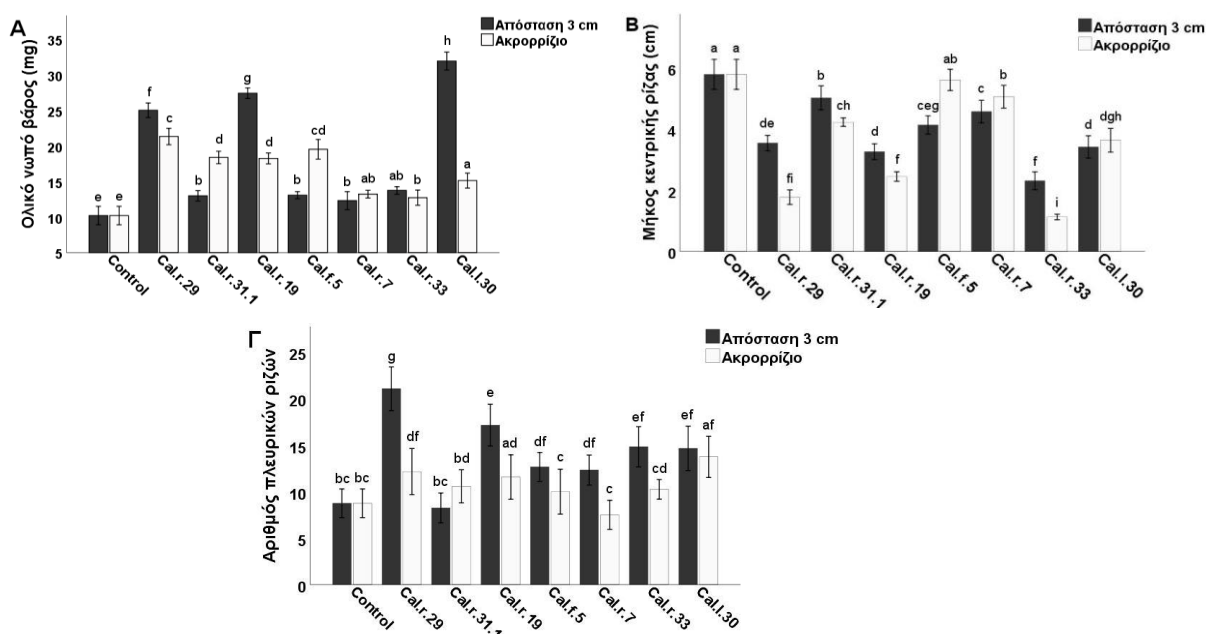
Πίνακας 3.6 Επίδραση των ενδοφυτικών βακτηρίων της κάθε κατηγορίας στα μορφολογικά χαρακτηριστικά του φυτού *A. thaliana* Col-0. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο των μετρήσεων και τις τυπικές αποκλίσεις των τιμών. Τα διαφορετικά γράμματα υποδεικνύουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές ($p < 0.05$) μεταξύ των τιμών ανά κατηγορία βακτηρίων, μετά από την πραγματοποίηση Tukey's test.

Κατηγορίες βακτηρίων	Στελέχη	Νωπό βάρος (mg)	Μήκος κεντρικής ρίζας (cm)	Αριθμός πλευρικών ριζών (N)
A1	Μάρτυρας	10,20 ± 1,29 ^a	5,80 ± 0,49 ^a	8,75 ± 1,55 ^a
	Cal.r.29	25,00 ± 1,02 ^b	3,55 ± 0,25 ^b	21,08 ± 2,35 ^b
	Cal.r.33	19,63 ± 1,19 ^c	4,62 ± 0,26 ^c	12,83 ± 2,52 ^c
A2	Μάρτυρας	10,20 ± 1,29 ^a	5,80 ± 0,49 ^a	8,75 ± 1,55 ^a
	Cal.r.31.1	12,98 ± 0,73 ^b	5,03 ± 0,39 ^b	8,67 ± 1,61 ^a
	Cal.r.17	11,38 ± 0,82 ^a	5,15 ± 0,32 ^b	8,83 ± 1,53 ^a
A3	Μάρτυρας	10,20 ± 1,29 ^a	5,80 ± 0,49 ^a	8,75 ± 1,55 ^a
	Cal.r.19	27,40 ± 0,76 ^b	3,31 ± 0,22 ^b	18,50 ± 2,47 ^b
	Cal.r.22	22,60 ± 1,09 ^c	3,67 ± 0,23 ^c	13,42 ± 1,73 ^c
A4	Μάρτυρας	10,20 ± 1,29 ^a	5,80 ± 0,49 ^a	8,75 ± 1,55 ^a
	Cal.r.1	12,30 ± 1,27 ^b	4,71 ± 0,27 ^b	11,58 ± 1,51 ^{bc}
	Cal.f.1	12,33 ± 0,52 ^b	4,90 ± 0,20 ^b	10,83 ± 1,53 ^b
	Cal.f.5	13,40 ± 0,68 ^b	4,23 ± 0,37 ^c	12,92 ± 1,73 ^c
A5	Μάρτυρας	10,20 ± 1,29 ^a	5,80 ± 0,49 ^a	8,75 ± 1,55 ^a
	Cal.r.27	11,167 ± 0,73 ^{ab}	5,45 ± 0,34 ^a	9,75 ± 0,96 ^{ab}
	Cal.r.7	12,63 ± 1,66 ^b	4,91 ± 0,59 ^b	12,33 ± 1,61 ^b
	Cal.f.2	10,75 ± 0,68 ^a	2,16 ± 0,26 ^b	11,58 ± 1,44 ^b
A6	Μάρτυρας	10,20 ± 1,29 ^a	5,80 ± 0,49 ^a	8,75 ± 1,55 ^a
	Cal.r.28	10,42 ± 0,82 ^a	2,15 ± 0,36 ^b	12,83 ± 1,40 ^b
	Cal.r.33	13,73 ± 0,54 ^b	2,31 ± 0,29 ^b	14,83 ± 2,17 ^c
	Cal.f.2	10,75 ± 0,68 ^a	2,16 ± 0,26 ^b	11,58 ± 1,44 ^b
A7	Μάρτυρας	10,20 ± 1,29 ^a	5,80 ± 0,49 ^a	8,75 ± 1,55 ^c
	Cal.l.30	31,92 ± 1,27 ^{bd}	3,34 ± 0,24 ^{bd}	17,25 ± 1,66 ^b
	Cal.f.4	27,40 ± 1,72 ^{bd}	3,27 ± 0,26 ^{bd}	17,50 ± 2,02 ^{ac}
	Cal.f.2.1	29,92 ± 4,36 ^d	3,08 ± 0,32 ^d	18,33 ± 2,10 ^a
	Cal.f.6.1	12,12 ± 1,25 ^c	4,02 ± 0,28 ^c	12,08 ± 1,73 ^d
	Cal.f.6.3	21,68 ± 3,20 ^{bd}	3,18 ± 0,43 ^{bd}	18,50 ± 2,47 ^a
	Cal.l.21	23,15 ± 1,97 ^{bd}	3,28 ± 0,31 ^{bd}	15,00 ± 1,71 ^{bc}
	Cal.l.11	30,18 ± 4,79 ^{bd}	3,19 ± 0,68 ^{bd}	15,08 ± 1,93 ^{bc}
	Cal.l.20	11,53 ± 0,81 ^c	3,99 ± 0,37 ^c	12,17 ± 1,40 ^d
A7	Cal.r.11	23,32 ± 1,89 ^{bc}	3,60 ± 0,26 ^{bc}	18,33 ± 1,67 ^a

Όπως παρουσιάζεται και στον Πίνακα 3.6, τα στελέχη που επηρεάζουν σημαντικά τα παραπάνω μορφολογικά χαρακτηριστικά από κάθε κατηγορία είναι τα Cal.r.29, Cal.r.31.1, Cal.r.19, Cal.f.5 και Cal.r.7 από τις αντίστοιχες κατηγορίες A1, A2, A3, A4, A5 και A6, ενώ από την κατηγορία A7 ξεχωρίζουν τα στελέχη Cal.l.30, Cal.f.4, Cal.f.2.1, Cal.l.11, Cal.r.11, Cal.f.6.3 και Cal.l.21. Το ενδοφυτικό βακτήριο Cal.l.30 της κατηγορίας A7 παρουσιάζει τον υψηλότερο μέσο όρο νωπού βάρους καθώς και αυξημένο αριθμό πλευρικών ριζών, με αποτέλεσμα να επιλεγεί ως αντιπροσωπευτικό στέλεχος της κατηγορίας.

Τα στελέχη που ξεχωρίζουν από κάθε κατηγορία (Cal.r.29, Cal.r.31.1, Cal.r.19, Cal.f.5, Cal.r.7 και Cal.l.30) συγκρίθηκαν μεταξύ τους για την επίδρασή τους στην ανάπτυξη και τα μορφολογικά χαρακτηριστικά του φυτού *A.thaliana* Col-0 και με τους δύο τρόπους εφαρμογής. Έτσι, η επίδραση των ενδοφυτικών βακτηρίων στην ανάπτυξη του φυτού *A. thaliana* καθορίζεται από το μέσο όρων των τιμών του ολικού νωπού βάρους, του μήκους της κεντρικής ρίζας καθώς και του αριθμού των πλευρικών ριζών των φυτών.

Στα παρακάτω διαγράμματα (Διαγρ. 3.1) γίνεται η συσχέτιση των μέσων όρων του νωπού βάρους, του μήκους της κεντρικής ρίζας αλλά και του συνολικού αριθμού πλευρικών ριζών, των αντιπροσωπευτικών βακτηριακών στελεχών της κάθε κατηγορίας με τα φυτά μάρτυρες αλλά και μεταξύ τους. Η συσχέτιση των μέσων όρων πραγματοποιείται και για τους δύο τρόπους εφαρμογής των βακτηρίων στα φυτά *A. thaliana* Col-0.



Διάγραμμα 3.1 Επίδραση των ενδοφυτικών βακτηρίων του γένους *Bacillus* A) στο ολικό νωπό βάρος B) στο μήκος της κεντρικής ρίζας και Γ) στον αριθμό πλευρικών ριζών των φυτών *A. thaliana* Col-0. Η *in vitro* εφαρμογή των βακτηρίων πραγματοποιήθηκε σε απόσταση 3 cm από το ακρορρίζιο (μαύρο χρώμα) και πάνω στο ακρορρίζιο (λευκό χρώμα). Οι ράβδοι αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο των μετρήσεων των φυτών και τις τυπικές αποκλίσεις των τιμών ($n=12$). Τα διαφορετικά γράμματα υποδεικνύουν στατιστικές σημαντικές διαφορές ($p < 0.05$) μεταξύ όλων των δειγμάτων μετά από την πραγματοποίηση Tukey's test.

Το ολικό νωπό βάρος των φυτών *A. thaliana* στα οποία εφαρμόστηκαν τα στελέχη και με τους δύο τρόπους, είναι σημαντικά μεγαλύτερο σε σχέση με τα βάρη των φυτών του μάρτυρα. Ο εμβολιασμός των βακτηρίων Cal.r.29, Cal.l.30 και Cal.r.19 τόσο σε απόσταση όσο και στο ακρορρίζιο των φυτών επηρεάζει το φυτό θετικά, δίνοντας τις υψηλότερες τιμές σε νωπό βάρος σε σύγκριση με τις υπόλοιπες μεταχειρίσεις βακτηρίων αλλά και τα φυτά του μάρτυρα. Αξιοσημείωτη είναι η επίδραση των στελεχών Cal.f.5 και Cal.r.31.1, όπου η εφαρμογή του στο ακρορρίζιο αυξάνει σημαντικά το νωπό του βάρος του φυτού σε σχέση με

την εφαρμογή του σε απόσταση, ενώ και στις δύο περιπτώσεις το νωπό βάρος των φυτών είναι μεγαλύτερο από εκείνο των φυτών του μάρτυρα.

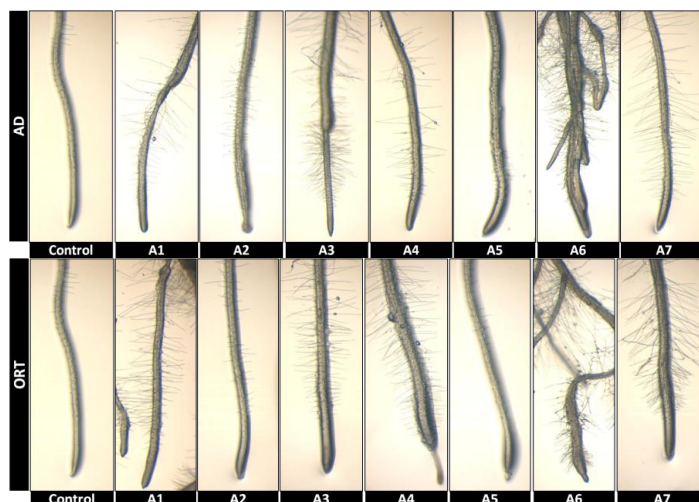
Όπως παρατηρείται και στο Διάγραμμα 3.1, τα βακτηριακά στελέχη Cal.f.5 Cal.r.7 και Cal.r.31.1 εμφανίζουν το μεγαλύτερο μήκος κεντρικής ρίζας σε σχέση με τα υπόλοιπα στελέχη ανεξάρτητα του τρόπου εφαρμογής των βακτηρίων στα φυτά. Τα στελέχη Cal.r.29, Cal.r.33 και Cal.r.19 έχουν το μικρότερο μήκος κεντρικής ρίζας σε σύγκριση με τις υπόλοιπες εφαρμογές βακτηρίων αλλά και με τα φυτά του μάρτυρα. Αξιοσημείωτο είναι ότι και στις τρεις περιπτώσεις το μέσο μήκος της κεντρικής ρίζας των φυτών είναι σημαντικά μικρότερο κατά την εφαρμογή των βακτηρίων στο ακρορρίζιο των φυτών. Τέλος, το βακτηριακό στέλεχος Cal.l.30 δεν παρουσιάζει στατιστικώς σημαντικές διαφορές στο μήκος της κεντρικής ρίζας των φυτών *A. thaliana* μεταξύ των δυο εφαρμογών του, εμφανίζοντας ωστόσο σημαντικά μικρότερο μήκος σε σχέση με τα φυτά του μάρτυρα.

Όπως παρατηρείται και στο Διάγραμμα 3.1 τα βακτηριακά στελέχη Cal.f.5, Cal.r.7 και Cal.r.33 που εφαρμόζονται στο ακρορρίζιο των φυτών *A. thaliana* καθώς και οι δύο εφαρμογές του στελέχους Cal.r.31.1, δεν επηρεάζουν σημαντικά τον αριθμό των πλευρικών ριζών του φυτού. Ωστόσο, από την εφαρμογή των βακτηριακών στελεχών Cal.f.5, Cal.r.7., Cal.r.33, Cal.r.29 και Cal.r.19 σε απόσταση 3 cm από το ακρορρίζιο, παρουσιάζεται σημαντική αύξηση του αριθμού των πλευρικών ριζών των φυτών συγκριτικά με την εφαρμογή τους στο ακρορρίζιο των φυτών. Τέλος, το βακτηριακό στέλεχος Cal.l.30 αυξάνει σημαντικά τον αριθμό των πλευρικών ριζών σε σχέση με τα φυτά του μάρτυρα, ανεξάρτητα του τρόπου εφαρμογής του.

3.1.5.1.2 Στερεοσκοπική παρατήρηση του ακρορριζίου των φυτών *A. thaliana* Col-0

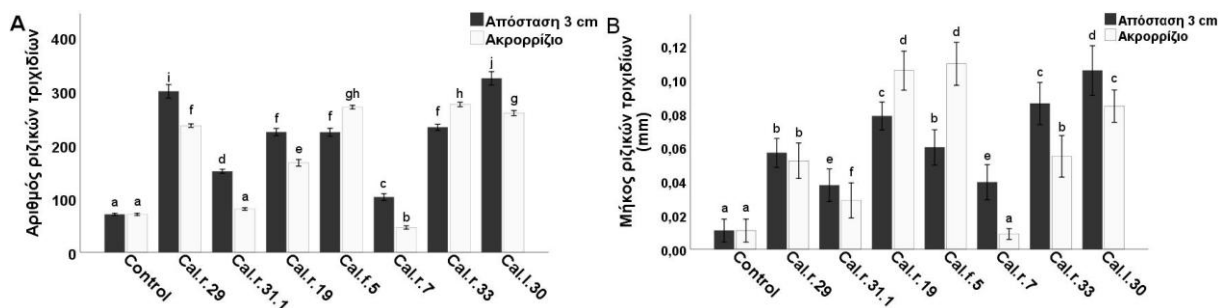
Στην Εικόνα 3.8 παρουσιάζεται η στερεοσκοπική απεικόνιση του ακρορριζίου των φυτών *A. thaliana* μετά την *in vitro* εφαρμογή των επιλεγμένων βακτηριακών στελεχών του γένους *Bacillus* σε απόσταση 3 cm και επί το ακρορριζίου των φυτών, αντίστοιχα.

Τόσο ο αριθμός όσο και το μήκος των ριζικών τριχιδίων επηρεάζεται διαφορετικά από κάθε στέλεχος, σε σχέση με τα φυτά του μάρτυρα. Φαινοτυπικά προκύπτουν δύο βασικές κατηγορίες, ανεξάρτητα από τον τρόπο εφαρμογής των βακτηρίων. Εμφανίζονται φυτά με μειωμένο αριθμό και μικρό μήκος ριζικών τριχιδίων (A2 και A5) και φυτά με αυξημένο αριθμό και μήκος ριζικών τριχιδίων (A1, A3, A4, A6 και A7).



Εικόνα 3.8 Στερεοσκοπική παρατήρηση της μορφολογίας του ακρορριζίου μετά την εφαρμογή των ενδοφυτικών βακτηρίων του γένους *Bacillus* σε *A. thaliana* Col-0. Ο εμβολιασμός των βακτηρίων πραγματοποιήθηκε Α) σε απόσταση 3 cm από το ακρορρίζιο (AD) και Β) στο ακρορρίζιο των φυτών (ORT).

Στα παρακάτω διαγράμματα (Διαγρ. 3.2Α, 3.2Β) γίνεται σύγκριση των μέσων όρων των μελετώμενων χαρακτηριστικών μεταξύ των διαφορετικών βακτηριακών στελεχών και των φυτών του μάρτυρα, για τους δύο τρόπους εφαρμογής των βακτηρίων. Από τη στερεοσκοπική παρατήρηση του ακρορριζίου των φυτών, φαίνεται η διαφορετική επίδραση των βακτηριακών στελεχών στον αριθμό αλλά και το μήκος των ριζικών τριχιδίων.



Διάγραμμα 3.2 Επίδραση των ενδοφυτικών βακτηρίων του γένους *Bacillus* Α) στον αριθμό και Β) στο μήκος των ριζικών τριχιδίων 1 cm από το ακρορρίζιο των φυταρίων *A. thaliana* Col-0. Η *in vitro* εφαρμογή των βακτηρίων πραγματοποιήθηκε σε απόσταση 3 cm από το ακρορρίζιο (σκούρο γκρι) και πάνω στο ακρορρίζιο (ανοιχτό γκρι). Οι ράβδοι αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο των μετρήσεων και τις τυπικές αποκλίσεις των τιμών ($n=12$). Τα διαφορετικά γράμματα υποδεικνύουν στατιστικές σημαντικές διαφορές ($p < 0.05$) μεταξύ όλων των δειγμάτων μετά από την πραγματοποίηση Tukey's test.

Τα βακτηριακά στελέχη Cal.r.29, Cal.l.30, Cal.r.19, Cal.f.5 και Cal.r.33 ξεχωρίζουν για την επίδραση τους στην αύξηση του αριθμού των ριζικών τριχιδίων, σε σχέση με τα φυτά του μάρτυρα, με τα στελέχη Cal.r.29, Cal.l.30, και Cal.r.19 να εμφανίζουν σημαντικά μεγαλύτερο αριθμό ριζικών τριχιδίων κατά την εφαρμογή τους σε απόσταση από το ακρορρίζιο των φυτών. Αντίθετο αποτέλεσμα παρουσιάζουν τα φυτά που εμβολιάστηκαν με τα βακτηριακά στελέχη Cal.f.5 και Cal.r.33. Τα στελέχη που ξεχωρίζουν λιγότερο για την αυξητική επίδραση τους στον αριθμό των ριζικών τριχιδίων είναι τα στελέχη Cal.r.7 και Cal.r.31.1. Το μήκος των

ριζικών τριχιδίων όλων των φυτών αυξάνεται σημαντικά μετά την εφαρμογή βακτηρίων είτε σε απόσταση από αυτά είτε επί του ακρορρίζιου, με εξαίρεση την εφαρμογή του βακτηριακού στελεχούς Cal.r.7. Η εφαρμογή των βακτηριακών στελεχών Cal.f.5 και Cal.r.19 στο ακρορρίζιο των φυτών *A. thaliana* παρουσιάζει φυτά με σημαντικά αυξημένο το μήκος των ριζικών τριχιδίων, σε σύγκριση με την εφαρμογή τους από απόσταση. Αντίθετο αποτέλεσμα παρατηρείται από τα βακτηριακά στελέχη Cal.r.29, Cal.r.31.1, Cal.l.30, Cal.r.33 και Cal.f.1.

3.1.5.2 Βακτήρια του γένους *Pseudomonas*, *Agrobacterium*, *Stenotrophomonas* και *Pantoea*

3.1.5.2.1 Μακροσκοπική παρατήρηση φυτών *A. thaliana* Col-0

Η εφαρμογή των βακτηρίων σε απόσταση 3 cm από το ακρορρίζιο των φυτών παρουσιάζει τρεις βασικές κατηγορίες μορφοτύπων, όπως παρατηρείται και στον Πίνακα 3.6· φυτά με αυξημένο αριθμό πλευρικών ριζών και κοντή ρίζα που δεν ξεπερνά το σημείο εμβολιασμού του βακτηρίου (Γ1 και E1), φυτά με αυξημένο αριθμό πλευρικών ριζών και με μεσαίου μεγέθους κεντρική ρίζα (B1, B2, B3 και B4) και τέλος φυτά με μειωμένο αριθμό πλευρικών ριζών με μακριά ρίζα που διαπερνά το σημείο εμβολιασμού των βακτηρίων (Δ1). Από τον εμβολιασμό των βακτηρίων στο ακρορρίζιο των φυτών προκύπτουν επίσης τρεις κατηγορίες μορφοτύπων του φυτού *A. thaliana*· φυτά με πολύ κοντή ρίζα και μικρό αριθμό πλευρικών ριζών (Γ1 και E1), φυτά με πολύ κοντή ρίζα και αυξημένο αριθμό πλευρικών ριζών (B1, B2, B3 και B4) και φυτά με μακριά ρίζα και μικρό αριθμό πλευρικών ριζών (Δ1). Στα παρακάτω διαγράμματα γίνεται η συσχέτιση των μέσων όρων του νωπού βάρους, του μήκους της κεντρικής ρίζας αλλά και του συνολικού αριθμού πλευρικών ριζών, των αντιπροσωπευτικών βακτηριακών στελεχών της κάθε κατηγορίας με τα φυτά του μάρτυρα αλλά και μεταξύ τους. Η συσχέτιση των μέσων όρων πραγματοποιείται και για τους δύο τρόπους εφαρμογής των βακτηρίων στα φυτά *A. thaliana* Col-0.

Πίνακας 3.7 Μακροσκοπική παρατήρηση της ανάπτυξης και των μορφολογικών χαρακτηριστικών του φυτού *A. thaliana* μετά την *in vitro* εφαρμογή ενδοφυτικών βακτηρίων των γενών *Pseudomonas*, *Agrobacterium*, *Stenotrophomonas* και *Pantoea*. Ο εμβολιασμός των βακτηρίων πραγματοποιήθηκε σε απόσταση 3 cm από το ακρορρίζιο (at distance) και στο ακρορρίζιο (on root tip).

	Βακτηριακά Στελέχη	At distance	On root tip
B1 (<i>Pseudomonas</i> sp.)	Cal.r.20, Cal.r.30, Cal.r.38.1		
B2 (<i>P. kilonensis</i>)	Cal.r.21, Cal.r.37.1, Cal.r.15		
B3 (<i>P. koreensis</i>)	Cal.r.6, Cal.r.3		
B4 (<i>P. viridiflava</i>)	Cal.l.6, Cal.f.9		
Γ1 (<i>Rhizobium</i> sp./ <i>Agrobacterium</i> sp.)	Cal.r.35		
Δ1 (<i>Stenotrophomonas</i> sp.)	Cal.r.8.2		
E1 (<i>P. agglomerans</i>)	Cal.l.7a		

Για κάθε κατηγορία βακτηρίων μελετήθηκε η επίδρασή των μεμονωμένων στελεχών στα μορφολογικά χαρακτηριστικά του φυτού *A. thaliana*, προκειμένου να επιλεγθούν τα καλύτερα αντιπροσωπευτικά στελέχη κάθε κατηγορίας. Πραγματοποιήθηκε σύγκριση των μέσων όρων του νωπού βάρους, του μήκους της κεντρικής ρίζας και του αριθμού των πλευρικών ριζών κατά την εφαρμογή των βακτηρίων σε απόσταση 3cm από το ακρορρίζιο. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του Πίνακα 3.8, τα στελέχη που επηρέασαν περισσότερο σημαντικά τα παραπάνω μορφολογικά χαρακτηριστικά είναι τα στελέχη Cal.r.20, Cal.r.21, Cal.r.6, και Cal.l.6 από τις αντίστοιχες κατηγορίες B1, B2, B3, B4 και B5.

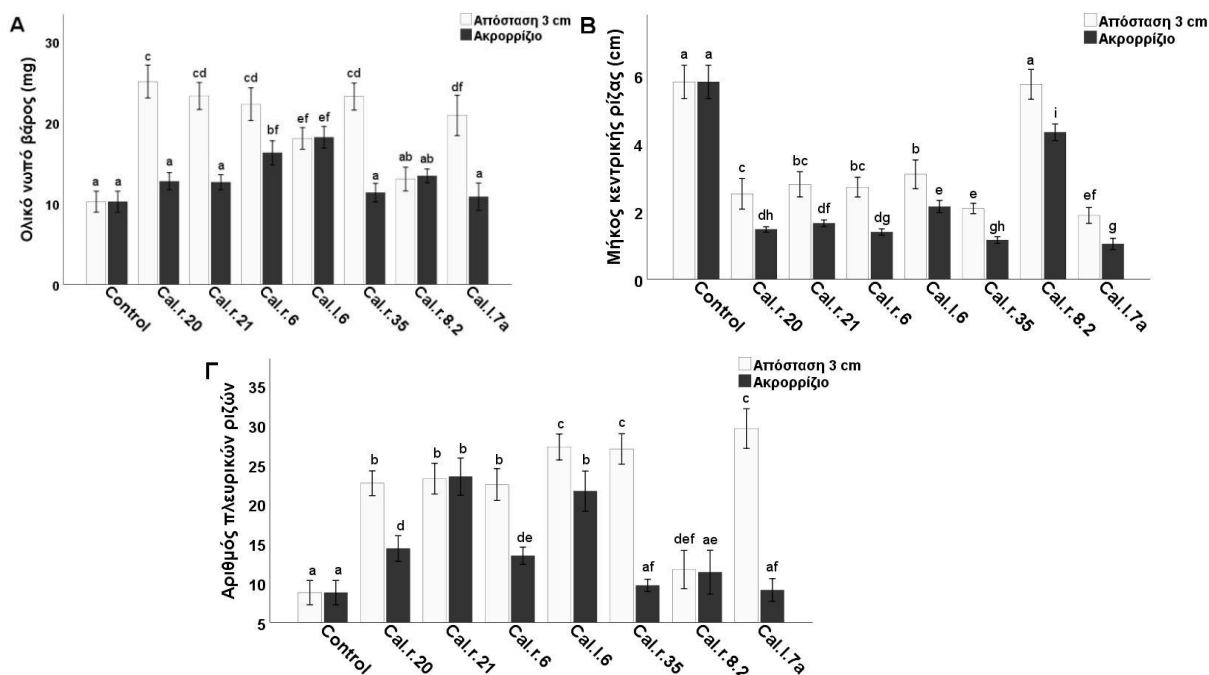
Πίνακας 3.8 Σύγκριση της επίδρασης των ενδοφυτικών βακτηρίων της κάθε κατηγορίας στα μορφολογικά χαρακτηριστικά του φυτού *A. thaliana* Col-0. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο των μετρήσεων και τις τυπικές αποκλίσεις των τιμών. Τα διαφορετικά γράμματα υποδεικνύουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές ($p < 0.05$) μεταξύ των τιμών ανά κατηγορία βακτηρίων, μετά από την πραγματοποίηση Tukey's test.

Κατηγορίες βακτηρίων	Στελέχη	Νωπό βάρος (mg)	Μήκος κεντρικής ρίζας (cm)	Αριθμός πλευρικών ριζών (N)
B1	Μάρτυρας	10,20 ± 1,29 ^a	5,80 ± 0,49 ^a	8,75 ± 1,55 ^a
	Cal.r.20	24,03 ± 3,24 ^b	2,51 ± 0,45 ^b	22,00 ± 2,57 ^b
	Cal.r.30	20,70 ± 1,21 ^{bc}	3,12 ± 0,16 ^c	17,67 ± 2,54 ^c
	Cal.r.38.1	19,52 ± 1,85 ^c	2,13 ± 0,20 ^b	15,50 ± 1,89 ^c
B2	Μάρτυρας	10,20 ± 1,29 ^a	5,80 ± 0,49 ^a	8,75 ± 1,55 ^a
	Cal.r.21	23,25 ± 1,67 ^b	2,79 ± 0,37 ^b	23,17 ± 1,95 ^b
	Cal.r.37.1	20,03 ± 1,32 ^c	2,16 ± 0,22 ^c	17,83 ± 2,29 ^c
	Cal.r.15	20,72 ± 1,50 ^c	2,07 ± 0,17 ^c	18,25 ± 2,18 ^c
B3	Μάρτυρας	10,20 ± 1,29 ^a	5,80 ± 0,49 ^a	8,75 ± 1,55 ^a
	Cal.r.6	22,25 ± 2,02 ^b	2,71 ± 0,29 ^b	22,42 ± 2,02 ^b
	Cal.r.3	20,85 ± 1,98 ^c	2,07 ± 0,17 ^c	20,17 ± 1,95 ^c
B4	Μάρτυρας	10,20 ± 1,29 ^a	5,80 ± 0,49 ^a	8,75 ± 1,55 ^a
	Cal.l.6	17,32 ± 2,82 ^b	3,08 ± 0,42 ^b	27,17 ± 1,64 ^b
	Cal.f.9	14,93 ± 1,82 ^c	2,71 ± 0,28 ^b	20,58 ± 2,31 ^c

Τα στελέχη που ξεχωρίζουν από την κάθε κατηγορία (Cal.r.20, Cal.r.21, Cal.r.6, και Cal.l.6) καθώς και τα μοναδικά στελέχη Cal.r.8.2 Cal.r.35 και Cal.l.7a συγκρίθηκαν μεταξύ τους για την επίδρασή τους στην ανάπτυξη και τα μορφολογικά χαρακτηριστικά του φυτού *A.thaliana* Col-0, μετά την εφαρμογή τους πάνω και σε απόσταση 3cm από το ακρορρίζιο των φυτών. Στα παρακάτω διαγράμματα (Διαγρ. 3.3) γίνεται σύγκριση των μέσων όρων του ολικού νωπού βάρους, του μήκους της κεντρικής ρίζας καθώς και του αριθμού των πλευρικών ριζών των φυτών μεταξύ των διαφορετικών βακτηριακών εφαρμογών και των φυτών του μάρτυρα (Control).

Από τη σύγκριση των μέσων όρων του ολικού νωπού βάρους των φυτών *A. thaliana*, προκύπτει ότι τα βακτηριακά στελέχη Cal.r.20, Cal.r.21, Cal.r.6, Cal.r.35 και Cal.l.7a που εφαρμόζονται σε απόσταση από το ακρορρίζιο, αυξάνουν σημαντικά το ολικό νωπό βάρος των φυτών σε σύγκριση με τα φυτά του μάρτυρα. Ωστόσο, το αντίθετο αποτέλεσμα παρουσιάζεται κατά την εφαρμογή τους στο ακρορρίζιο των φυτών, με εξαίρεση το

βακτηριακό στέλεχος Cal.r.6. Το βακτηριακό στέλεχος Cal.l.6 αυξάνει εξίσου σημαντικά το ολικό νωπό βάρος των φυτών ανεξάρτητα του τρόπου εφαρμογής του. Τέλος, το βακτηριακό στέλεχος Cal.r.8.2 δεν επηρεάζει σημαντικά το ολικό βάρος των φυτών, με κάποιον από τους δύο τρόπους εφαρμογής, ενώ δεν αυξάνει σημαντικά το μήκος της κεντρικής ρίζας των φυτών από την εφαρμογή του σε απόσταση.



Διάγραμμα 3.3 Επίδραση των ενδοφυτικών βακτηρίων των γενών *Pseudomonas*, *Agrobacterium*, *Stenotrophomonas* και *Pantoea* A) στο ολικό νωπό βάρος B) στο μήκος της κεντρικής ρίζας και Γ) στον αριθμό των πλευρικών ριζών των φυτών *A. thaliana* Col-0. Η *in vitro* εφαρμογή των βακτηρίων πραγματοποιήθηκε σε απόσταση 3 cm από το ακρορρίζιο (μαύρο χρώμα) και πάνω στο ακρορρίζιο (λευκό χρώμα). Οι ράβδοι αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο των μετρήσεων των φυτών και τις τυπικές αποκλίσεις των τιμών (n= 12). Τα διαφορετικά γράμματα υποδεικνύουν στατιστικές σημαντικές διαφορές ($p < 0.05$) μεταξύ όλων των δειγμάτων μετά από την πραγματοποίηση Tukey's test.

Από το Διάγραμμα 3.3B ξεχωρίζουν τα βακτηριακά στελέχη Cal.r.20, Cal.r.21, Cal.r.6, Cal.l.6, Cal.r.35 και Cal.l.7a, τα οποία μειώνουν σημαντικά το μήκος της κεντρικής ρίζας των φυτών, ενώ από την εφαρμογή των βακτηρίων στο ακρορρίζιο προκύπτουν φυτά με μικρότερο μήκος κεντρικής ρίζας. Όλα τα βακτηριακά στελέχη κατά την εφαρμογή τους σε απόσταση από το ακρορρίζιο, αυξάνουν σημαντικά το συνολικό αριθμό πλευρικών ριζών, σε σχέση με τα φυτά του μάρτυρα. Συγκεκριμένα, ξεχωρίζουν τα βακτηριακά στελέχη Cal.l.6, Cal.r.35 και Cal.l.7a τα οποία παρουσιάζουν τις υψηλότερες τιμές. Από την εφαρμογή των βακτηρίων στο ακρορρίζιο των φυτών ξεχωρίζουν τα στελέχη Cal.l.6 και Cal.r.21, παρουσιάζοντας το μεγαλύτερο αριθμό πλευρικών ριζών, σε αντίθεση με τα στελέχη Cal.r.35, Cal.r.8.2 και Cal.l.7a.

3.5.2.2 Στερεοσκοπική παρατήρηση

Στην Εικόνα 3.9 παρουσιάζεται η στερεοσκοπική απεικόνιση του ακρορρίζιου των φυτών *A. thaliana* μετά την *in vitro* εφαρμογή των επιλεγμένων βακτηριακών στελεχών των γενών *Pseudomonas*, *Agrobacterium*, *Stenotrophomonas* και *Pantoea* σε απόσταση 3 cm από το ακρορρίζιο των φυτών αλλά και επί του ακρορρίζιου. Τόσο ο αριθμός όσο και το μήκος των ριζικών τριχιδίων επηρεάζεται διαφορετικά από κάθε στέλεχος σε σχέση με τα φυτά του μάρτυρα και του τρόπου εφαρμογής.



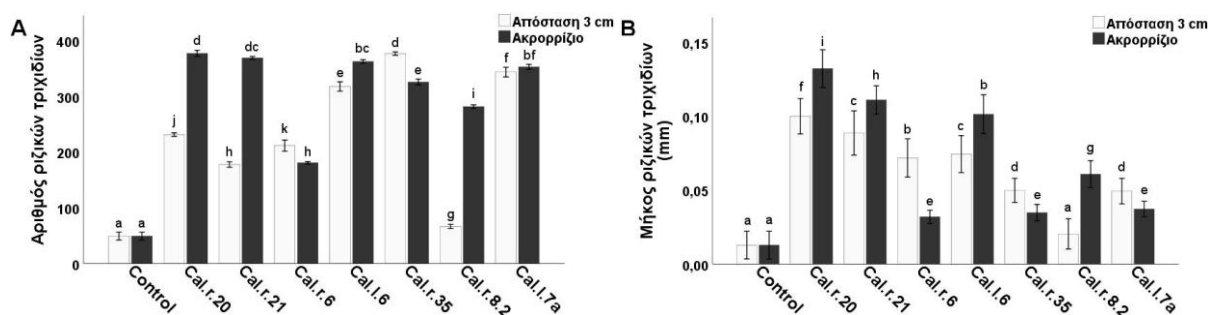
Εικόνα 3.9 Στερεοσκοπική παρατήρηση της μορφολογίας του ακρορρίζιου μετά την εφαρμογή των ενδοφυτικών βακτηρίων των γενών *Pseudomonas*, *Agrobacterium*, *Stenotrophomonas* και *Pantoea* σε *A. thaliana* Col-0. Ο εμβολιασμός των βακτηρίων πραγματοποιήθηκε Α) σε απόσταση 3 cm από το ακρορρίζιο (AD) και Β) στο ακρορρίζιο των φυτών (ORT).

Από τη στερεοσκοπική παρατήρηση του ακρορρίζιου των φυτών, φαίνεται η διαφορετική επίδραση των βακτηριακών στελεχών στον αριθμό αλλά και το μήκος των ριζικών τριχιδίων. Στα παρακάτω διαγράμματα (Διαγρ. 3.4) γίνεται σύγκριση των μέσων όρων των παραπάνω χαρακτηριστικών μεταξύ των διαφορετικών βακτηριακών στελεχών και των φυτών του μάρτυρα, στους δύο τρόπους εφαρμογής των βακτηρίων.

Η εφαρμογή των βακτηρίων στα φυτά *A. thaliana* αύξησε σημαντικά το πλήθος των ριζικών τριχιδίων και με τους δύο τρόπους εφαρμογής τους. Τα βακτηριακά στελέχη που ξεχωρίζουν είναι τα Cal.l.6, Cal.r.35 και Cal.l.7a, η εφαρμογή των οποίων από απόσταση παρουσιάζει το μεγαλύτερο πλήθος ριζικών τριχιδίων. Αξιοσημείωτη είναι η επίδραση των βακτηριακών στελεχών Cal.r.20, Cal.r.21, Cal.l.6 και Cal.r.8.2, με την εφαρμογή των βακτηρίων στο ακρορρίζιο των φυτών να αυξάνει σημαντικά το πλήθος των ριζικών τριχιδίων σε σχέση με την εφαρμογή τους από απόσταση.

Τα βακτηριακά στελέχη που ξεχωρίζουν με την επίδραση τους στο μέσο μήκος των ριζικών τριχιδίων των φυτών *A. thaliana*, ήταν τα Cal.r.20, Cal.r.21 και Cal.l.6. Μάλιστα, η εφαρμογή τους στο ακρορρίζιο των φυτών, εμφανίζει σημαντικά υψηλότερα αποτελέσματα

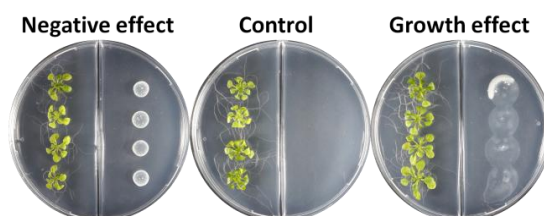
σε σχέση με τον εμβολιασμό τους σε απόσταση. Αντίθετα, η εφαρμογή των βακτηριακών στελεχών Cal.r.6, Cal.r.35 και Cal.l.7a από απόσταση αυξάνει σημαντικότερα το μέσο μήκος των ριζικών τριχιδίων. Ταυτόχρονα η εφαρμογή των παραπάνω στελεχών στο ακρορρίζιο, έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση φυτών με ίδιο μέσο μήκος ριζικών τριχιδίων. Τέλος, η εφαρμογή του στελέχους Cal.r.8.2 από απόσταση δεν επηρεάζει σημαντικά το μέσο μήκος ριζικών τριχιδίων.



Διάγραμμα 3.4 Επίδραση των ενδοφυτικών βακτηρίων των γενών *Pseudomonas*, *Agrobacterium*, *Stenotrophomonas* και *Pantoea* A) στον αριθμό και B) στο μήκος των ριζικών τριχιδίων 1 cm από το ακρορρίζιο των φυταρίων *A. thaliana* Col-0 μετά την *in vitro* εφαρμογή των βακτηρίων σε απόσταση 3 cm από το ακρορρίζιο (σκούρο γκρι) και πάνω στο ακρορρίζιο (ανοιχτό γκρι). Οι ράβδοι αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο μετρήσεων και τις τυπικές αποκλίσεις των τιμών ($n=12$). Τα διαφορετικά γράμματα υποδεικνύουν στατιστικές σημαντικές διαφορές ($p < 0.05$) μεταξύ όλων των δειγμάτων μετά από την πραγματοποίηση Tukey's test.

3.1.6 Επίδραση των παραγόμενων πτητικών ενώσεων των ενδοφυτικών βακτηρίων στην ανάπτυξη του φυτού *Arabidopsis thaliana* Col-0

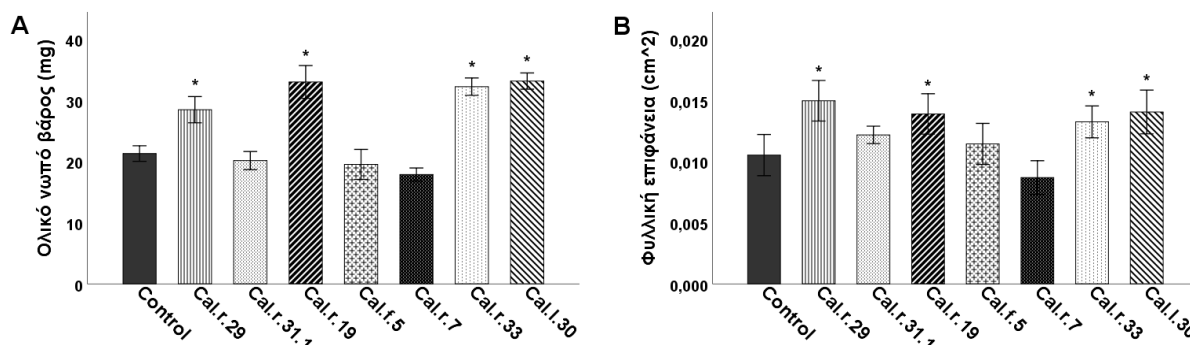
Τα επιλεγμένα βακτηριακά στελέχη μελετήθηκαν στη συνέχεια ως προς την ικανότητα παραγωγής πτητικών ενώσεων (Volatile compounds, VOCs) και την επίδρασή τους στην ανάπτυξη των φυτών *A. thaliana*. Τα χαρακτηριστικά που μελετήθηκαν ήταν το ολικό νωπό βάρος και η φυλλική επιφάνεια των φυτών. Στην Εικόνα 3.10 παρουσιάζονται τρία ενδεικτικά τρυβλία με φυτά χωρίς την εφαρμογή βακτηρίου (Control), φυτά που επηρεάζεται θετικά η ανάπτυξή τους από την εφαρμογή βακτηρίου (Growth effect) και φυτά που επηρεάζεται αρνητικά η ανάπτυξή τους από την εφαρμογή βακτηρίου (Negative effect).



Εικόνα 3.10 Επίδραση των παραγόμενων πτητικών ενώσεων (VOCs) στην ανάπτυξη των φυτών *A. thaliana*. Τρία αντιπροσωπευτικά τρυβλία με A) Control μεταχείριση (Μάρτυρας), B) μεταχείριση με αυξημένο νωπό βάρος και εμβαδό φυλλικής επιφάνειας και Γ) μεταχείριση με μειωμένο νωπό βάρος και εμβαδό φυλλικής επιφάνειας.

3.1.6.1 Βακτήρια του γένους *Bacillus* sp.

Τα στελέχη του γένους *Bacillus* που επηρεάζουν σημαντικά το συνολικό νωπό βάρος των φυτών *A. thaliana* είναι τα Cal.r.29, Cal.l.30, Cal.r.33 και Cal.f.4. Αντιθέτως, όπως παρατηρείται στο Διάγραμμα 3.5-A, η εφαρμογή των υπόλοιπων στελεχών δεν αυξάνουν σημαντικά το συνολικό νωπό βάρος των φυτών σε σύγκριση με τα φυτά του μάρτυρα.

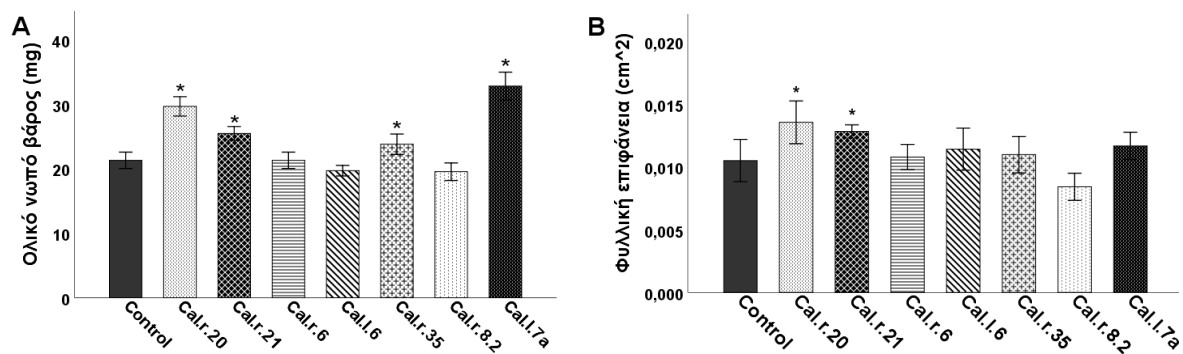


Διάγραμμα 3.5 Επίδραση των πτητικών ενώσεων των ενδοφυτικών βακτηρίων του γένους *Bacillus* Α) στο ολικό νωπό βάρος και Β) στο εμβαδόν φυλλικής επιφάνειας των φυτών *A. thaliana* Col-0. Οι ράβδοι αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο των μετρήσεων των φυτών με τις τυπικές αποκλίσεις των τιμών (n= 8). Ο αστερίσκος υποδεικνύει τις στατιστικώς σημαντικές διαφορές ($p < 0.05$) μεταξύ της μεταχείρισης των βακτηρίων και του μάρτυρα (Control), μετά από την πραγματοποίηση Dunnnett's τεστ.

Την ίδια στιγμή, τα στελέχη που ξεχωρίζουν για τη σημαντική αύξηση του ολικού νωπού βάρους των φυτών, αυξάνουν επίσης σημαντικά το εμβαδόν της φυλλικής επιφάνειας των φυτών *A. thaliana*. Από τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης, προκύπτει ότι τα φυτά εμφανίζουν τις πιο υψηλές τιμές σε σχέση με τα φυτά του μάρτυρα, καθώς και με εκείνα που εμβολιάζονται με τα υπόλοιπα στελέχη.

3.1.6.2 Βακτήρια του γένους *Pseudomonas*, *Agrobacterium*, *Stenotrophomonas* και *Pantoea*

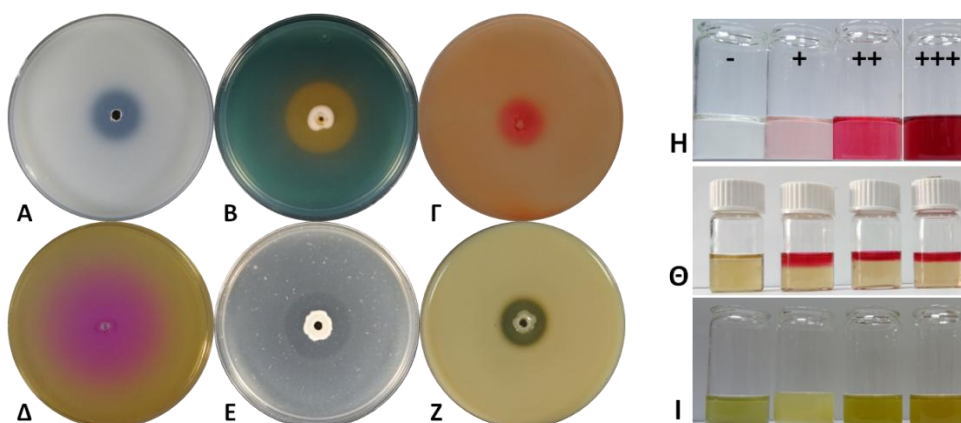
Τα βακτηριακά στελέχη Cal.r.20, Cal.r.21, Cal.r.35 και Cal.l.7a ξεχωρίζουν από τα υπόλοιπα στελέχη αυξάνοντας σημαντικά το ολικό νωπό βάρος των φυτών *A. thaliana* με την παραγωγή πτητικών ενώσεων, σε σύγκριση με τα φυτά του μάρτυρα (Διαγρ. 3.6). Όπως παρατηρείται στο Διάγραμμα 3.6, το εμβαδόν της φυλλικής επιφάνειας επηρεάζεται λιγότερο σημαντικά από τις παραγόμενες πτητικές ενώσεις των βακτηρίων. Συγκεκριμένα, τα βακτήρια που ξεχώρισαν παρουσιάζοντας αυξημένη φυλλική επιφάνεια, είναι τα στελέχη Cal.r.20 και Cal.r.21.



Διάγραμμα 3.6 Επίδραση των πτητικών ενώσεων των ενδοφυτικών βακτηρίων των γενών *Pseudomonas*, *Agrobacterium*, *Stenotrophomonas* και *Pantoea* Α) στο ολικό νωπό βάρος και Β) στο εμβαδόν φυλλικής επιφάνειας των φυτών *A. thaliana* Col-0. Οι ράβδοι αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο των μετρήσεων των φυτών με τις τυπικές αποκλίσεις των τιμών (n= 8). Ο αστερίσκος υποδεικνύει τις στατιστικές σημαντικές διαφορές ($p < 0.05$) μεταξύ της μεταχείρισης και του Μάρτυρας (Control) μετά από την πραγματοποίηση Dunnett's test.

3.1.7 Ανίχνευση των άμεσων και έμμεσων μηχανισμών που προάγουν την ανάπτυξη των φυτών

Τα 37 επιλεγμένα βακτήρια μελετήθηκαν ως προς την ικανότητά τους να επιδρούν στην ανάπτυξη των φυτών μέσω άμεσων και έμμεσων μηχανισμών. Οι άμεσοι μηχανισμοί που μελετήθηκαν ήταν η ικανότητα απορρόφησης θρεπτικών στοιχείων που βρίσκονται σε δυσδιάλυτη μορφή, όπως είναι ο συμπλοκοποιημένος φώσφορος σε ίζημα φωσφορικού ασβεστίου [$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$] και ο τρισθενής σίδηρος συμπλοκοποιημένος σε τριχλωριούχο σίδηρο (Cl_3Fe), η ικανότητα παραγωγής της αυξητικής φυτοορμόνης IAA, της ακετοΐνης και αμμωνίας, καθώς και η ικανότητα παραγωγής κυτταρολυτικών, πρωτεολυτικών και χιτινολυτικών ενζύμων. Στις παρακάτω εικόνες παρουσιάζονται τα *in vitro* βιοχημικά τεστ που πραγματοποιήθηκαν για την ανίχνευση των μηχανισμών προαγωγής της ανάπτυξης των φυτών.



Εικόνα 3.11 Άμεσοι και έμμεσοι μηχανισμοί που προάγουν την ανάπτυξη των φυτών (PGP). Α) Διαλυτοποίηση φωσφόρου (PVK), Β) Παραγωγή σιδηροφόρων ενώσεων (CAS), Γ) Παραγωγή κυτταρινολυτικών ενζύμων, Δ) Παραγωγή ουρεάσης, Ε) Παραγωγή χιτινολυτικών ενζύμων, Ζ) Παραγωγή πρωτεολυτικών ενζύμων, Η) Παραγωγή IAA, Θ) Παραγωγή ακετοΐνης και Ι) Παραγωγή αμμωνίας.

Η εμφάνιση διάφανης ή μεταχρωματισμένης άλω γύρω από το σημείο εμβολιασμού των βακτηρίων στα στερεά θρεπτικά μέσα ανάπτυξης (Εικ. 3.11Α-Z) καθώς και ο μεταχρωματισμός των υγρών θρεπτικών μέσων (3.14Η-I), υποδεικνύουν θετικό αποτέλεσμα σε καθένα από τα παραπάνω βιοχημικά τεστ που μελετήθηκαν. Στον παρακάτω πίνακα (Πίν. 3.9) παρουσιάζεται με συν (+) και πλην (-), το θετικό και αρνητικό αποτέλεσμα αντίστοιχα των *in vitro* βιοχημικών τεστ που πραγματοποιήθηκαν στα 37 μελετώμενα βακτηριακά στελέχη.

Πίνακας 3.9 Άμεσοι και έμμεσοι μηχανισμοί που προάγουν την ανάπτυξη των φυτών (PGPR- traits).

Βακτηριακό στελέχη	Διαλυτοποίηση φωσφόρου	Παραγωγή σιδηροφόρων	Παραγωγή κυτταρινάσης	Παραγωγή ουρεάσης	Παραγωγή χιτινάσης	Παραγωγή πρωτεάσης	Παραγωγή ΙΑΑ	Παραγωγή αμμωνίας	Παραγωγή ακετοΐνης
Cal.r.29	+	+	+	-	-	+	++	-	+
Cal.l.33	+	+	+	-	-	+	++	-	+
Cal.r.31.1	-	+	+	+	-	+	+	-	+
Cal.r.17	-	+	+	+	-	+	+	-	+
Cal.r.19	+	-	+	+	-	+	++	-	+
Cal.r.22	+	-	+	+	-	+	++	-	+
Cal.f.5	-	-	+	-	-	+	+	-	+
Cal.r.1	-	-	+	-	-	+	+	-	+
Cal.l.1	+	-	+	+	-	+	+	-	+
Cal.f.1	+	-	+	-	-	+	-	-	+
Cal.r.7	-	-	+	-	-	+	+	-	+
Cal.r.27	+	-	+	-	-	+	-	-	+
Cal.r.33	-	+	+	+	-	+	++	-	+
Cal.r.28	-	-	+	+	-	+	++	-	+
Cal.f.2	+	+	+	+	-	+	++	-	+
Cal.r.11	+	+	+	-	-	+	++	-	+
Cal.l.11	+	+	+	-	-	+	++	-	+
Cal.l.21	+	-	+	+	-	+	++	-	+
Cal.l.30	+	+	+	-	-	+	++	-	+
Cal.l.20	-	-	+	-	-	+	++	-	+
Cal.f.2.1	-	-	+	+	-	+	++	-	+
Cal.f.6.1	-	-	+	-	-	+	++	-	+
Cal.f.6.3	-	+	+	-	-	+	++	-	+
Cal.f.4	+	+	+	+	-	+	++	-	+
Cal.r.20	+	+	+	-	-	-	++	-	-
Cal.r.30	+	+	-	-	-	-	++	-	-
Cal.r.38.1	+	+	-	-	-	-	++	-	-
Cal.r.21	+	+	-	-	-	+	++	-	-
Cal.r.37.1	+	+	-	+	-	+	++	-	-
Cal.r.15	+	+	-	-	-	+	++	-	-
Cal.r.6	+	+	+	-	-	+	++	-	-
Cal.r.3	+	+	+	-	-	+	++	-	-
Cal.l.6	+	+	-	-	-	-	++	-	-
Cal.f.9	+	+	-	-	-	+	++	-	-
Cal.r.35	-	+	-	+	-	-	+++	-	+
Cal.r.8.2	-	+	+	-	+	+	-	-	-
Cal.l.7a	+	+	-	-	-	-	+++	-	+

Όλα τα στελέχη των βακτηρίων του γένους *Bacillus* είναι θετικά (100%) στην παραγωγή κυτταρινολυτικών και πρωτεολυτικών ενζύμων, καθώς και στην παραγωγή ακετοΐνης (Πίν. 3.10). Την ίδια στιγμή το 50% των στελεχών είναι θετικά στην διαλυτοποίηση του φωσφορικού ασβεστίου ενώ το 91,7% βρέθηκε θετικό στην παραγωγή της αυξητικής

ορμόνης IAA. Με ποσοστό 45,8%, τα βακτήρια του γένους *Bacillus* βρέθηκαν θετικά στην παραγωγή σιδηροφόρων και στην παραγωγή ουρεάσης, ενώ κανένα στέλεχος δεν βρέθηκε θετικό στην παραγωγή χιτινολυτικών ενζύμων ή στην παραγωγή αμμωνίας.

Όπως παρουσιάζεται και στον Πίνακα 3.10, τα βακτήρια του γένους *Pseudomonas* που μελετώνται βρέθηκαν θετικά με ποσοστό 100% στη διαλυτοποίηση του φωσφόρου, την παραγωγή σιδηροφόρων ενώσεων καθώς και στην παραγωγή της αυξητικής ορμόνης IAA. Την ίδια στιγμή κανένα από τα στελέχη του γένους *Pseudomonas* δεν βρέθηκαν θετικά στην παραγωγή ουρεάσης, χιτινάσης και ακετοΐνης. Τέλος, βρέθηκαν θετικά κατά 60%, 30% και 20% στην παραγωγή πρωτεολυτικών και κυτταρολυτικών ενζύμων και στην παραγωγή αμμωνίας, αντίστοιχα.

Πίνακας 3.10 % θετική ένδειξη των ενδοφυτικών βακτηρίων/ γένος στους μελετώμενους μηχανισμούς που προάγουν την ανάπτυξη των φυτών (PGP- traits).

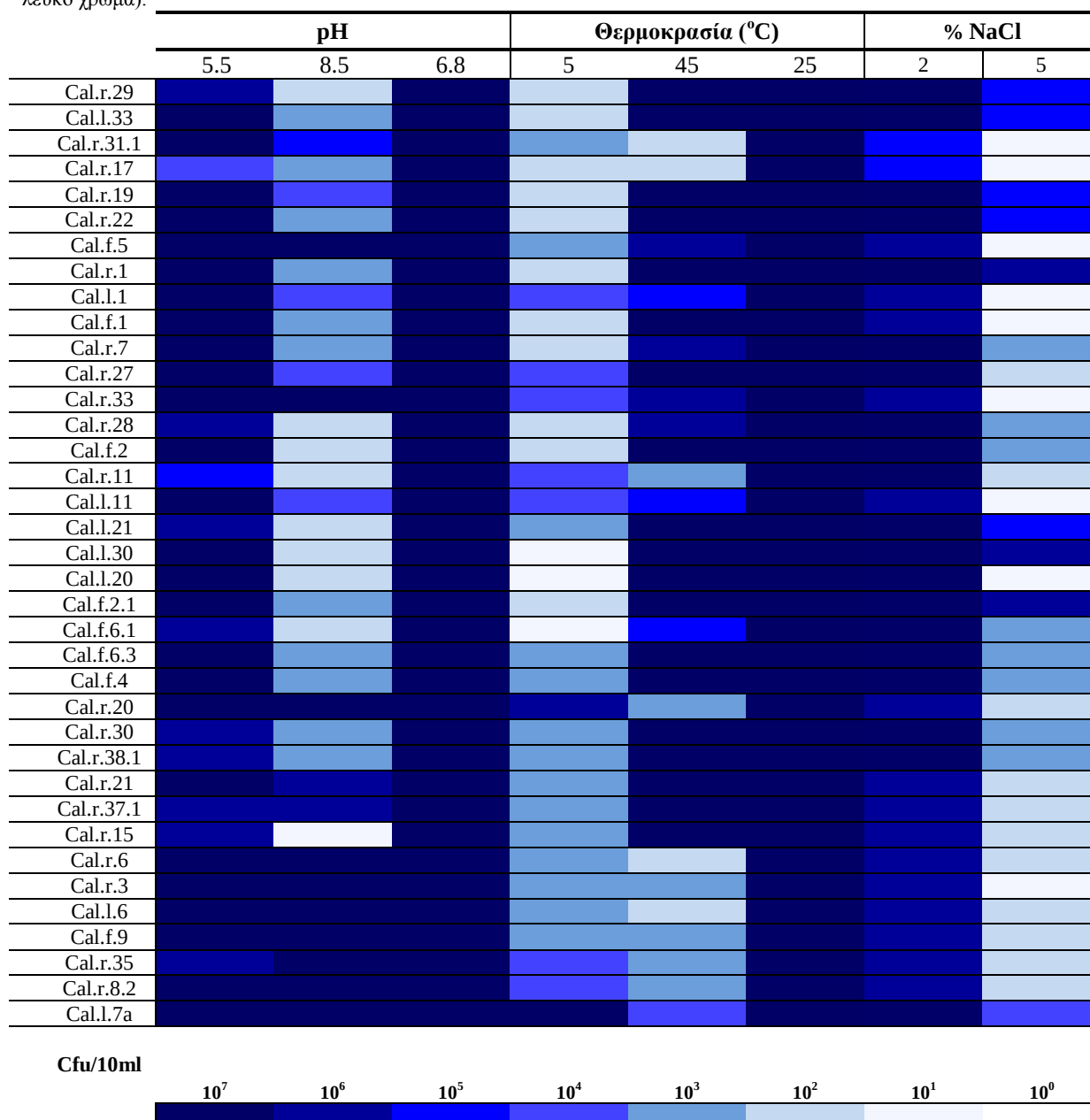
PGP traits	% θετική ένδειξη σε PGP trait	
	<i>Bacillus</i> sp.	<i>Pseudomonas</i> sp.
Διαλυτοποίηση φωσφόρου	50%	100%
Παραγωγή σιδηροφόρων	45,8%	100%
Παραγωγή κυτταρινάσης	100%	30%
Παραγωγή ουρεάσης	45,8%	10%
Παραγωγή χιτινάσης	0%	0%
Παραγωγή πρωτεάσης	100%	60%
Παραγωγή IAA	91,7%	100%
Παραγωγή αμμωνίας	0%	20%
Παραγωγή ακετοΐνης	100%	0%

Τα γένη *Agrobacterium*, *Pantoea* και *Stenotrophomonas* έχουν από ένα αντιπροσωπευτικό στέλεχος, τα αντίστοιχα Cal.r.35, Cal.l.7a και Cal.r.8.2 και τα οποία μελετήθηκαν για τους άμεσους και έμμεσους μηχανισμούς που προάγουν την ανάπτυξη των φυτών. Συγκεκριμένα, το στέλεχος Cal.r.35 βρέθηκε θετικό στην παραγωγή σιδηροφόρων ενώσεων, ουρεάσης, IAA και ακετοΐνης, το στέλεχος Cal.l.7a είναι θετικό στη διαλυτοποίηση του φωσφόρου, την παραγωγή σιδηροφόρων, IAA και ακετοΐνης, ενώ το στέλεχος Cal.r.8.2 βρέθηκε θετικό στην παραγωγή σιδηροφόρων, κυτταρινάσης και χιτινάσης.

3.1.8 Επιβίωση βακτηρίων σε ακραίες συνθήκες ανάπτυξης

Τα 37 επιλεγμένα βακτηριακά στελέχη εξετάστηκαν περαιτέρω ως προς την ικανότητά τους να επιβιώνουν σε ακραίες συνθήκες ανάπτυξης, όπως είναι οι ακραίες τιμές pH, οι υψηλές και χαμηλές θερμοκρασίες καθώς και σε θρεπτικό υπόστρωμα με υψηλή συγκέντρωση σε αλατότητα. Στον Πίνακα 3.11 με χρωματική διαβάθμιση παρουσιάζεται η ικανότητα επιβίωσης των βακτηρίων καθώς και η μέγιστη συγκέντρωση των κυττάρων.

Πίνακας 3.11 Επιβίωση βακτηριακών κυττάρων σε ακραίες τιμές pH, θερμοκρασίας και αλατότητας. Απεικόνιση συνολικού αριθμού βακτηριακών κυττάρων με χρωματικό χάρτη (10^7 cfu/ ml με σκούρο μπλε χρώμα και 10^0 cfu/ ml, με λευκό χρώμα).



Οι βέλτιστες συνθήκες θερμοκρασίας και pH στις οποίες αναπτύσσονται όλα τα στελέχη ως τη μέγιστη συγκέντρωσή τους είναι οι 25°C (έχεις βάλει σε pH 6.8, οι οποίες θεωρούνται

και οι βέλτιστες συνθήκες. Στο θρεπτικό μέσο NA με pH 5.5 και θερμοκρασία 25°C, η πλειοψηφία των ενδοφυτικών βακτηρίων αναπτύσσεται επίσης ως τη μέγιστη συγκέντρωσή τους. Σε pH 8.5 επιβιώνουν ως τη μέγιστη συγκέντρωσή τους τα στελέχη του γένους *Bacillus* Cal.f.5, Cal.r.33, του γένους *Pseudomonas* τα στελέχη Cal.r.20, Cal.r.6, Cal.r.3, Cal.l.6, Cal.f.9 και τα μεμονωμένα στελέχη των γενών *Stenotrophomonas*, *Pantoea* και *Agrobacterium*. Τα περισσότερα στελέχη που επωάζονται σε θερμοκρασία 5°C αναπτύσσονται ελάχιστα κυμαινόμενα μεταξύ 10^2 - 10^3 cfu/ ml. Τα στελέχη που ξεχωρίζουν είναι τα Cal.r.20 και Cal.l.7a φτάνοντας σε συγκέντρωση 10^6 και 10^7 cfu/ ml αντίστοιχα. Αντιθέτως, στη μέγιστη θερμοκρασία επώασης των 45 °C, η πλειοψηφία των βακτηρίων καταφέρνει να επιβιώσει, φτάνοντας τις μέγιστες τιμές συγκέντρωσης των κυττάρων τους. Συγκεκριμένα, το 87,5 % των στελεχών του γένους *Bacillus* επιβιώνει σε θερμοκρασία 45 °C φτάνοντας σε συγκέντρωση κυττάρων 10^5 - 10^7 cfu/ ml, σε αντίθεση με τα βακτήρια του γένους *Pseudomonas* που δεν ξεπερνά το 38,46 %. Ο εμβολιασμός των βακτηρίων σε θρεπτικό μέσο ανάπτυξης με υψηλή συγκέντρωση σε αλατότητα μειώνει σημαντικά την ανάπτυξη των βακτηρίων. Συγκεκριμένα, σε συγκέντρωση 5 % (w/v) τα στελέχη που καταφέρνουν να φτάσουν τελική συγκέντρωση 10^5 - 10^6 cfu/ ml είναι τα Cal.r.29, Cal.l.33, Cal.r.19, Cal.r.22, Cal.r.1, Cal.l.21, Cal.l.30 και Cal.f.2.1, με τα υπόλοιπα στελέχη να μην ξεπερνούν τα 10^3 cfu/ ml.

3.1.9 Φυσική ανθεκτικότητα των ενδοφυτικών βακτηρίων σε διάφορες αντιβιοτικές ενώσεις

Τα επιλεγμένα βακτήρια μελετήθηκαν στη συνέχεια για τη φυσική ανθεκτικότητα τους στα αντιβιοτικά τετρακυκλίνη, αμπικιλίνη, καναμυκίνη, στρεπτομυκίνη και ριφαμικίνη. Τα βακτήρια αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα NA με την προσθήκη του κάθε αντιβιοτικού σε διηθητικό χαρτί σε τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις, την ενδεδειγμένη καθώς και μια ελάχιστη και μέγιστη τιμή. Στον Πίνακα 3.12 παρουσιάζεται με συν (+) και πλην (-) η εμφάνιση ή μη της ανθεκτικότητας των βακτηρίων στις διαφορετικές συγκεντρώσεις των μελετώμενων αντιβιοτικών. Τα βακτηριακά στελέχη Cal.r.11, Cal.l.11, Cal.l.30, Cal.l.21, Cal.f.4 και Cal.l.7a δεν παρουσιάζουν ανθεκτικότητα σε κάποια από τα μελετώμενα αντιβιοτικά. Τα πέντε (Cal.r.29, Cal.r.33, Cal.f.2, Cal.f.6.1 και Cal.f.6.3) από τα 37 στελέχη εμφανίζουν ανθεκτικότητα μόνο στην τετρακυκλίνη και μάλιστα στην ελάχιστη μελετώμενη συγκέντρωση του αντιβιοτικού. Τα στελέχη Cal.r.8.2 και Cal.r.35 παρουσιάζουν τη μεγαλύτερη φυσική ανθεκτικότητα, επιβιώνοντας στην αμπικιλίνη, την καναμυκίνη και τη στρεπτομυκίνη, με το πρώτο στέλεχος να επιβιώνει και στην ελάχιστη συγκέντρωση του

αντιβιοτικού τετρακυκλίνη. Σημαντική είναι και η επιβίωση των στελεχών Cal.r.3 και Cal.r.6 τα οποία εμφάνισαν ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά τετρακυκλίνη, αμπικιλλίνη και ριφαμπικίνη. Τέλος, τα υπόλοιπα βακτηριακά στελέχη παρουσιάζουν ανθεκτικότητα μόνο στην αμπικιλλίνη, με τα περισσότερα στελέχη ακόμη και στις υψηλότερες συγκεντρώσεις του αντιβιοτικού.

Πίνακας 3.12 Φυσική ανθεκτικότητα των ενδοφυτικών βακτηρίων σε διαφορετικά αντιβιοτικά. Τετρακυκλίνη (5, 10 και 20 µg/ml), Αμπικιλλίνη (50, 100 και 200 µg/ml), Καναμυκίνη (25, 50 και 100 µg/ml), Στρεπτομυκίνη (50, 100 και 200 µg/ml) και Ριφαμπικίνη (25, 50 και 100 µg/ml).

	Τετρακυκλίνη (Tetracycline)			Αμπικιλλίνη (Ampicillin)			Καναμυκίνη (Kanamycin)			Στρεπτομυκίνη (Streptomycin)			Ριφαμπικίνη (Rifampicin)		
	5	10	20	50	100	200	25	50	100	50	100	200	25	50	100
	µg/ml														
Cal.r.29	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cal.l.33	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cal.r.31.1	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cal.r.17	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cal.r.19	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cal.r.22	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cal.f.5	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cal.r.1	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cal.l.1	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cal.f.1	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cal.r.7	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cal.r.27	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cal.r.33	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cal.r.28	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cal.f.2	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cal.r.11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cal.l.11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cal.l.21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cal.l.30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cal.l.20	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cal.f.2.1	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cal.f.6.1	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cal.f.6.3	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cal.f.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cal.r.20	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cal.r.30	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cal.r.38.1	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cal.r.21	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Cal.r.37.1	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Cal.r.15	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cal.r.6	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-
Cal.r.3	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Cal.l.6	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cal.f.9	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cal.r.35	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
Cal.r.8.2	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
Cal.l.7a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

3.2 Περαιτέρω μελέτη των επιλεγμένων ενδοφυτικών βακτηρίων Cal.r.29, Cal.f.4, Cal.l.30, Cal.f.5, Cal.r.11, Cal.f.2.1, Cal.l.11, Cal.r.33, Cal.r.19, Cal.l.21, Cal.r.20, Cal.l.7a και Cal.r.6

Τα βακτηριακά στελέχη που ξεχώρισαν με την επίδρασή τους στην ανάπτυξη και τα μορφολογικά χαρακτηριστικά του φυτού μοντέλου *A. thaliana* σε *in vitro* συνθήκες και εμφάνισαν ταυτόχρονα πολλαπλούς *in vitro* μηχανισμούς που προάγουν την ανάπτυξη των φυτών (PGP- traits) είναι τα στελέχη Cal.r.29, Cal.f.4, Cal.l.30, Cal.f.5, Cal.r.11, Cal.f.2.1, Cal.l.11, Cal.r.33, Cal.r.19, Cal.l.21, Cal.r.20, Cal.l.7a και Cal.r.6.

3.2.1 Επίδραση των επιλεγμένων ενδοφυτικών βακτηρίων στη βλαστικότητα και την ανάπτυξη φυταρίων τομάτας *in vitro*

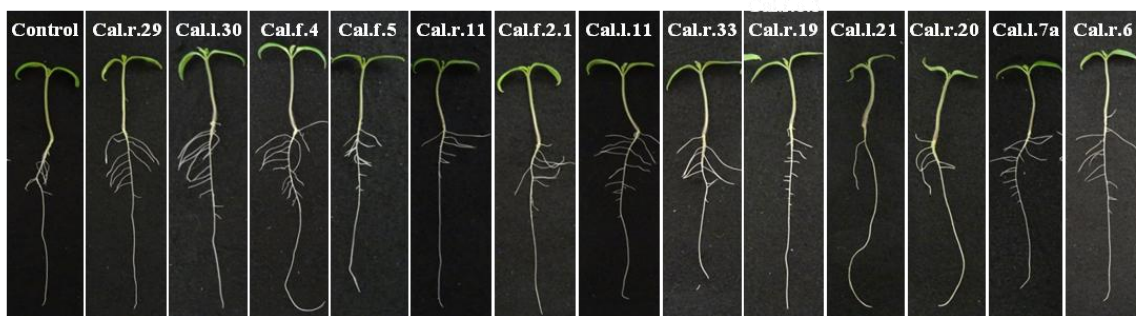
Τα επιλεγμένα ενδοφυτικά βακτήρια μελετήθηκαν για την επίδρασή τους στη βλαστικότητα και τα μορφολογικά χαρακτηριστικά φυταρίων τομάτας (*Solanum lycopersicum*) σε *in vitro* συνθήκες. Η εφαρμογή των στελεχών στους σπόρους τομάτας πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της βιοκάλυψης (biopriming). Στον Πίνακα 3.13, παρουσιάζεται η επίδραση των βακτηρίων στη βλαστικότητα των σπόρων την τρίτη (3 dpi) και την όγδοη ημέρα (8 dpi) από την ημέρα εμβολισμού των βακτηρίων.

Πίνακας 3.13 Επίδραση των βακτηρίων στη βλαστικότητα των σπόρων τομάτας. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο των μετρήσεων και τις τυπικές αποκλίσεις των τιμών. Οι αστερίσκοι υποδεικνύουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές ($p < 0.05$) μεταξύ των τιμών ($n=50$) σε σύγκριση με τα φυτά του μάρτυρα ανά ημέρες παρατήρησης μετά από την πραγματοποίηση Dunnett's test.

Βακτηριακά στελέχη	% Βλαστικότητα σπόρων τομάτας	
	3 dpi	8 dpi
Μάρτυρας	83,00 ± 1,00	91,67 ± 1,53
Cal.r.29	88,00 ± 3,00	96,67 ± 2,08
Cal.l.30	91,67 ± 2,52*	98,33 ± 2,08*
Cal.f.4	90,00 ± 1,00*	95,33 ± 3,06
Cal.f.5	85,00 ± 1,73	93,33 ± 3,06
Cal.r.11	82,67 ± 3,06	92,00 ± 2,00
Cal.f.2.1	78,00 ± 3,00	91,33 ± 2,08
Cal.l.11	91,67 ± 1,53*	96,00 ± 1,00
Cal.r.33	90,33 ± 1,53*	90,67 ± 1,16
Cal.r.19	89,00 ± 2,65*	94,00 ± 1,00
Cal.l.21	75,67 ± 2,52*	80,67 ± 2,08*
Cal.r.20	72,33 ± 2,52*	89,33 ± 3,06
Cal.l.7a	85,67 ± 3,22	87,67 ± 1,53
Cal.r.6	81,00 ± 2,00	86,00 ± 2,00*

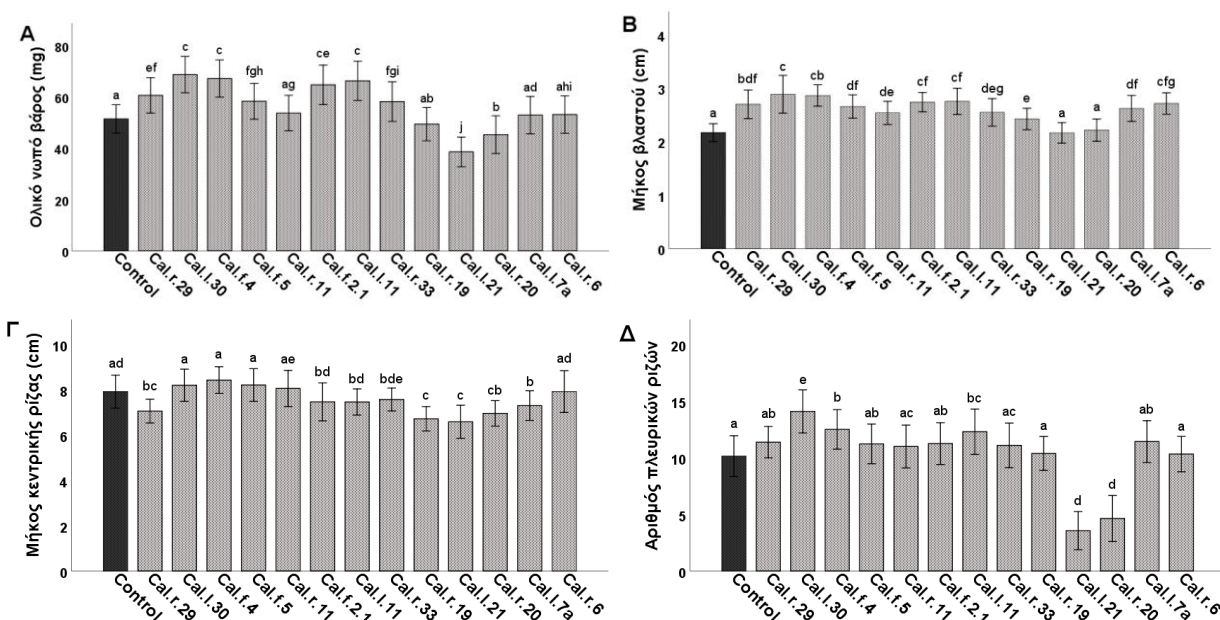
Το βακτηριακό στέλεχος Cal.l.30 ξεχωρίζει, παρουσιάζοντας το μεγαλύτερο ποσοστό βλαστικότητας των σπόρων τομάτας και τις δύο ημέρες παρατήρησης. Αντιθέτως, τα στελέχη Cal.l.21 και Cal.r.6 μείωσαν σημαντικά το ποσοστό βλαστικότητας των σπόρων.

Τα βακτηριακά στελέχη επηρεάζουν σημαντικά τα μορφολογικά χαρακτηριστικά και την ανάπτυξη των φυταρίων τομάτας όπως είναι το ολικό νωπό βάρος των φυτών, το μήκος του βλαστού και της κεντρικής ρίζας, καθώς και ο αριθμός των πλευρικών ριζών των φυταρίων. Οι μετρήσεις των μορφολογικών χαρακτηριστικών πραγματοποιήθηκαν σε φυτάρια τομάτας 8 ημερών (Εικ. 3.12).



Εικόνα 3.12 Φυτάρια τομάτας 8 ημερών μετά την εφαρμογή των ενδοφυτικών βακτηρίων στους σπόρους με τη μέθοδο biopriming.

Όπως παρουσιάζεται και στο Διάγραμμα 3.7Α, τα βακτηριακά στελέχη Cal.r.29, Cal.l.30, Cal.f.4, Cal.f.5, Cal.f.2.1, Cal.l.11 και Cal.r.33 αυξάνουν σημαντικά το νωπό βάρος των φυτών σε σύγκριση με τα φυτά του μάρτυρα. Ταυτόχρονα ξεχωρίζουν τα στελέχη Cal.l.30, Cal.f.4, Cal.f.2.1 και Cal.l.11 από την εφαρμογή των οποίων τα φυτά παρουσιάζουν τις υψηλότερες τιμές σε σχέση με τα υπόλοιπα στελέχη.



Διάγραμμα 3.7 Επίδραση των επιλεγμένων ενδοφυτικών βακτηρίων Α) στο ολικό νωπό βάρος, Β) στο μήκος του βλαστού, Γ) στο μήκος της κεντρικής ρίζας και Δ) στον αριθμό των πλευρικών ριζών των φυτών *Solanum lycopersicum* var. Chondrokatsari Messinias. Οι ράβδοι αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο των μετρήσεων των φυτών και τις τυπικές αποκλίσεις των τιμών (n= 40). Τα διαφορετικά γράμματα υποδεικνύουν στατιστικές σημαντικές διαφορές ($p < 0.05$) μεταξύ όλων των δειγμάτων μετά από την πραγματοποίηση Tukey's test.

Ταυτόχρονα, τα ίδια στελέχη συμπεριλαμβανομένου και του Cal.r.6 παρουσιάζουν το υψηλότερο συνολικό μήκος του βλαστού σε σύγκριση με την εφαρμογή των υπόλοιπων στελεχών, καθώς και τα φυτά του μάρτυρα (Control) (Διαγρ. 3.7B). Τα υπόλοιπα στελέχη αυξάνουν επίσης σημαντικά το συνολικό μήκος βλαστού σε σύγκριση με τα φυτά του μαρτυρα, με εξαίρεση τα στελέχη Cal.l.21 και Cal.r.20. Τα στελέχη Cal.l.21 και Cal.r.20 επηρεάζουν αρνητικά όλα τα χαρακτηριστικά των φυταρίων τομάτας, παρουσιάζοντας το χαμηλότερο ολικό νωπό βάρος, το μικρότερο μήκος βλαστού και αριθμό πλευρικών ριζών καθώς και χαμηλές τιμές του μήκους της κεντρικής ρίζας. Όπως παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 3.7Γ, το μήκος της κεντρικής ρίζας δεν επηρεάζεται σημαντικά από τα περισσότερα ενδοφυτικά στελέχη, με εξαίρεση τα στελέχη Cal.r.29, Cal.r.19, Cal.l.7a και τα προαναφερθέντα στελέχη Cal.r.20 και Cal.l.21. Τέλος, η εφαρμογή των στελεχών Cal.l.30, Cal.f.4 και Cal.l.11 εμφάνισε τη μεγαλύτερη αύξηση πλευρικών ριζών σε σύγκριση με την εφαρμογή όλων των υπόλοιπων στελεχών καθώς και τα φυτά μάρτυρες (Διαγρ. 3.7Δ). Όλα τα στελέχη που εφαρμόστηκαν στους σπόρους με βιο- κάλυψη κατάφεραν να αποικίσουν αποτελεσματικά τα φυτάρια τομάτας με συγκέντρωση κυττάρων $\sim 10^3$ - 10^4 cfu/ φυτάριο.

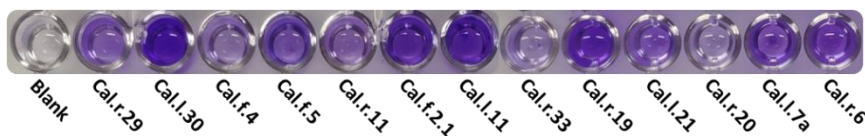
3.2.2 Κινήσεις βακτηρίων, ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου και παραγωγή επιφανειοδραστικών ενώσεων

Τα 13 επιλεγμένα βακτηριακά στελέχη μελετήθηκαν ως προς την ικανότητα κίνησής τους σε διάφορα υποστρώματα *in vitro*. Μελετήθηκε η ικανότητα πραγματοποίησης ομαδικής (swarming motility) και κολυμβητικής κίνησης (swimming motility) σε ημιστερεό υπόστρωμα NA, στερεοποιημένο με άγαρ συγκέντρωσης 0,5 % και 0,3 % (w/v) αντίστοιχα, καθώς και η ικανότητα κίνησης των βακτηρίων σε χώμα με 50 % υγρασία. Ταυτόχρονα, μελετήθηκε η ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου σε πλαστικό δοχείο 96 πηγαδιών (96 well plate), ενώ πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της φασματοφωτομετρίας, μέτρηση της οπτικής πυκνότητας των κυττάρων που προσκολλήθηκαν στα τοιχώματα κατά το σχηματισμό βιοϋμενίου. Τέλος, με τη μέθοδο της κατάρρευσης της σταγόνας (drop collapse assay), έγινε μια άμεση ανίχνευση της ικανότητας των βακτηρίων να παράγουν επιφανειοδραστικές ενώσεις στο μέσο κίνησής τους.

Πίνακας 3.14 Ικανότητα κίνησης βακτηρίων σε διαφορετικά υποστρώματα. Ο αριθμός των συν (+) στην ομαδική και κολυμβητική κίνηση, αντιπροσωπεύει το εμβαδόν κάλυψης των επιφανειών από το αντίστοιχο βακτηριακό στέλεχος με το πλήθος να αυξάνεται με την αύξηση του εμβαδού (+++++: <70 cm², ++++: <50 cm², +++: <30 cm², ++: <10 cm², +: <2,5 cm², -: <2,0 cm²). Το ένα + στην κίνηση των βακτηρίων στο χώμα, αντιπροσωπεύει το θετικό αποτέλεσμα.

Μακροσκοπική παρατήρηση			
Βακτηριακά στελέχη	Ομαδική κίνηση (swarming)	Κολυμβητική κίνηση (swimming)	Κίνηση στο χώμα (50% υγρασία)
Cal.r.29	+++++	+++++	+
Cal.l.30	+++++	+++++	+
Cal.f.4	+++++	+++++	+
Cal.f.5	++	++++	+
Cal.r.11	+++++	+++++	+
Cal.f.2.1	+++++	+++++	+
Cal.l.11	+++++	+++++	+
Cal.r.33	+	++++	+
Cal.r.19	+++++	+++++	+
Cal.l.21	+++++	+++++	+
Cal.r.20	-	-	+
Cal.l.7a	-	+++	+
Cal.r.6	+	++	+

Στον Πίνακα 3.14 παρουσιάζεται με διαφορετικό αριθμό συν (+) η ικανότητα πραγματοποίησης ομαδικής και κολυμβητικής κίνησης των βακτηρίων, εξαρτώμενο από το εμβαδόν εξάπλωσης τους στο μέσο. Τα βακτηριακά στελέχη Cal.r.29, Cal.l.30, Cal.f.4, Cal.r.11, Cal.f.2.1, Cal.l.11, Cal.r.19 και Cal.l.21 εμφάνισαν το υψηλότερο εμβαδό εξάπλωσης είτε πραγματοποιώντας ομαδική, είτε κολυμβητική κίνηση, καλύπτοντας πλήρως την επιφάνεια του τρυβλίου. Ακολουθούν τα στελέχη Cal.f.2.1, Cal.r.33 και Cal.r.6 με χαμηλότερο εμβαδό εξάπλωσης μέσω ομαδικής κίνησης, ενώ τα στελέχη Cal.r.20, Cal.l.7a και Cal.l.6 δεν έχουν την ικανότητα ομαδικής κίνησης. Το βακτηριακό στέλεχος Cal.r.20 δεν έχει την ικανότητα να πραγματοποιήσει ούτε κολυμβητική κίνηση, σε αντίθεση με τα υπόλοιπα στελέχη που βρέθηκαν θετικά. Το θετικό αποτέλεσμα στην ικανότητα κίνησης των βακτηρίων στο χώμα, συμβολίζεται με ένα συν (+). Όπως παρατηρείτε και στον Πίνακα 3.13, όλα τα στελέχη κατάφεραν να κινηθούν από το χώμα προς το θρεπτικό μέσο ανάπτυξης, σε αντίθεση με την ικανότητά τους να πραγματοποιήσουν ομαδική και κολυμβητική κινητικότητα.



Εικόνα 3.13 Σχηματισμός βιοϋμενίου *in vitro*.

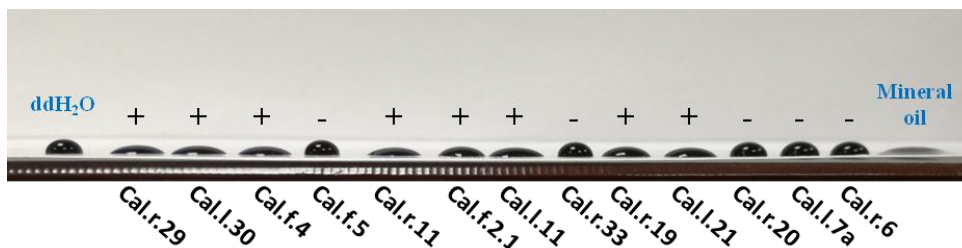
Όπως παρουσιάζεται και στην Εικόνα 3.13 και σύμφωνα με τον Πίνακα 3.15, όλα τα βακτηριακά στελέχη βρέθηκαν θετικά στο σχηματισμό βιοϋμενίου σε *in vitro* συνθήκες (96 well-plate). Τα βακτηριακά στελέχη που εμφάνισαν το υψηλότερο ποσοστό σχηματισμού

βιοϋμενίου, ήταν τα στελέχη Cal.l.30, Cal.r.29, Cal.f.5, Cal.f.2.1, Cal.l.11, Cal.r.19, Cal.l.7a και Cal.r.6.

Πίνακας 3.15 Ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου.

Στελέχη	Cal.r.29	Cal.l.30	Cal.f.4	Cal.f.5	Cal.r.11	Cal.f.2.1	Cal.l.11	Cal.r.33	Cal.r.19	Cal.l.21	Cal.r.20	Cal.l.7a	Cal.r.6
OD ₅₅₀	0.172	0.379	0.084	0.092	0.074	0.157	0.201	0.131	0.156	0.075	0.032	0.101	0.082

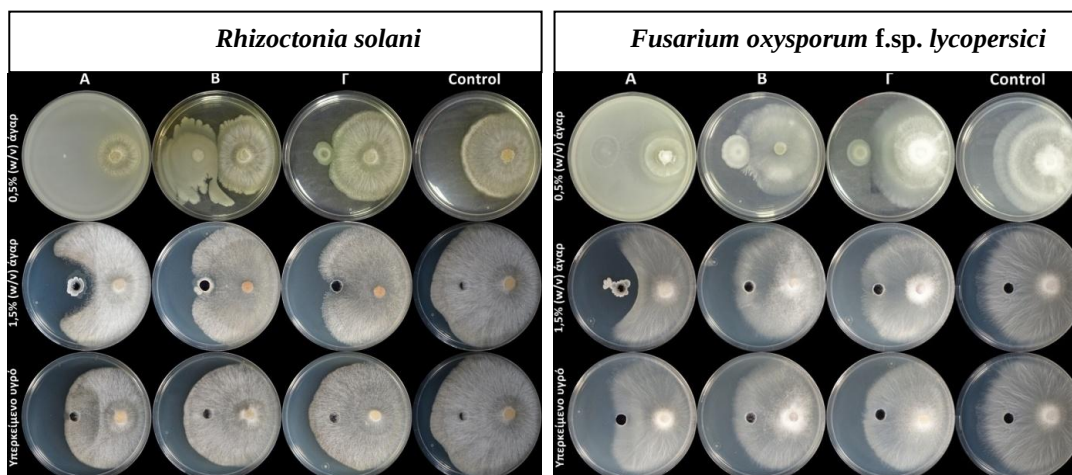
Η μέθοδος της κατάρρευσης της σταγόνας αποτελεί μια ταχεία μέθοδο ανίχνευσης της ικανότητας των βακτηρίων να παράγουν επιφανειοδραστικές ενώσεις κατά την ανάπτυξή τους σε υγρό θρεπτικό μέσο. Στην Εικόνα 3.14 παρουσιάζεται με +/- η ικανότητα παραγωγής επιφανειοδραστικών ενώσεων, έχοντας ως θετικό μάρτυρα το ορυκτέλαιο (mineral oil, Sigma) και ως αρνητικός μάρτυρας ddH₂O. Τα βακτηριακά στελέχη που βρέθηκαν θετικά στην παραγωγή επιφανειοδραστικών ενώσεων, ήταν τα στελέχη Cal.r.29, Cal.l.30, Cal.f.4, Cal.l.11, Cal.f.2.1, Cal.r.11, Cal.r.19 και Cal.l.21, τα οποία ανήκουν στο γένος *Bacillus*.



Εικόνα 3.14 Μέθοδος κατάρρευσης της σταγόνας για την ταχεία ανίχνευση επιφανειοδραστικών ενώσεων. Η ικανότητα παραγωγής επιφανειοδραστικών ενώσεων στο υγρό μέσο ανάπτυξης των βακτηρίων συμβολίζεται με συν (+) ως θετικό αποτέλεσμα και με πλην (-) ως αρνητικό.

3.2.3 Βιολογική αντιμετώπιση των φυτοπαθογόνων μυκήτων *Rhizoctonia solani* και *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* in vitro

Ένα από τα σημαντικότερα χαρακτηριστικά που δόθηκε έμφαση στη μελέτη των επιλεγμένων βακτηριακών στελεχών, είναι η αντιμικροβιακή τους δράση ενεργώντας ως παράγοντες βιολογικού ελέγχου εναντίον φυτοπαθογόνων μυκήτων. Για το λόγο αυτό μελετήθηκε η *in vitro* ικανότητά τους να αναχαιτίζουν την ανάπτυξη των φυτοπαθογόνων μυκήτων *Rhizoctonia solani* και *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* (Εικ. 3.15). Με τη μέθοδο της διπλής καλλιέργειας *in vitro* οι μικροοργανισμοί εμβολιάστηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα ΝΑ στερεοποιημένα με άγαρ 1,5% (w/v) και 0,5% (w/v). Τέλος, μελετήθηκε η επίδραση των παραγόμενων σε υγρή καλλιέργεια ενώσεων στην παρεμπόδιση των φυτοπαθογόνων μυκήτων.



Εικόνα 3.15 Βιολογική αντιμετώπιση των φυτοπαθογόνων μυκήτων *Rhizoctonia solani* και *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* *in vitro* με τη μέθοδο της διπλής καλλιέργειας σε 0,5% (w/v) και 1,5 % (w/v) άγαρ καθώς και εφαρμογή φιλτραρισμένου υπερκείμενου βακτηριακής καλλιέργειας. Κατηγοριοποίηση των βακτηρίων σε τρεις κατηγορίες (A, B και Γ) με βάση το φαινότυπο, σε σύγκριση με τους μύκητες μάρτυρες (Control).

Όπως παρουσιάζεται και στην Εικόνα 3.15, τα βακτήρια κατηγοριοποιήθηκαν σε τρεις βασικές κατηγορίες A, B και Γ. Η κατηγοριοποίηση των στελεχών προέκυψε από τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των μικροοργανισμών κατά την αλληλεπίδρασή τους, σε σύγκριση με τους μύκητες μάρτυρες (Control). Συγκεκριμένα, στην κατηγορία A ανήκουν τα βακτηριακά στελέχη του γένους *Bacillus* (Cal.r.29, Cal.l.30, Cal.f.4, Cal.l.11, Cal.f.2.1, Cal.r.11, Cal.r.19 και Cal.l.21) που περιόρισαν τους φυτοπαθογόνους μύκητες περικυκλώνοντάς και καλύπτοντάς τους σε υπόστρωμα στερεοποιημένο με άγαρ 0,5% (w/v), σχημάτισαν έντονη ζώνη παρεμπόδισης στο υπόστρωμα με άγαρ 1,5% (w/v), ενώ το υπερκείμενο των καλλιεργειών τους ανέκοψε με κάθετη γραμμή την εξάπλωση των μυκήτων. Στην κατηγορία B ανήκουν τα βακτηριακά στελέχη του γένους *Bacillus* (Cal.f.5 και Cal.r.33) που περικύκλωσαν σε μικρότερο βαθμό τους παθογόνους μύκητες σε υπόστρωμα με άγαρ 0,5% (w/v), αναχαίτισαν στο σημείο εμβολιασμού την εξάπλωση των μυκήτων στο υπόστρωμα με άγαρ 1,5% (w/v), ενώ το υπερκείμενο των καλλιεργειών τους ανέκοψε ελάχιστα τους παθογόνους μύκητες. Στην κατηγορία Γ ανήκουν τα βακτηριακά στελέχη Cal.r.20, Cal.l.7a και Cal.r.6 που εμφάνισαν παρόμοιο φαινότυπο με τα στελέχη της κατηγορίας B.

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκαν απευθείας μετρήσεις του εμβαδού του μυκηλίου των φυτοπαθογόνων μυκήτων μέσω του λογισμικού ImageJ. Με τα αποτελέσματα των μετρήσεων και την κατάλληλη στατιστική ανάλυση, υπολογίστηκε το ποσοστό παρεμπόδισης του μυκηλίου των μυκήτων και οι διαφορές μεταξύ των μεταχειρίσεων, όπως παρουσιάζονται στον παρακάτω (Πίν. 3.16).

Πίνακας 3.16 Ποσοστό παρεμπόδισης της ανάπτυξης του μυκηλίου των φυτοπαθογόνων μυκήτων *Rhizoctonia solani* (RS) και *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* (FOL) με την εφαρμογή των ενδοφυτικών βακτηρίων σε διαφορετικά υποστρώματα. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο των μετρήσεων με τις τυπικές αποκλίσεις των τιμών. Τα διαφορετικά γράμματα υποδεικνύουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές ($p < 0.05$) μεταξύ των τιμών ανά μεταχείριση, μετά από την πραγματοποίηση Tukey's test.

Βακτηριακά στελέχη	% Παρεμπόδισης της ανάπτυξης του μυκηλίου					
	RS			FOL		
	0,5% άγαρ	1,5% άγαρ	Υπερκείμενες ενώσεις	0,5% άγαρ	1,5% άγαρ	Υπερκείμενες ενώσεις
Μάρτυρας	0,00 ± 0,85a	0,00 ± 0,07a	0,00 ± 0,57a	0,00 ± 0,87a	0,00 ± 0,4a	0,00 ± 0,55a
Cal.r.29	74,23 ± 0,50b	23,14 ± 1,06b	20,47 ± 0,52f	72,69 ± 0,45d	34,50 ± 2,56b	19,24 ± 0,84c
Cal.l.30	74,23 ± 0,50b	22,45 ± 2,48be	14,84 ± 1,60e	66,67 ± 0,85b	31,93 ± 1,56bc	15,92 ± 1,34c
Cal.f.4	72,11 ± 0,15c	21,90 ± 1,42bed	14,19 ± 0,81e	66,73 ± 0,33b	30,84 ± 1,72cde	16,51 ± 1,80bc
Cal.f.5	44,00 ± 1,18d	19,90 ± 1,21eg	4,01 ± 1,12bc	60,04 ± 1,00e	23,61 ± 2,34gh	9,75 ± 1,56eg
Cal.r.11	71,30 ± 0,53c	21,43 ± 2,11bce	15,11 ± 2,10e	66,03 ± 0,71b	25,96 ± 0,51fg	16,13 ± 1,73c
Cal.f.2.1	71,77 ± 0,16c	19,00 ± 0,54dfg	14,09 ± 1,21e	65,94 ± 0,37b	31,72 ± 2,11bd	15,64 ± 1,00c
Cal.l.11	70,80 ± 0,39c	19,04 ± 0,94dfg	15,39 ± 0,33e	65,85 ± 0,34b	28,23 ± 2,44df	15,91 ± 1,98c
Cal.r.33	1,62 ± 1,68a	19,76 ± 2,17eg	5,50 ± 1,60c	1,61 ± 1,04ac	21,59 ± 2,39hi	6,79 ± 1,64fg
Cal.r.19	71,07 ± 0,47c	21,13 ± 2,30bcef	14,08 ± 0,45e	65,92 ± 0,45b	28,05 ± 1,17ef	13,54 ± 1,65cd
Cal.l.21	70,58 ± 0,26c	18,68 ± 0,86cg	8,22 ± 1,46d	66,76 ± 0,41b	24,44 ± 0,88gh	10,80 ± 0,50de
Cal.r.20	25,68 ± 0,41c	17,00 ± 1,30g	6,09 ± 1,27cd	5,84 ± 1,00f	19,51 ± 1,31i	6,62 ± 1,16f
Cal.l.7a	1,22 ± 1,31a	17,35 ± 0,52g	1,95 ± 1,03ab	0,97 ± 0,84ac	18,25 ± 1,14ij	7,31 ± 1,66fg
Cal.r.6	3,71 ± 1,55f	19,56 ± 1,37eg	2,91 ± 0,98b	2,30 ± 1,7c	15,28 ± 1,17j	8,81 ± 1,80ef

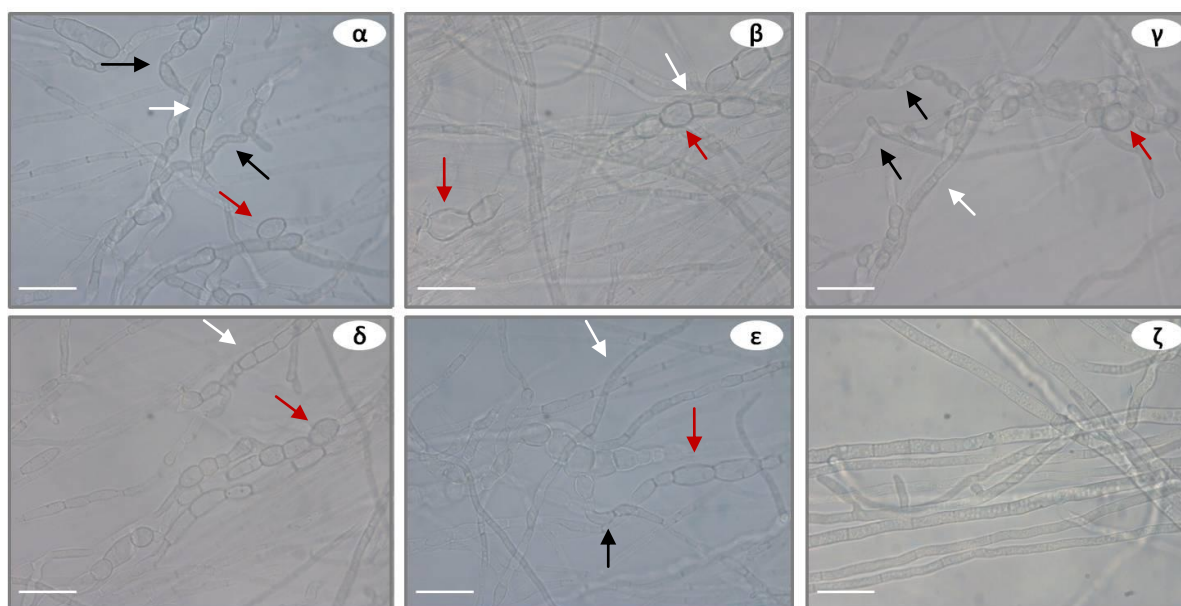
Το βακτήριο Cal.r.29, παρουσιάζει το υψηλότερο ποσοστό παρεμπόδισης σε σύγκριση με όλα τα υπόλοιπα στελέχη, στις περισσότερες εφαρμογές. Όλα τα βακτηριακά στελέχη που έχουν την ικανότητα ομαδικής κίνησης, εμφανίζουν πολύ υψηλό ποσοστό παρεμπόδισης εναντίον των μυκήτων σε NA με 0,5% (w/v) σε άγαρ. Τα στελέχη Cal.r.29 και Cal.l.30 αναχαιτίζουν σε μεγαλύτερο ποσοστό το μύκητα *R. solani* (RS), ακολουθούμενα από τα στελέχη Cal.f.4, Cal.r.11, Cal.f.2.1, Cal.l.11, Cal.r.19 και Cal.l.21, με σημαντικά υψηλό ποσοστό. Στο ίδιο υπόστρωμα και εναντίον του φυτοπαθογόνου μύκητα *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* (FOL), ξεχωρίζει το βακτηριακό στέλεχος Cal.r.29 με ποσοστό παρεμπόδισης 72,69%, ενώ ακολουθούν τα στελέχη Cal.l.30, Cal.f.4, Cal.r.11, Cal.f.2.1, Cal.l.11, Cal.r.19 και Cal.l.21 με ποσοστά παρεμπόδισης μεταξύ 65,92% και 66,76%.

Από την εφαρμογή των βακτηρίων σε NA με 1,5% (w/v) άγαρ εναντίον του *R. solani* ξεχωρίζουν τα στελέχη Cal.r.29, Cal.l.30, Cal.f.4, Cal.r.11 και Cal.r.19 με ποσοστά μεταξύ 21,13% και 23,14%, ενώ ακολουθούν με ποσοστά μεταξύ 18,68% και 19,00% τα στελέχη Cal.f.2.1, Cal.l.11, Cal.l.21, Cal.f.5, Cal.r.33 και Cal.r.6. Εναντίον του *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* ξεχωρίζουν τα στελέχη Cal.r.29, Cal.l.30 και Cal.f.2.1 με ποσοστό παρεμπόδισης πάνω από 31%. Ακολούθησαν τα στελέχη Cal.f.4 και Cal.l.11 με ποσοστά 30,84% και 28,23% αντίστοιχα και τα στελέχη Cal.r.11 και Cal.r.19 με αντίστοιχα ποσοστά 28,05% και 25,96%.

Η εφαρμογή των παραγόμενων υπερκείμενων ενώσεων αναχαιτίζει σημαντικά και τα δύο φυτοπαθογόνα στελέχη. Συγκεκριμένα, το στέλεχος Cal.r.29 παρουσιάζει ισχυρή

παρεμπόδιση του *R. solani* με ποσοστό 20,47%. Ακολουθούν τα στελέχη Cal.l.30, Cal.f.4, Cal.r.11, Cal.f.2.1, Cal.l.11 και Cal.r.19 με ποσοστά που κυμαίνονται μεταξύ 14,08% και 15,39%. Εναντίον του μύκητα *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* τα στελέχη Cal.r.29 και Cal.l.30 εμφανίζουν το υψηλότερο ποσοστό παρεμπόδισης στα 19,24% και 16,51%. Τέλος, ακολουθούν τα βακτήρια Cal.f.4, Cal.r.11, Cal.f.2.1, Cal.l.11 και Cal.r.19 με ποσοστά παρεμπόδισης 16,51%, 16,13%, 15,64%, 15,91% και 13,54% αντίστοιχα.

Όπως παρατηρείται στην Εικόνα 3.16, η εφαρμογή των βακτηρίων εναντίον του φυτοπαθογόνου μύκητα *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*, επηρεάζει σημαντικά τη μορφολογία των μυκηλιακών υφών. Μετά από κατάλληλη μικροσκοπική παρατήρηση των στελεχών Cal.l.30, Cal.f.4, Cal.l.21, Cal.r.29 και Cal.r.19 εναντίον του φυτοπαθογόνου μύκητα, παρατηρείται έντονα η εμφάνιση καρουλιασμένων υφών (μαύρο βέλος), διογκωμένων υφών (κόννικο βέλος), καθώς και αυξημένος αριθμός κάθετων διαφραγμάτων στο σύνολο των μεταχειρίσεων (λευκό βέλος) (Εικ. 3.16α-ε). Κανένα από τα παραπάνω μορφολογικά χαρακτηριστικά δεν εμφανίστηκαν στο μάρτυρα (Εικ. 3.16ζ).



Εικόνα 3.16 Μορφολογικές αλλαγές των υφών του μύκητα *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* μετά από ταυτόχρονη διπλή καλλιέργεια με τα ενδοφυτικά στελέχη α) Cal.l.30, β) Cal.f.4, γ) Cal.l.11, δ) Cal.r.29 και ε) Cal.r.19. Στην εικόνα ζ) παρουσιάζεται ο μύκητας ως μεταχείριση μάρτυρας (Κλίμακα 20 μ m). Μαύρο βέλος: καρούλιασμα υφών, κόκκινο βέλος: διογκωμένες υφές, λευκό βέλος: αυξημένα κάθετα διαφράγματα.

3.3 Μελέτη του ριζοσφαιρικού βακτηρίου *Pseudomonas carnis* X

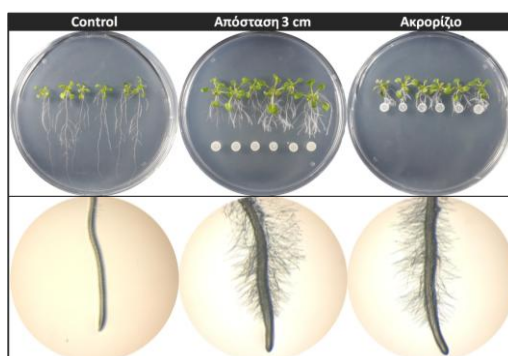
Το βακτήριο *Pseudomonas fluorescens* X, που απομονώθηκε από τη ριζόσφαιρα του φυτού *Phaseolus vulgaris*, αποτελεί ένα ανταγωνιστικό στέλεχος που ξεχωρίζει για την αντιμετώπιση του φυτοπαθογόνου ωομυκήτα *Pythium ultimum*, τόσο *in vivo* όσο και *in vitro* (Georgakopoulos et al., 2002). Παράλληλα έχει ξεχωρίσει και για την *in vitro* βιολογική

αντιμετώπιση των φυτοπαθογόνων μυκήτων *Fusarium* sp., *Botrytis* sp. και *Rhizoctonia solani* (Venieraki et al., 2016). Η ανταγωνιστικότητά του συνδέθηκε άμεσα με την παραγωγή ενός ισχυρού κυκλικού λιποπεπτιδίου, που παράγεται μέσω μιας μη ριβοσωμικής πεπτιδικής συνθάσης (NRPS) (Kremmydas et al., 2013). Στην παρούσα διδακτορική διατριβή μελετήθηκε εκτενέστερα για το εύρος των δυνατοτήτων του, τόσο στην ανάπτυξη των φυτών όσο και την προστασία τους.

Μετά από αλληλούχιση του γονιδιώματός του και κατάλληλη *in silico* ανάλυση, η οποία θα αναλυθεί στη συνέχεια, μετονομάστηκε σε *Pseudomonas carnis* X. Στο εξής θα αναφέρεται ως *Pseudomonas carnis* X ή στέλεχος X.

3.3.1 Εφαρμογή του ριζοσφαιρικού βακτηρίου *Pseudomonas carnis* X στο φυτό μοντέλο *A. thaliana* Col-0

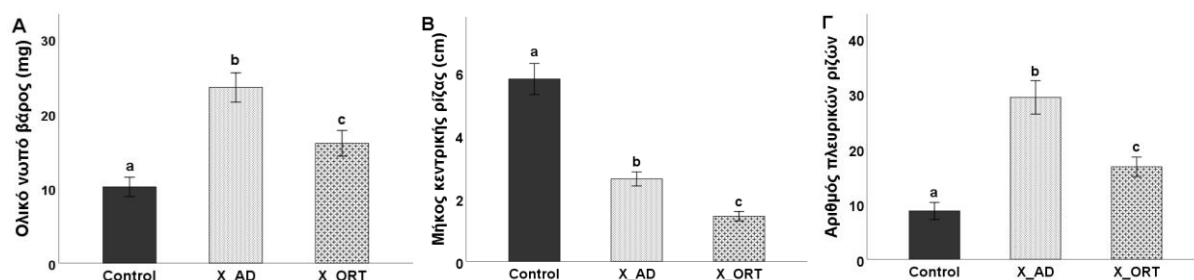
Το ριζοσφαιρικό βακτήριο *Pseudomonas carnis* X μελετήθηκε για την επίδραση του στην ανάπτυξη και τα μορφολογικά χαρακτηριστικά του φυτού *Arabidopsis thaliana* Col-0 σε *in vitro* συνθήκες. Ο εμβολιασμός των βακτηρίων πραγματοποιήθηκε σε ενιαίο τρυβλίο για την άμεση επίδραση των διαχεομένων και πτητικών ενώσεων του βακτηρίου στην ανάπτυξη των φυτών, καθώς και σε τρυβλίο με κεντρικό χώρισμα για τη μελέτη της επίδρασης των πτητικών ενώσεων στην ανάπτυξη των φυτών. Η *in vitro* εφαρμογή του βακτηρίου σε κλασσικό τρυβλίο πραγματοποιήθηκε με δύο τρόπους, σε απόσταση 3 cm από το ακρορρίζιο των φυτών και επί του ακρορρίζιου. Η εφαρμογή του βακτηρίου *P. carnis* X και με τους δύο τρόπους, επηρέασε τα μορφολογικά χαρακτηριστικά του φυτού. Προκύπτουν έτσι φυτά με κοντή κεντρική ρίζα, αυξημένο αριθμό και μεγάλου μήκους πλευρικές ρίζες (Εικ. 3.17).



Εικόνα 3.17 Εφαρμογή του ριζοσφαιρικού βακτηρίου *Ps. carnis* X σε φυτά *A. thaliana* σε απόσταση 3 cm από το ακρορρίζιο και επί του ακρορρίζιου των φυτών. Πάνω σειρά: μακροσκοπική παρατήρηση. Κάτω σειρά: στερεοσκοπική παρατήρηση της μορφολογίας του ακρορρίζιου.

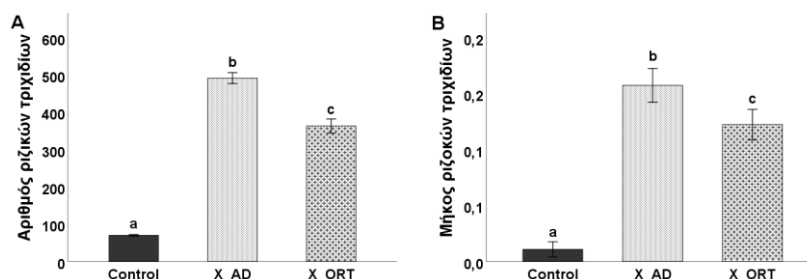
Η εφαρμογή του *P. carnis* X στα φυτά *Arabidopsis thaliana* επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό το ριζικό σύστημα των φυτών με αποτέλεσμα τη σημαντική αύξηση του αριθμού των ριζικών τριχιδίων του φυτού όσο και του μήκους αυτών.

Σύμφωνα με το Διάγραμμα 3.8 από την εφαρμογή του βακτηρίου, προκύπτουν φυτά με πολύ μεγαλύτερο ολικό βάρος, πιο κοντή κεντρική ρίζα και ταυτόχρονα αυξημένο αριθμό πλευρικών ριζών, σε σύγκριση με τα φυτά του μάρτυρα (Control). Μεταξύ των διαφορετικών εφαρμογών, ο εμβολιασμός του βακτηρίου σε απόσταση 3 cm από το ακρορρίζιο των φυτών, παρουσιάζει καλύτερες μετρήσεις στο σύνολο των μορφολογικών χαρακτηριστικών.



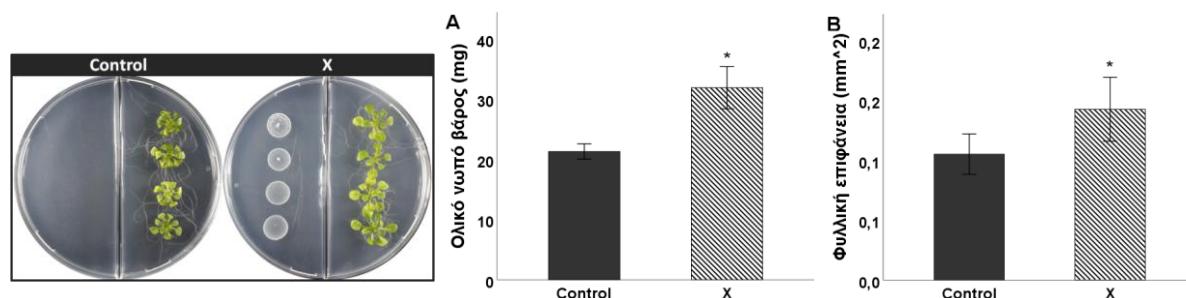
Διάγραμμα 3.8 Επίδραση του ριζοσφαιρικού βακτηρίου *Ps. carnis* X A) στο ολικό νωπό βάρος Β) στο μήκος της κεντρικής ρίζας και Γ) στον αριθμό πλευρικών ριζών των φυτών *A. thaliana* Col-0, σε απόσταση 3 cm (X_AD) από το ακρορρίζιο των φυτών αλλά και επί του ακρορριζίου (X_ORT). Οι ράβδοι αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο των μετρήσεων με τις τυπικές αποκλίσεις των τιμών (n= 12). Τα διαφορετικά γράμματα υποδεικνύουν τις στατιστικές σημαντικές διαφορές ($p < 0.05$) μεταξύ όλων των δειγμάτων μετά από την πραγματοποίηση Tukey's test.

Ο εμβολιασμός του βακτηρίου σε απόσταση από το ακρορρίζιο (X_AD), παρουσιάζει φυτά με μεγαλύτερο αριθμό και μήκος ριζικών τριχιδίων σε σχέση με τα φυτά που η εφαρμογή του βακτηρίου πραγματοποιήθηκε στο ακρορρίζιο (X_ORT). Ωστόσο, και στους δύο τύπους εφαρμογών, οι τιμές είχαν στατιστικώς σημαντική διαφορά με πολύ υψηλότερες τιμές σε σύγκριση με τα φυτά του μάρτυρα (Διαγρ. 3.9).



Διάγραμμα 3.9 Επίδραση του ριζοσφαιρικού βακτηρίου *P. carnis* X A) στον αριθμό και Β) στο μήκος των ριζικών τριχιδίων μετά την εφαρμογή του σε απόσταση 3 cm (X_AD) από το ακρορρίζιο των φυτών αλλά και επί του ακρορριζίου (X_ORT). Οι ράβδοι αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο μετρήσεων και τις τυπικές αποκλίσεις των τιμών (n= 12). Τα διαφορετικά γράμματα υποδεικνύουν στατιστικές σημαντικές διαφορές ($p < 0.05$) μεταξύ όλων των μεταχειρίσεων μετά από την πραγματοποίηση Tukey's test.

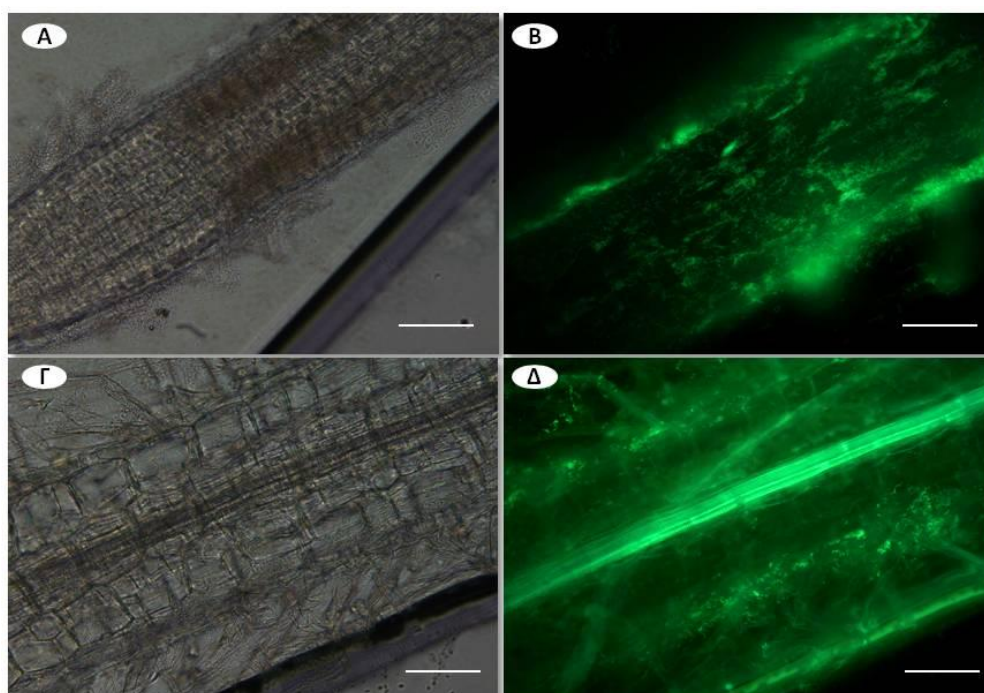
Το βακτηριακό στέλεχος *P. carnis* X μελετήθηκε στη συνέχεια για την επίδρασή των παραγόμενων πτητικών του ενώσεων (Volatile compounds, VOCs) στην ανάπτυξη του φυτού *A. thaliana*. Σύμφωνα με το διάγραμμα της Εικόνας 3.18, οι παραγόμενες πτητικές ενώσεις του ριζοσφαιρικού βακτηρίου αυξάνουν σημαντικά το ολικό νωπό βάρος των φυτών όσο και το εμβαδόν της φυλλικής επιφάνειάς τους.



Εικόνα 3.18 Επίδραση των πτητικών ενώσεων του *P. carnis* X A) στο ολικό νωπό βάρος και B) στο εμβαδόν φυλλικής επιφάνειας των φυτών *A. thaliana* Col-0. Οι ράβδοι αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο των μετρήσεων των φυτών με τις τυπικές αποκλίσεις των τιμών τους ($n=8$). Ο αστερίσκος υποδεικνύει τις στατιστικώς σημαντικές διαφορές ($p < 0.05$) μεταξύ της μεταχείρισης και του μάρτυρα (Control) μετά από την πραγματοποίηση T-test ανεξάρτητων δειγμάτων.

3.3.1.1 Αποικισμός της ρίζας των φυτών *A. thaliana* Col-0

Η ικανότητα αποικισμού του ριζοσφαιρικού βακτηρίου *P. carnis* X στις ρίζες του φυτού *A. thaliana* Col-0, παρατηρήθηκε μικροσκοπική, με την εφαρμογή του βακτηριακού στέλεχος *P. carnis* X::gfp και την παρατήρησή του σε οπτικό μικροσκόπιο εξοπλισμένο με κατάλληλο φίλτρο φθορισμού.



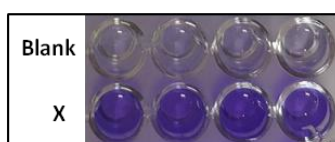
Εικόνα 3.19 Αποικισμός της ρίζας του φυτού *Arabidopsis thaliana* Col-0 από το ριζοσφαιρικό βακτήριο *P. carnis* X. Το βακτήριο παρατηρείται σε όλη την έκταση της ρίζας, με αυξημένο αριθμό κυττάρων να έχει συγκεντρωθεί στο ακρορρίζιο. Η μικροσκοπική παρατήρηση πραγματοποιήθηκε σε οπτικό μικροσκόπιο Olympus BX40 εξοπλισμένο με εξαρτήματα για παρατηρήσεις αντίθεσης φάσης (A και Γ) και με ενσωματωμένη λάμπα φθορισμού (B και Δ), ενώ οι εικόνες αποτυπώθηκαν με την ενσωματωμένη κάμερα Olympus DP71 (Κλίμακα: 20 μ m).

Οι Εικόνες 3.19A και 3.19Γ παρουσιάζουν την επιφάνεια της ρίζας μετά από μικροσκοπική παρατήρηση αντίθεσης φάσης, ενώ στις 3.19B και 3.19Δ αποτυπώνονται οι αντίστοιχες εικόνες με ενεργοποιημένη ωστόσο τη λάμπα φθορισμού του μικροσκοπίου. Όπως παρατηρείται και στην Εικόνα 3.19, ο εκτεταμένος αποικισμός της ρίζας του φυτού εντοπίζεται στο ακρορρίζιο (Εικ. 3.19A και Εικ. 3.23B), την επιφάνεια της ρίζας και τα

ριζικά τριχίδια (Εικ. 3.19Γ και Εικ. 3.19Δ), τόσο από μεμονωμένα βακτηριακά κύτταρα όσο και μαζί.

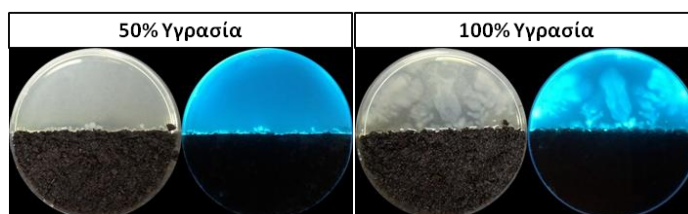
3.3.2 Ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου και κίνησης του βακτηρίου *P. carnis* X στο χώμα

Το ριζοσφαιρικό στέλεχος X μελετήθηκε στη συνέχεια για την ικανότητά του να επιτελεί δύο πολύ βασικούς μηχανισμούς, το σχηματισμό βιοϋμενίου (biofilm formation) και την ικανότητα κίνησης στο χώμα. Ο σχηματισμός βιοϋμενίου βοηθάει στην προσκόλληση των κυττάρων σε διάφορους ιστούς (πχ. στην επιφάνεια της ρίζας) με αποτέλεσμα τον επιτυχή αποικισμό των βακτηρίων σε φυτά. Η ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου πραγματοποιήθηκε σε πλαστικό δοχείο 96 πηγαδιών (96 well plate), ενώ με τη μέθοδο της φασματοφωτομετρίας, έγινε μέτρηση της οπτικής πυκνότητας των κυττάρων που προσκολλήθηκαν στα τοιχώματα κατά το σχηματισμό βιοϋμενίου (Εικ. 3.20).



Εικόνα 3.20 Ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου (biofilm formation) του *P. carnis* X σε πλαστικό δοχείο 96 πηγαδιών (96 well plate).

Η ικανότητα κίνησης των βακτηρίων από το αποστειρωμένο χώμα προς το θρεπτικό μέσο ανάπτυξης, προσομοιάζει την κίνηση του βακτηρίου στο έδαφος προς οποιαδήποτε πηγή θρέψης, όπως είναι τα εκκρίματα της ρίζας των φυτών. Για την καλύτερη οπτική παρατήρηση της κίνησης του βακτηρίου χρησιμοποιήθηκε το τεχνητά φθορίζον στέλεχος X::gfp. Όπως παρατηρείται και στην Εικόνα 3.25, ριζοσφαιρικό βακτήριο *P. carnis* X::gfp, κινείται κάθετα στο χώμα, με κατεύθυνση προς το θρεπτικό μέσο ανάπτυξης NA.



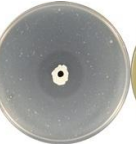
Εικόνα 3.21 Κίνηση του *P. carnis* X σε χώμα υγρασίας 50% και 100%. Η απεικόνιση των βακτηρίων πραγματοποιήθηκε 24 h μετά τον εμβολιασμό του βακτηρίου.

Η υγρασία του χώματος ρυθμίστηκε σε 50 % και 100 %, ενώ το θρεπτικό μέσο NA στερεοποιήθηκε με άγαρ 0,5 % w/v. Η μακροσκοπική παρατήρηση και απεικόνιση των βακτηρίων στο ορατό φάσμα αλλά και σε υπεριώδη ακτινοβολία πραγματοποιήθηκε 24 h μετά τον εμβολιασμό του βακτηρίου.

3.3.3 Μελέτη άμεσων και έμμεσων μηχανισμών που προάγουν την ανάπτυξη των φυτών (PGP traits)

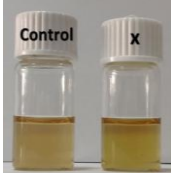
Το ριζοσφαιρικό βακτήριο *P. carnis* X μελετήθηκε ως προς την ικανότητά του να παράγει άμεσους και έμμεσους μηχανισμούς που επιδρούν στην ανάπτυξη των φυτών. Οι άμεσοι μηχανισμοί που μελετήθηκαν ήταν η ικανότητα απορρόφησης θρεπτικών στοιχείων που βρίσκονται σε δυσδιάλυτη μορφή, όπως είναι ο συμπλοκοποιημένος φώσφορος σε ίζημα φωσφορικού ασβεστίου $[Ca_3(PO_4)_2]$ και ο τρισθενής σίδηρος συμπλοκοποιημένος σε τριχλωριούχο σίδηρο (Cl_3Fe), η ικανότητα παραγωγής ακετοΐνης, αμμωνίας και της αυξητικής φυτοορμόνης IAA, καθώς και η ικανότητα παραγωγής κυτταρινολυτικών, πρωτεολυτικών και χιτινολυτικών ενζύμων.

Πίνακας 3.17 Άμεσοι και έμμεσοι μηχανισμοί που προάγουν την ανάπτυξη των φυτών (PGP) σε στερεό θρεπτικό μέσο ανάπτυξης.

	Διαλυτοποίηση φωσφόρου	Παραγωγή σιδηροφόρων	Παραγωγή κυτταρινάσης	Παραγωγή ουρεάσης	Παραγωγή χιτινάσης	Παραγωγή πρωτεάσης
						
<i>P. carnis</i> X	+	+	+	+	+	+

Όπως παρατηρείται και στον Πίνακα 3.17, το βακτήριο *P. carnis* X βρέθηκε θετικό σε όλα τα PGP- traits που μελετήθηκαν σε στερεό μέσο ανάπτυξης με την εμφάνιση είτε διάφανης (διαλυτοποίηση φωσφόρου, παραγωγή χιτινάσης και παραγωγή πρωτεάσης), είτε μεταχρωματισμένης άλω (παραγωγή σιδηροφόρων, παραγωγή κυτταρινάσης, παραγωγή ουρεάσης) γύρω από το σημείο εμβολιασμού του βακτηρίου.

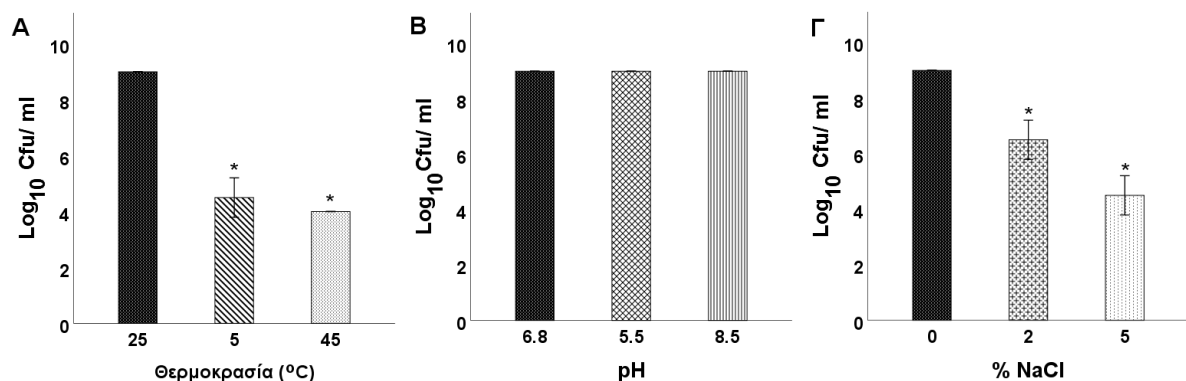
Πίνακας 3.18 Άμεσοι και έμμεσοι μηχανισμοί που προάγουν την ανάπτυξη των φυτών (PGP) σε υγρό θρεπτικό μέσο ανάπτυξης

	Παραγωγή Ακετοΐνης	Παραγωγή IAA	Παραγωγή αμμωνίας
			
<i>P. carnis</i> X	-	+	-

Όπως παρουσιάζεται και στις εικόνες του Πίνακα 3.18, το στέλεχος X βρέθηκε θετικό στην παραγωγή IAA με ροζ μεταχρωματισμό του υγρού μέσου ανάπτυξης, ενώ βρέθηκε αρνητικό στην παραγωγή ακετοΐνης και αμμωνίας.

3.3.4 Επιβίωση του *P. carnis* X σε ακραίες συνθήκες ανάπτυξης

Το ριζοσφαιρικό βακτήριο *P. carnis* X, εξετάστηκε ως προς την ικανότητά του να επιβιώνει σε ακραίες συνθήκες ανάπτυξης, όπως είναι οι ακραίες τιμές pH, οι υψηλές και χαμηλές θερμοκρασίες καθώς και σε θρεπτικό υπόστρωμα με υψηλή συγκέντρωση σε αλατότητα. Στα Διαγράμματα 3.10Α, 3.10Β και 3.10Γ, παρουσιάζεται η ικανότητα επιβίωσης των βακτηρίων με παρουσίαση της μέγιστης συγκέντρωσης των κυττάρων σε όλα τα υποστρώματα.

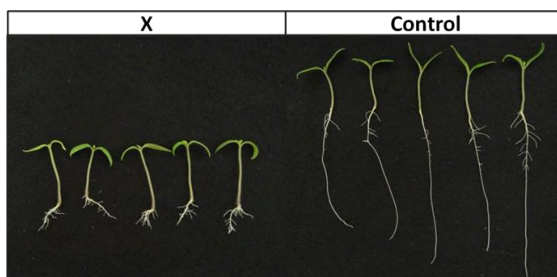


Διάγραμμα 3.10 Επιβίωση βακτηριακών κυττάρων του *P. carnis* X σε ακραίες τιμές θερμοκρασίας, pH και αλατότητας. Απεικόνιση συνολικού αριθμού βακτηριακών κυττάρων (Log₁₀ CFU/ml) σε συνάρτηση με την αντοχή στη θερμοκρασία (Α), το pH (Β) και την αλατότητα (Γ). Οι ράβδοι αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο του αριθμού των κυττάρων με τις τυπικές αποκλίσεις των τιμών (n= 4). Ο αστερίσκος υποδεικνύει τις στατιστικές σημαντικές διαφορές ($p < 0.05$) μεταξύ των μεταχειρίσεων και του μάρτυρα (Control) μετά από την πραγματοποίηση Dunnett's test.

Το βακτηριακό στέλεχος X, όπως παρουσιάζεται και στα παραπάνω διαγράμματα, εμφανίζει τις βέλτιστες συνθήκες ανάπτυξης του σε θερμοκρασία 25 °C, χωρίς επιπρόσθετο NaCl στο υπόστρωμα ανάπτυξης, ενώ δεν επηρεάζεται από τις διαφορετικές τιμές του pH. Τόσο οι ακραίες τιμές στη θερμοκρασία όσο και οι υψηλές συγκεντρώσεις σε αλατότητα, δυσχεραίνουν την επιβίωση των βακτηριακών κυττάρων, μειώνοντας σημαντικά τη συγκέντρωσή τους.

3.3.5 Εφαρμογή του βακτηρίου *P. carnis* X σε φυτά *Solanum lycopersicum* var. Chondrokatsari Messinias σε *in vitro* συνθήκες

Το βακτηριακό στέλεχος X μελετήθηκε σε επόμενο στάδιο για την επίδρασή του στη βλαστικότητα και τα μορφολογικά χαρακτηριστικά φυταρίων τομάτας (*Solanum lycopersicum*) σε *in vitro* συνθήκες. Η εφαρμογή του στους σπόρους τομάτας πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της βιο-κάλυψης των σπόρων (bio-priming).



Εικόνα 3.22 Φυτάρια τομάτας 8 ημερών μετά την εφαρμογή του ριζοσφαιρικού βακτηρίου *P. carnis* X στους σπόρους με τη μέθοδο bio-priming.

Στον Πίνακα 3.19 παρουσιάζεται η επίδραση των βακτηρίων στη βλαστικότητα των σπόρων την τρίτη (3 dpi) και τελικά την όγδοη ημέρα (8 dpi) από την ημέρα εμβολισμού των βακτηρίων. Το ριζοσφαιρικό στέλεχος X, με συγκέντρωση κυττάρων $\sim 10^5$ cfu/ φυτάριο, δεν επηρέασε σημαντικά τη βλαστικότητα των σπόρων, κινούμενη στις ίδιες τιμές με εκείνη των φυτών του μάρτυρα. Ωστόσο, η εφαρμογή του βακτηρίου επηρέασε σημαντικά τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των φυταρίων τομάτας. Στην Εικόνα 3.22 παρουσιάζεται η αλλαγή στη μορφολογία της ρίζας των φυταρίων τομάτας σε σχέση με τα φυτά που δεν είχαν εμβολιαστεί με το βακτήριο.

Πίνακας 3.19 Επίδραση του *P. carinis* X στη βλαστικότητα των σπόρων τομάτας, στο ολικό νωπό βάρος, στο μήκος της κεντρικής ρίζας, στο μήκος του βλαστού και στον αριθμό των πλευρικών ριζών των φυτών *Solanum lycopersicum* var. Chondrokatsari Messinias. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο των μετρήσεων ($n=40$) με τις τυπικές αποκλίσεις των τιμών. Ο αστερίσκος υποδεικνύει τις στατιστικές σημαντικές διαφορές ($p < 0.05$) μεταξύ της μεταχείρισης και του μάρτυρα μετά από την πραγματοποίηση T -test ανεξάρτητων δειγμάτων.

Επίδραση του <i>P. carnis</i> X σε φυτάρια τομάτας						
	Βλαστικότητα σπόρων (%)		Ολικό νωπό βάρος (mg)	Μήκος κεντρικής ρίζας (cm)	Μήκος βλαστού (cm)	Αριθμός πλευρικών ριζών (N)
	3 dpi	8dpi				
Μάρτυρας $\pm$ std	83,00 $\pm$ 1,00	91,6 $\pm$ 1,53	51,51 $\pm$ 5,54	7,93 $\pm$ 0,36	2,17 $\pm$ 1,17	10,15 $\pm$ 1,58
X $\pm$ std	84,33 $\pm$ 1,16	93,6 $\pm$ 1,53	51,54 $\pm$ 7,12	1,66 $\pm$ 0,29*	2,90 $\pm$ 0,20*	13,41 $\pm$ 1,63*

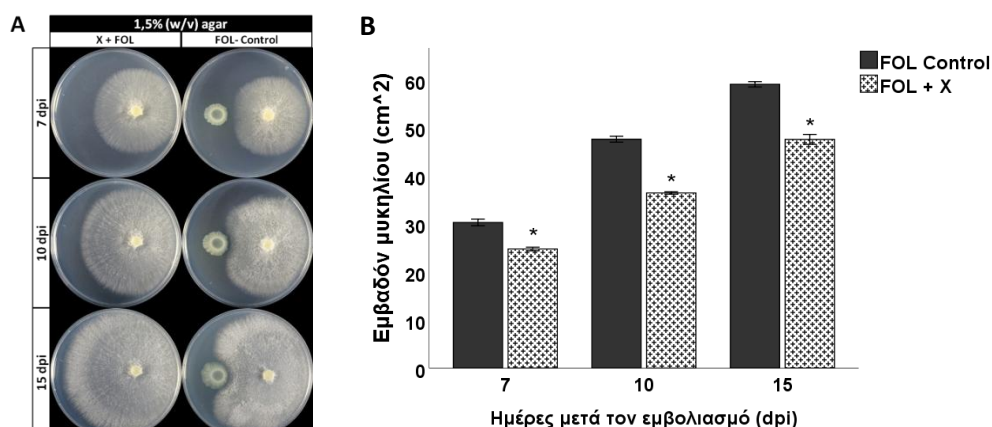
Συγκεκριμένα, όπως φαίνεται και στον Πίνακα 3.19 το μήκος της ρίζας των φυταρίων είναι κατά πολύ μικρότερο σε σύγκριση με εκείνο των φυτών του μάρτυρα. Την ίδια στιγμή μελετήθηκαν το ολικό νωπό βάρος, το μήκος του βλαστού καθώς και ο αριθμός των πλευρικών ριζών. Μετά από την πραγματοποίηση κατάλληλης στατιστικής μελέτης (T-test ανεξάρτητων δειγμάτων) στο πρόγραμμα στατιστικής ανάλυσης SPSS, βρέθηκε ότι το νωπό βάρος των φυτών δεν επηρεάστηκε σημαντικά με την εφαρμογή του ριζοσφαιρικού βακτηρίου. Αντίθετα, τόσο το μήκος του βλαστού όσο και ο αριθμός των πλευρικών ριζών των φυταρίων, αυξήθηκαν σημαντικά σε σύγκριση με τις τιμές των φυτών μαρτύρων.

3.3.6 Ανταγωνιστική δράση του ριζοσφαιρικού βακτηρίου *P. carnis* X εναντίον του φυτοπαθογόνου μύκητα *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*

Η *in vitro* ανταγωνιστική δράση του βακτηριακού στελέχους *P. carnis* X εναντίον πλήθους φυτοπαθογόνων μυκήτων (*Rhizoctonia solani*, *Botrytis cinerea*, *Phytophthora infestans*, *Fusarium oxysporum* και *Verticillium dahliae*), έχει μελετηθεί εκτενέστερα σε προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου. Έμφαση δόθηκε στη μελέτη της ανταγωνιστικότητας του βακτηρίου εναντίον του φυτοπαθογόνου μύκητα *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*, σημαντικό φυτοπαθογόνο του φυτού οικονομικής σημασίας *Solanum lycopersicum*. Η ανταγωνιστική δράση του ωφέλιμου ριζοσφαιρικού βακτηρίου μελετήθηκε με τη μέθοδο της διπλής καλλιέργειας (dual culture), τη μέθοδο αναθυμιάσης με χλωροφόρμιο (CHCl_3) (chloroform vapour method), τη μέθοδο της μικτής καλλιέργειας (mixed culture) και τη μέθοδο της ταυτόχρονης διπλής καλλιέργειας σε αντικειμενοφόρο πλάκα (dual culture in microscopic slides).

3.3.6.1 Μέθοδος της διπλής καλλιέργειας (dual culture)

Η ανταγωνιστική δράση του βακτηριακού στελέχους X εναντίον του φυτοπαθογόνου μύκητα *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* με τη μέθοδο της διπλής καλλιέργειας γίνεται ορατή με το σχηματισμό ζώνης παρεμπόδισης μεταξύ τους (Εικ. 3.23Α). Οι μακροσκοπικές παρατηρήσεις αποτυπώθηκαν στις 7, 10 και 15 ημέρες (dpi) μετά από τον ταυτόχρονο εμβολιασμό των μικροοργανισμών.

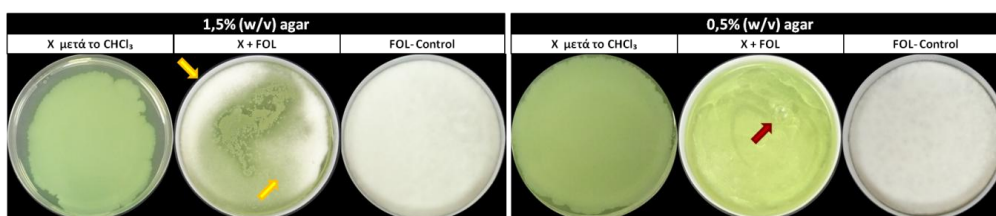


Εικόνα 3.23 Ανταγωνιστική δράση του *P. carnis* X εναντίον του *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*. με τη μέθοδο της διπλής καλλιέργειας (dual culture) Α) Αποτύπωση της ανταγωνιστικής δράσης των βακτηρίων στις 7, 10 και 15 ημέρες μετά τον ταυτόχρονο εμβολιασμό. Β) Εμβαδόν μυκηλίου του φυτοπαθογόνου μύκητα. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο των μετρήσεων με τις τυπικές αποκλίσεις των τιμών τους (n=6). Ο αστερίσκος υποδεικνύει τις στατιστικώς σημαντικές διαφορές ($p < 0.05$) μεταξύ της μεταχείρισης και του μάρτυρα (Control) ανά ημέρα παρατήρησης, μετά από την πραγματοποίηση T-test ανεξάρτητων δειγμάτων.

Στο διάγραμμα της Εικόνας 3.23B παρουσιάζεται η ανάπτυξη του μυκηλίου του φυτοπαθογόνου μύκητα μετά την εφαρμογή του βιολογικού παράγοντα, σε σύγκριση με τις μεταχειρίσεις του μάρτυρα και τις τρεις ημέρες παρατήρησης. Η εφαρμογή του *P. carnis* X είχε ως αποτέλεσμα τη σημαντική μείωση του εμβαδού του μυκηλίου και τις τρεις ημέρες παρατήρησης.

3.3.6.2 Μέθοδος αναθυμιάσης με χλωροφόρμιο (CHCl_3) (chloroform vapour method)

Σκοπός της μεθόδου ήταν η μελέτη της επίδρασης των διαχεόμενων στο μέσο ενώσεων του βακτηρίου *P. carnis* X στη βλαστικότητα των σπορίων και την ανάπτυξη του φυτοπαθογόνου μύκητα *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*. Στην Εικόνα 3.24 παρατηρείται η επίδραση των διαχεόμενων ενώσεων στην ανάπτυξη του φυτοπαθογόνου μύκητα.



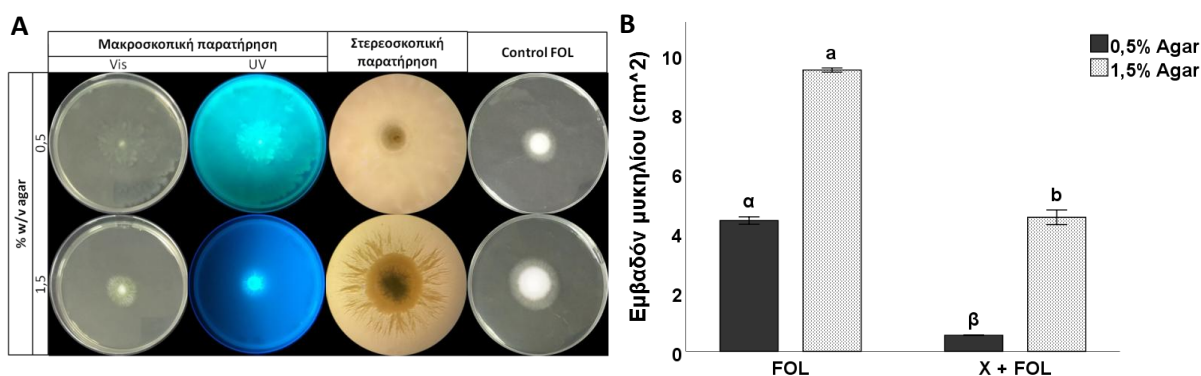
Εικόνα 3.24 Ανταγωνιστική δράση του *P. carnis* X εναντίον του *F. oxysporum* sp. με τη μέθοδο αναθυμιάσης με χλωροφόρμιο (Chloroform vapour method) σε στερεό θρεπτικό μέσο NA (1,5% (w/v) άγαρ και 0,5% (w/v) άγαρ. Παρουσίαση ανά μεταχείριση, του βακτηρίου μετά την εφαρμογή του CHCl_3 , της ανάπτυξη του μύκητα στα τρυβλία μετά την αναθυμιάση με CHCl_3 και του μύκητα μάρτυρα (Control).

Ο φυτοπαθογόνος μύκητας κατά την εφαρμογή του σε τρυβλία KB 0,5% (w/v) σε άγαρ, όπου είχε προηγουμένως εφαρμοσθεί το βακτηριακό στέλεχος X, κατάφερε να αναπτυχθεί ελάχιστα (κόκκινο βέλος), σε σύγκριση με το μύκητα μάρτυρα (Control). Σημαντική ήταν επίσης η παρεμπόδιση του φυτοπαθογόνου μύκητα κατά την εφαρμογή του στο τρυβλίο KB στερεοποιημένο με 1,5% (w/v) σε άγαρ. Η βλαστικότητα των σπορίων του μύκητα επηρεάστηκε σημαντικά και με τις δύο μεθόδους, με την ανάπτυξη του μύκητα να περιορίζεται στα τοιχώματα του τρυβλίου, όπου δεν έχουν εξαπλωθεί οι ενώσεις του βακτηρίου (κίτρινα βέλη).

3.3.6.3 Μέθοδος μικτής καλλιέργειας (Mixed culture)

Κατά τη μέθοδο της μικτής καλλιέργειας ο μύκητας με το βακτήριο αναμίχθηκαν σε υγρή καλλιέργεια σε αναλογία 1:1 (10^8 cfu/ ml βακτηρίου : 10^6 σπόρια/ ml μύκητα) και στη συνέχεια εμβολιάστηκαν σε θρεπτικό μέσο NA στερεοποιημένο με άγαρ 1,5 % (w/v) και 0,5 % (w/v). Για την καλύτερη παρατήρηση του βακτηρίου σε σχέση με το μύκητα χρησιμοποιήθηκε το τεχνητά φθορίζον βακτηριακό στέλεχος X::gfp, προκειμένου να γίνει η μακροσκοπική απεικόνιση στο ορατό φάσμα αλλά και υπό την έκθεση σε υπεριώδη

ακτινοβολία. Ταυτόχρονα, πραγματοποιήθηκε και στερεοσκοπική απεικόνιση των μεταχειρίσεων (Εικ. 3.25). Στην Εικόνα 3.29 παρατηρείται περιορισμός της εξάπλωσης του μύκητα σε θρεπτικό NA 0,5 % (w/v) σε άγαρ και πλήρης κάλυψη του μυκηλίου από το κινούμενο βακτηριακό στέλεχος X. Ταυτόχρονα και σε μικρότερο βαθμό, παρατηρείται παρεμπόδιση της εξάπλωσης του μυκηλίου στο θρεπτικό υπόστρωμα NA στερεοποιημένο με άγαρ 1,5 % (w/v). Σε κάθε περίπτωση είναι εμφανής η κάλυψη των μυκηλιακών υφών από τα κινούμενα βακτηριακά κύτταρα καθώς και η προσκόλλησή τους στις υφές του μύκητα.



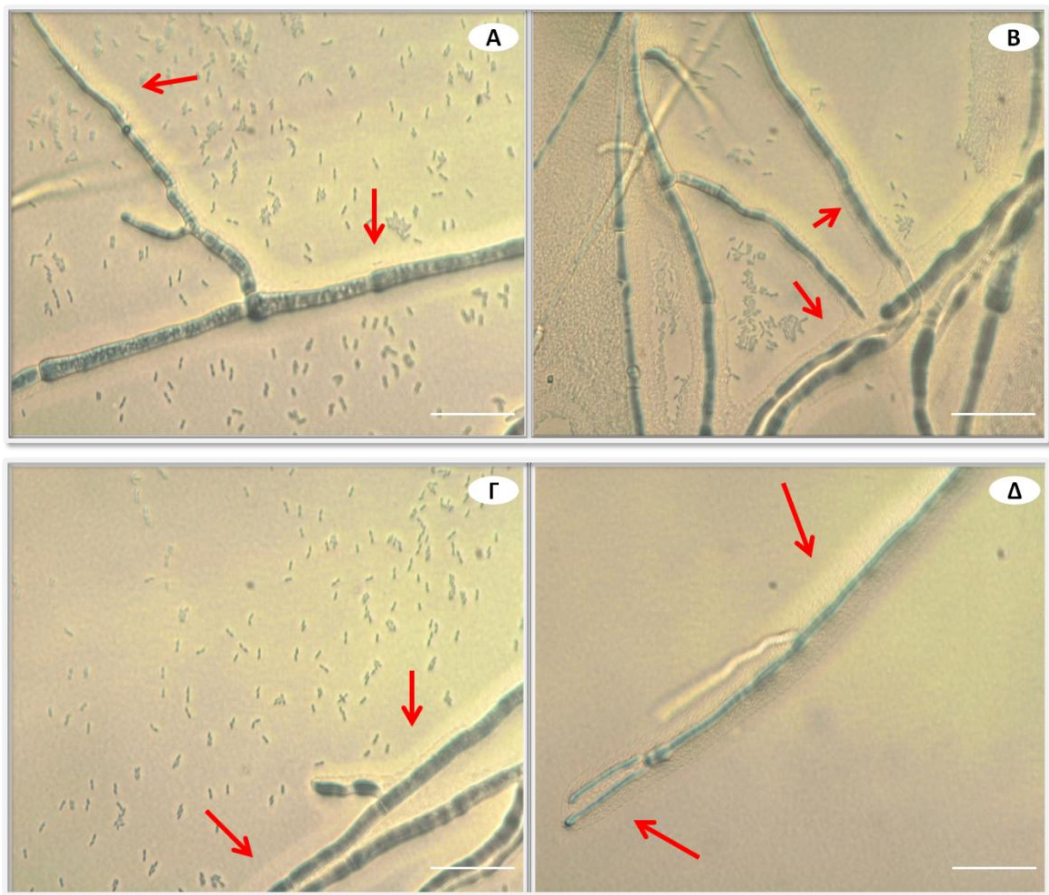
Εικόνα 3.25 Μικτή καλλιέργεια του τεχνητά φθορίζοντος βακτηρίου *P. carnis* X::gfp με τον φυτοπαθογόνο μύκητα *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*. A) Μακροσκοπική και στερεοσκοπική παρατήρηση της παρεμπόδισης του μύκητα 48 h από την εφαρμογή του βακτηρίου. B) Εμβαδόν του μυκηλίου του φυτοπαθογόνου μύκητα FOL μετά από την εφαρμογή του βακτηρίου *Ps. carnis* X. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο των μετρήσεων με τις τυπικές αποκλίσεις των τιμών. Τα διαφορετικά γράμματα (α-β και a-b) υποδεικνύουν στατιστικές σημαντικές διαφορές ($p < 0.05$) μεταξύ των τιμών ανά μεταχείριση, μετά από την πραγματοποίηση T-test ανεξάρτητων δειγμάτων.

Μετά από τη μέτρηση του εμβαδού ανάπτυξης του μυκηλίου για κάθε εφαρμογή, πραγματοποιήθηκε ANOVA ανάλυση στο πρόγραμμα στατιστικής ανάλυσης SPSS (25.0). Ο εμβολιασμός του μίγματος των μικροοργανισμών τόσο σε NA 1,5 % (w/v) άγαρ όσο και σε NA 0,5 % (w/v) άγαρ, είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση του εμβαδού εξάπλωσης του μύκητα σε σύγκριση με το μύκητα της μεταχείρισης του μάρτυρα (Control), όπως παρατηρείται στο διάγραμμα της Εικόνας 3.25.

3.3.6.3.1 Μικροσκοπική παρατήρηση της κάλυψης των υφών του μύκητα *F. oxysporum* sp. από το ριζοσφαιρικό βακτήριο *P. carnis* X

Μετά την ολοκλήρωση της μακροσκοπικής και στερεοσκοπικής παρατήρησης της μικτής καλλιέργειας του βακτηρίου *P. carnis* X με το μύκητα *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*, πραγματοποιήθηκε κατάλληλη μικροσκοπική παρατήρηση των δειγμάτων. Τα δείγματα που παρατηρήθηκαν ήταν η μικτή καλλιέργεια του βακτηρίου με το μύκητα σε θρεπτικό μέσο NA με 1,5% (w/v) σε άγαρ. Στην Εικόνα 3.26 παρατηρείται η εξάπλωση του βακτηρίου γύρω από τις υφές του μύκητα καθώς και η προσκόλλησή των κυττάρων του πάνω στις υφές με τη δημιουργία βιοϋμενίου. Οι μικροσκοπικές εικόνες συμβαδίζουν με τις μακροσκοπικές και

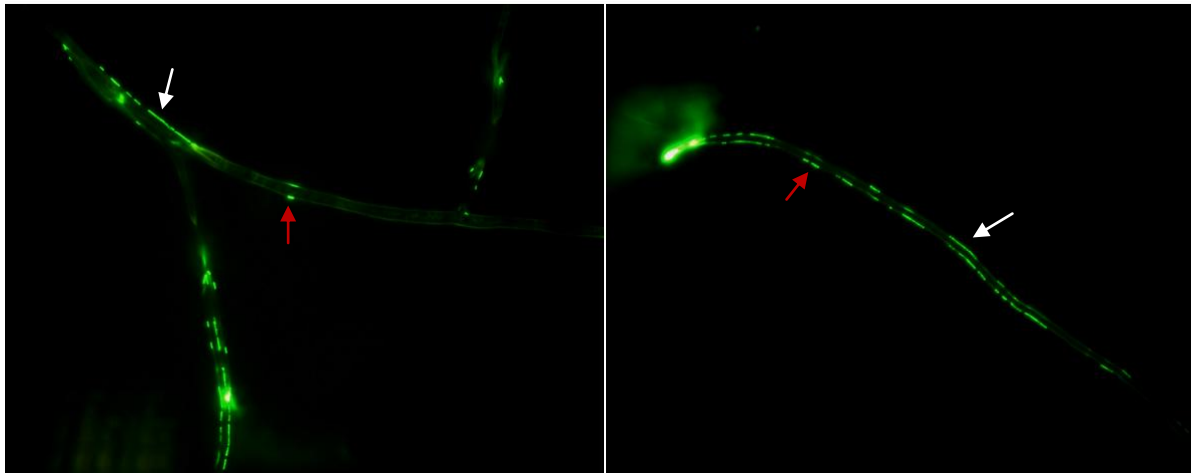
στερεοσκοπικές παρατηρήσεις όπου το βακτήριο έχει καλύψει τις υφές του φυτοπαθογόνου μύκητα και κινείται περιμετρικά των υφών του.



Εικόνα 3.26 Βιολογικός έλεγχος του *P. carnis* X εναντίον του φυτοπαθογόνου μύκητα *F. oxysporum* f.sp. lycopersici μετά από ταυτόχρονη διπλή καλλιέργεια *in vitro*. Στις Α και Β τα κόκκινα βέλη δείχνουν τα swarming βακτηριακά κύτταρα καθώς και το σχηματισμό βιοϋμενίου (biofilm) γύρω από τις μυκηλιακές υφές (κλίμακα: 50 μ m). Τα δείγματα παρατηρήθηκαν σε οπτικό μικροσκόπιο Olympus BX40 και οι εικόνες καταγράφηκαν με στην ψηφιακή κάμερα Olympus DP71.

3.3.6.3.2 Μικροσκοπική παρατήρηση σε μικροσκόπιο φθορισμού

Το τεχνητά φθορίζον βακτηριακό στέλεχος *P. carnis* X::gfp που μελετήθηκε εναντίον του *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* με την τεχνική της μικτής καλλιέργειας *in vitro*, παρατηρήθηκε στη συνέχεια σε οπτικό μικροσκόπιο φθορισμού. Η μικροσκοπική παρατήρηση σε μικροσκόπιο φθορισμού του ριζοσφαιρικού βακτηρίου *P. carnis* X::gfp εναντίον του φυτοπαθογόνου μύκητα *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*, παρουσιάζει την έντονη προσκόλληση των βακτηριακών κυττάρων στις υφές του μύκητα (Εικ. 3.27). Η προσκόλληση των κυττάρων στις υφές του μύκητα παρατηρείται σε όλη την έκταση αυτών, είτε ως μεμονωμένα κύτταρα (κόκκινα βέλη), είτε ως αλυσίδα κυττάρων (λευκά βέλη).

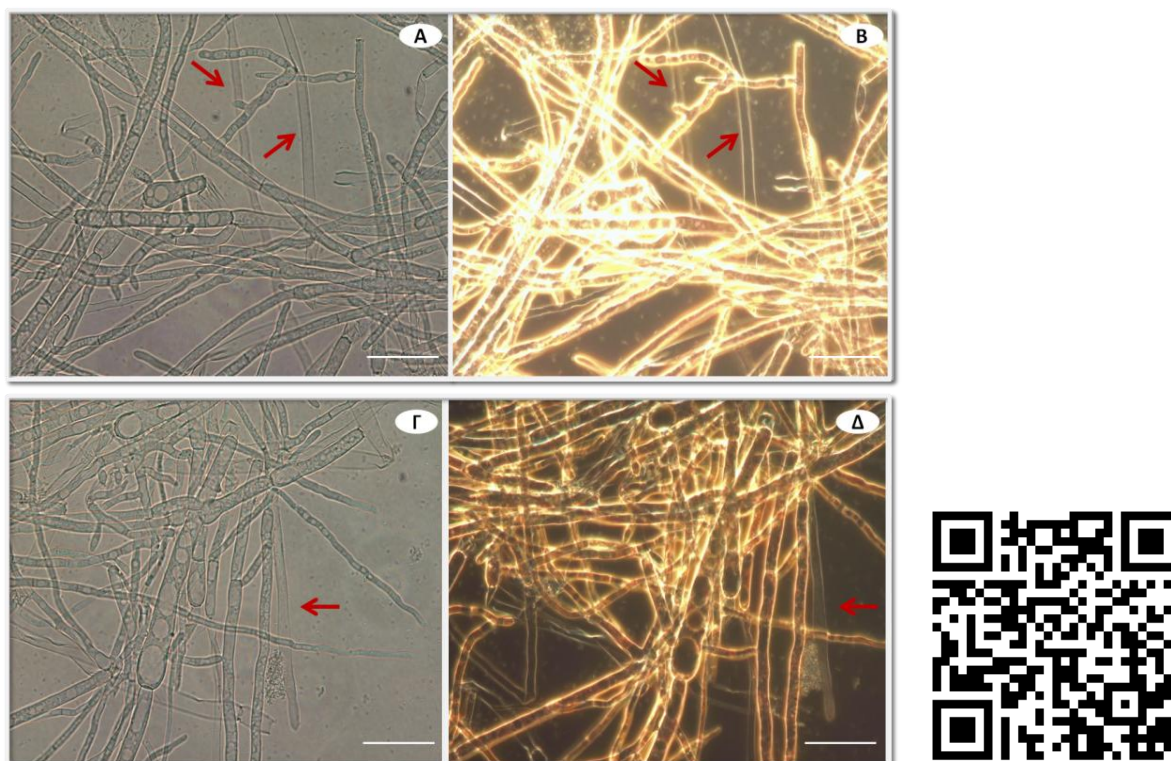


Εικόνα 3.27 Μικροσκοπική παρατήρηση του τεχνητά φθορίζοντος βακτηριακού στελέχους *P. carnis* X::gfp εναντίον του μύκητα *Fusarium oxysporum* sp. σε οπτικό μικροσκόπιο Olympus BX40 με ενσωματωμένα φίλτρα φθορισμού. Προσκόλληση του βακτηρίου στις υφές του μύκητα είτε ως μεμονωμένα κύτταρα (κόκκινο βέλος) είτε ως αλυσίδα κυττάρων (λευκό βέλος).

3.3.6.3.3 Μικροσκοπική παρατήρηση αντίθεσης φάσης και σκοτεινού πεδίου

Το τεχνητά φθορίζον βακτηριακό στέλεχος *P. carnis* X::gfp που μελετήθηκε εναντίον του *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* με την τεχνική της μικτής καλλιέργειας *in vitro*, παρατηρήθηκε στη συνέχεια σε οπτικό μικροσκόπιο Olympus BX40 με ενσωματωμένα εξαρτήματα για παρατηρήσεις αντίθεσης φάσης και σκοτεινού πεδίου. Οι εικόνες αποτυπώθηκαν με την ενσωματωμένη κάμερα του μικροσκοπίου Olympus DP071. Στην παρακάτω εικόνα (Εικ. 3.28) παρατηρούνται υφές του μύκητα στο μικροσκόπιο αντίθεσης φάσης (Α και Γ) σε αντιπαραβολή με την απεικόνισή τους σε σκοτεινού πεδίου (Β και Δ). Στην παρατήρηση σκοτεινού πεδίου φωτίζουν τα κυτταρικά τοιχώματα και τα κάθετα διαφράγματα (septa) των ζωντανών υφών του μύκητα, ενώ υπάρχουν υφές οι οποίες δεν φωτίζουν και ταυτόχρονα δεν παρουσιάζουν septa (κόκκινα βέλη). Οι αντίστοιχες απεικονίσεις σε φίλτρο αντίθεσης φάσης (Εικ. 3.28Α και 3.28Γ), παρουσιάζουν αυτές τις υφές αποχρωματισμένες και με εμφανή έλλειψη των κάθετων διαφραγμάτων. Το QR code παραπέμπει σε video που αποτυπώνει την

εισβολή και κίνηση του βακτηρίου *X::gfp* εντός της μυκηλιακής υφής που δείχνει το κόκκινο βέλος στις Εικόνες 3.28Γ και 3.28Δ. Τα βακτηριακά κύτταρα κινούνται παλινδρομικά, σε όλο το μήκος της υφής και συσσωρεύονται προς την άκρη, χωρίς να εξέρχονται από αυτή.

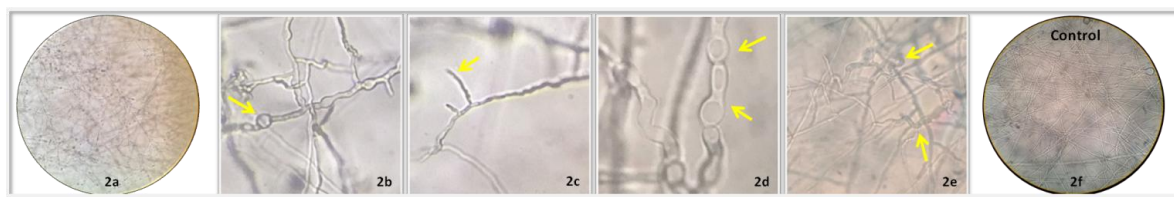


Εικόνα 3.28 Μικροσκοπική παρατήρηση του τεχνητά φθορίζοντος βακτηριακού στελέχους *P. carnis X::gfp* εναντίον του μύκητα *F. oxysporum* sp.. Απεικόνιση νεκρής υφής (κόκκινα βέλη). Η μικροσκοπική παρατήρηση πραγματοποιήθηκε σε οπτικό μικροσκόπιο με ενσωματωμένα εξαρτήματα για παρατηρήσεις αντίθεσης φάσης (Α και Γ), και σκοτεινού πεδίου (Β και Δ). Το QR code αποτυπώνει την εισβολή και κίνηση των βακτηρίων εντός της υφής του μύκητα (κόκκινο βέλος) στις εικόνες Γ και Δ (Κλίμακα 10 μm).

3.3.6.4 Μέθοδος της ταυτόχρονης διπλής καλλιέργειας σε αντικειμενοφόρο πλάκα

Για την καλύτερη μικροσκοπική παρατήρηση της επίδρασης του ριζοσφαιρικού στελέχους *X* στη ζωτικότητα και μορφολογία του μύκητα *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*, οι δύο μικροοργανισμοί αναπτύχθηκαν με τη μέθοδο της ταυτόχρονης διπλής καλλιέργειας σε αντικειμενοφόρο πλάκα. Η μικροσκοπική παρατήρηση πραγματοποιήθηκε σε οπτικό μικροσκόπιο Olympus BX40, ενώ οι εικόνες καταγράφηκαν με την ενσωματωμένη στο μικροσκόπιο ψηφιακή κάμερα Olympus DP71.

Όπως παρατηρείται στην Εικόνα 3.29, το βακτήριο επηρέασε τη μορφολογία των μυκηλιακών υφών με την εμφάνιση πρώιμων διακλαδώσεων (2a), τη συρρίκνωση των απολήξεων των υφών (2c), την εμφάνιση κενотоπιών και διογκωμένων υφών (2d, 2b), καθώς και το σχηματισμό καρουλιασμένων υφών (2e). Κανένα από τα παραπάνω μορφολογικά χαρακτηριστικά δεν εμφανίστηκαν στο μάρτυρα (2f).



Εικόνα 3.29 Μορφολογικές αλλαγές των υφών του μύκητα *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* μετά από την ταυτόχρονη διπλή καλλιέργεια σε αντικειμενοφόρο πλάκα με τον βιολογικό παράγοντα *P. carnis* X. 2a) πρώιμες διακλαδώσεις, 2b) διογκωμένες υφές, 2c) συρρικνωμένες απολήξεις υφών, 2d) εμφάνιση κενοτοπιών, 2e) καρουλιασμένες υφές και 2f) Μάρτυρας (Control). Η παρατήρηση πραγματοποιήθηκε σε οπτικό μικροσκόπιο κλίμακας 1000um.

3.3.6.4.1 Χρώση ζωτικότητας των μυκηλιακών υφών με τη χρωστική Evans Blue

Η επίδραση του βακτηρίου στη ζωτικότητα του μύκητα επιβεβαιώθηκε με την πραγματοποίηση κατάλληλης χρώσης. Η χρωστική Evans Blue που χρησιμοποιήθηκε έχει την ικανότητα να χρωματίζει τις νεκρές υφές του μύκητα μπλε, ενώ οι ζωντανές υφές δεν χρωματίζονται. Στην Εικόνα 3.30 παρατηρείται ο μπλε χρωματισμός των υφών του *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*, αποδεικνύοντας τον ισχυρισμό ότι τα βακτήρια τελικά επιδρούν αρνητικά στη ζωτικότητα του μύκητα.



Εικόνα 3.30 Χρώση ζωτικότητας με τη χρώση Evans Blue. Μετά την αλληλεπίδραση του *P. carnis* X με τον *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*, οι υφές του χρωματίστηκαν μπλε μετά την εφαρμογή της χρωστικής αποδεικνύοντας την επίδραση του βακτηρίου στη ζωτικότητα του μύκητα (κλίμακας 1000 um).

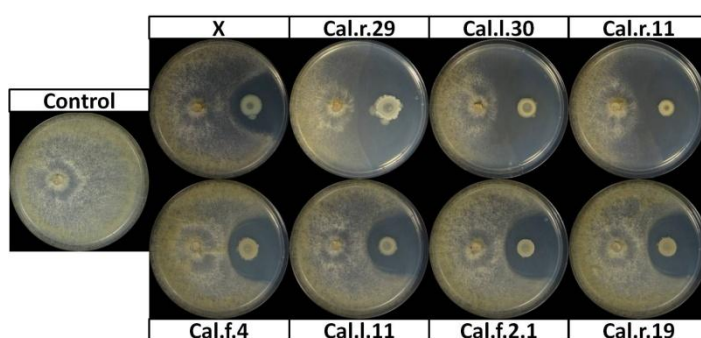
3.4 Περαιτέρω μελέτη της ανταγωνιστικής δράσης των επιλεγμένων ενδοφυτικών βακτηρίων Cal.r.29, Cal.l.30, Cal.f.4, Cal.f.2.1, Cal.r.11, Cal.l.11 και Cal.r.19 και του ριζοσφαιρικού βακτηρίου *P. carnis* X

3.4.1 Βιολογική αντιμετώπιση του φυτοπαθογόνου μύκητα *Botrytis cinerea* από επιλεγμένα βακτηριακά στελέχη σε *in vitro* και *in vivo* συνθήκες

Τα επιλεγμένα ενδοφυτικά στελέχη Cal.r.29, Cal.l.30, Cal.f.4, Cal.f.2.1, Cal.r.11, Cal.l.11 και Cal.r.19, καθώς και το ανταγωνιστικό ριζοσφαιρικό βακτήριο *P. carnis* X, μελετήθηκαν στη συνέχεια εναντίον του φυτοπαθογόνου μύκητα *Botrytis cinerea*. Ο βιολογικός έλεγχος του φυτοπαθογόνου μύκητα πραγματοποιήθηκε με την *in vitro* μέθοδο της ταυτόχρονης διπλής καλλιέργειας (dual culture) και την *in vivo* μέθοδο της εφαρμογής των βακτηρίων αλλά και του φυτοπαθογόνου μύκητα σε καρπούς τομάτας (detached fruit assay), ποικιλίας Lobello.

3.4.1.1 Ανταγωνιστική δράση με τη μέθοδο της ταυτόχρονης διπλής καλλιέργειας *in vitro*

Τα επιλεγμένα ανταγωνιστικά ενδοφυτικά βακτηριακά στελέχη καθώς και το ριζοσφαιρικό βακτήριο *P. carnis* X παρουσιάζουν σημαντική βιολογική προστασία, αναχαιτίζοντας το φυτοπαθογόνο μύκητα σε *in vitro* συνθήκες. Όπως παρουσιάζεται και στην Εικόνα 3.31, τα ανταγωνιστικά στελέχη δημιουργούν μια έντονη ζώνη παρεμπόδισης, περιορίζοντας σημαντικά την εξάπλωση του μυκηλίου.



Εικόνα 3.31 Ανταγωνιστική δράση των βακτηρίων εναντίον του φυτοπαθογόνου μύκητα *Botrytis cinerea* με τη μέθοδο της διπλής καλλιέργειας (dual culture).

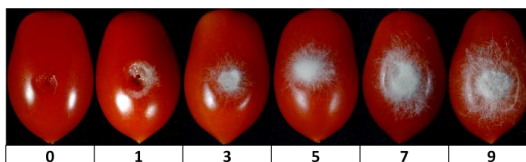
Όπως παρουσιάζεται και στον Πίνακα 3.20, το βακτηριακό στέλεχος Cal.r.29 εμφανίζει το μεγαλύτερο ποσοστό παρεμπόδισης του παθογόνου μύκητα με ποσοστό 48,94%. Ισχυρή παρεμπόδιση παρουσιάζουν και τα στελέχη Cal.r.11 και Cal.l.30 με ποσοστά 39,02% και 39,18%, ενώ ακολουθεί με ποσοστό 24,49% το ανταγωνιστικό ενδοφυτικό βακτήριο Cal.f.4.

Τέλος, τα στελέχη Cal.l.11, Cal.f.2.1, Cal.r.19 και X εμφανίζουν το μικρότερο ποσοστό παρεμπόδισης, συγκριτικά με τα υπόλοιπα στελέχη.

3.4.1.2 Ανταγωνιστική δράση εναντίον του φυτοπαθογόνου μύκητα *Botrytis cinerea* σε καρπούς τομάτας *in vivo* (detached fruit assay)

Από την *in vivo* εφαρμογή των ανταγωνιστικών βακτηριακών στελεχών σε καρπούς τομάτας, παρατηρείται μειωμένος αριθμός μολυσμένων καρπών, σε σύγκριση με τους καρπούς του μάρτυρα (Control) (εφαρμογή μόνο του *Botrytis cinerea*) (Πίν. 3.19). Το χαμηλότερο ποσοστό μολυσμένων καρπών εμφανίζουν οι μεταχειρίσεις με τα ενδοφυτικά στελέχη Cal.f.4 και Cal.r.29 με ποσοστό 13,33% και 15,0% αντίστοιχα, με το αμέσως επόμενο βακτήριο να είναι το Cal.l.30, παρουσιάζοντας συνολικό ποσοστό μολυσμένων καρπών στο 25,0%. Οι μεταχειρίσεις με το βακτηριακό στέλεχος Cal.r.11, όσο και με τα στελέχη Cal.f.2.1, Cal.l.11 και X, παρουσιάζουν πιο υψηλά ποσοστά μολυσματικότητας. Η εφαρμογή με το Cal.r.11 εμφανίζει ποσοστό 31,67%, ενώ ακολουθούν τα στελέχη Cal.f.2.1 και *P. carnis* X με ποσοστό 35 % και τέλος το Cal.l.11 με ποσοστό 36,67%. Τέλος, το υψηλότερο ποσοστό μολυσματικότητας με τιμή 38,33%, εμφανίζει η μεταχείριση με το βακτηριακό στέλεχος Cal.r.19. Παρά τη διαφοροποίηση μεταξύ των μεταχειρίσεων, όλα τα στελέχη διατηρούν το ποσοστό μολυσματικότητας του μύκητα σε πολύ χαμηλό ποσοστό, σε σύγκριση με τη μεταχείριση του μάρτυρα όπου το ποσοστό μολυσματικότητας ήταν 91,67%.

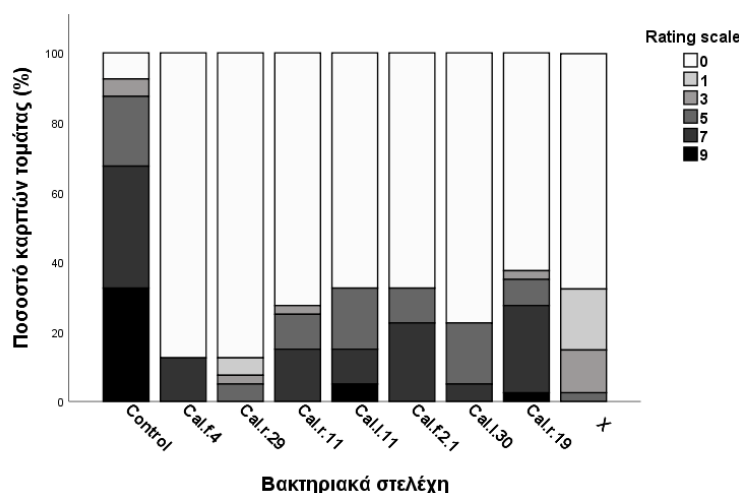
Ταυτόχρονα με τη μείωση του συνολικού αριθμού μολυσμένων καρπών μετά την εφαρμογή των ανταγωνιστικών βακτηρίων, μειώθηκε και το εμβαδόν κάλυψης των καρπών από το φυτοπαθογόνο μύκητα. Όπως παρουσιάζεται και στην Εικόνα 3.32, από την εφαρμογή των βακτηρίων προέκυψε μια διαβαθμισμένη εξάπλωση του φυτοπαθογόνου μύκητα στους μελετώμενους καρπούς. Ως αποτέλεσμα αυτής της εξάπλωσης, είναι ο υπολογισμός της σοβαρότητας της ασθένειας (Disease severity, DS), εκφρασμένη σε ποσοστιαία διαβαθμισμένη κλίμακα (Rating scale) με τιμές: 0= υγιής καρπός, 1= 1-10 %, 3= 11-25 %, 5= 26-50 %, 7= 51-75 % και 9= > 75 %.



Εικόνα 3.32 Κλίμακα διαβάθμισης της σοβαρότητας της ασθένειας του φυτοπαθογόνου μύκητα *B. cinerea* μετά την εφαρμογή των ανταγωνιστικών βακτηρίων με τη μέθοδο detached fruit assay σε καρπούς τομάτας.

Με γνώμονα την παραπάνω κλίμακα διαβάθμισης της ασθένειας υπολογίζεται το ποσοστό των καρπών που ανήκουν σε κάθε τιμή της κλίμακας, για κάθε μεταχείριση ξεχωριστά

(Διαγρ. 3.11). Η σοβαρότητα της ασθένειας μειώθηκε σημαντικά κατά την εφαρμογή όλων των βακτηριακών στελεχών.



Διάγραμμα 3.11 Ποσοστό καρπών ανά τιμή της κλίμακας βαθμολόγησης της σοβαρότητας της ασθένειας του φυτοπαθογόνου μύκητα *B. cinerea* μετά την εφαρμογή των ανταγωνιστικών βακτηρίων σε καρπούς τομάτας.

Τα στελέχη που εμφανίζουν το μεγαλύτερο ποσοστό μολυσμένων καρπών στις τιμές 7 και 9 της διαβαθμισμένης κλίμακας σοβαρότητας της ασθένειας, είναι τα στελέχη Cal.r.19 και Cal.f.2.1, με ποσοστά 23,33% και 20,0%, αντίστοιχα. Την ίδια στιγμή το συνολικό ποσοστό των μολυσμένων καρπών της μεταχείρισης του μάρτυρα είναι 68,33%. Αξιοσημείωτα αποτελέσματα παρουσιάζουν το ενδοφυτικό στέλεχος Cal.r.29 και το ριζοσφαιρικό στέλεχος X, τα οποία στις τιμές 7 και 9 της κλίμακας διαβάθμισης της σοβαρότητας της ασθένειας, εμφανίζουν μηδενικό αριθμό μολυσμένων καρπών (Διαγρ. 3.11).

Πίνακας 3.20 Βιολογική αντιμετώπιση του φυτοπαθογόνου μύκητα *Botrytis cinerea* μετά την εφαρμογή των ανταγωνιστικών βακτηρίων με την *in vivo* μέθοδο detached fruit assay σε καρπούς τομάτας και την *in vitro* μέθοδο dual culture. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο των μετρήσεων με τις τυπικές αποκλίσεις των τιμών τους. Τα διαφορετικά γράμματα σε κάθε περίπτωση υποδεικνύουν τις στατιστικώς σημαντικές διαφορές ($p < 0.05$) μεταξύ των μεταχειρίσεων, μετά από την πραγματοποίηση Tukey's test.

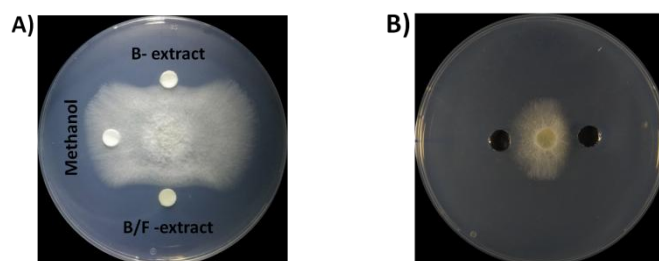
Βιολογική αντιμετώπιση του <i>Botrytis cinerea</i>			
Βακτηριακά στελέχη	Μέθοδος detached fruit assay σε καρπούς τομάτας <i>in vivo</i>		Μέθοδος διπλής καλλιέργειας <i>in vitro</i>
	Δείκτης σοβαρότητας ασθένειας (%)	Ένταση ασθένειας (%)	Παραμπόδιση του μυκηλίου (%)
Μάρτυρας	72,52 ± 3,61a	91,67 ± 2,89a	-
Cal.f.4	12,85 ± 2,57b	13,33 ± 2,89c	24,49 ± 0,73c
Cal.r.29	11,49 ± 1,50b	15,00 ± 5,00c	48,94 ± 0,47a
Cal.r.11	23,66 ± 1,32cd	31,67 ± 7,64b	39,02 ± 0,82d
Cal.l.11	22,85 ± 0,66cd	36,67 ± 7,64b	21,75 ± 1,21b
Cal.f.2.1	29,28 ± 3,98d	35,00 ± 5,00b	22,05 ± 2,19b
Cal.l.30	17,49 ± 1,79bc	25,00 ± 5,00bc	39,18 ± 0,71d
Cal.r.19	30,53 ± 1,63d	38,33 ± 2,89b	20,45 ± 0,33b
X	17,67 ± 5,24bc	35,00 ± 5,00b	21,66 ± 0,28b

Όπως παρουσιάζεται και στον Πίνακα 3.20 η εφαρμογή των ανταγωνιστικών βακτηρίων μειώνει σε σημαντικό βαθμό το δείκτη της σοβαρότητας της ασθένειας (Disease Severity

Index, DSI), για όλες τις μεταχειρίσεις. Τα ενδοφυτικά βακτηριακά στελέχη Cal.r.29, Cal.l.30, Cal.f.4 καθώς και το ριζοσφαιρικό βακτήριο *P. carnis* X ξεχωρίζουν έναντι των υπολοίπων, με τις τιμές 11,49%, 17,49% 12,85% και 17,67% αντίστοιχα, να είναι οι χαμηλότερες (Πίν. 3.19). Ακολουθούν τα στελέχη Cal.r.11 και Cal.l.11 με τις ενδιάμεσες τιμές 22,85% και 23,66%, αντίστοιχα. Τέλος, ο δείκτης σοβαρότητας της ασθένειας για τα στελέχη Cal.f.2.1 και Cal.r.19 είναι ο υψηλότερος σε σύγκριση σε τις υπόλοιπες εφαρμογές, εμφανίζοντας ποσοστά 29,28% και 30,53% αντίστοιχα. Σε κάθε περίπτωση ωστόσο, όλες οι μεταχειρίσεις παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική μείωση της σοβαρότητας της ασθένειας σε σύγκριση με το μάρτυρα (Control), όπου η σοβαρότητα της ασθένειας κυμαίνεται στο 72,52%.

3.4.2 Απομόνωση αντιβιοτικών ενώσεων που παράγονται εναντίον του φυτοπαθογόνου μύκητα *Botrytis cinerea* και διαχωρισμός τους με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC)

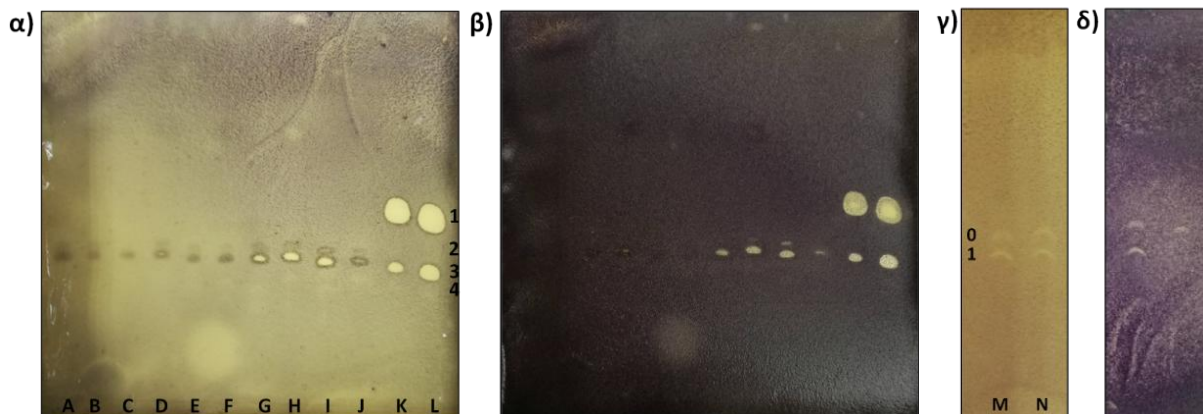
Τα ενδοφυτικά στελέχη Cal.r.19, Cal.r.29, Cal.f.4, Cal.l.11, Cal.l.30 και Cal.r.11, καθώς και το ριζοσφαιρικό βακτηριακό στέλεχος *P. carnis* X εμβολιάστηκαν εναντίον του φυτοπαθογόνου μύκητα *Botrytis cinerea* με σκοπό την απομόνωση των ακατέργαστων αντιμικροβιακών τους ενώσεων. Η απομόνωση των ενώσεων που εκκρίνονται από τα ανταγωνιστικά στελέχη πραγματοποιήθηκε από στερεό θρεπτικό μέσο ανάπτυξης, τόσο από το μέτωπο των βακτηρίων κατά τη μεμονωμένη εφαρμογή τους, όσο και από την ενδιάμεση ζώνης παρεμπόδισης η οποία δημιουργείται μεταξύ του φυτοπαθογόνου μύκητα και του βακτηρίου. Όπως παρατηρείται και στην Εικόνα 3.33 οι ενώσεις που απομονώθηκαν τόσο από το μέτωπο των βακτηρίων (B- extract) όσο και από τη ζώνη μεταξύ του παθογόνου μύκητα και του βακτηρίου (B/F- extract), ανακόπτουν την ακτινωτή ανάπτυξη του φυτοπαθογόνου μύκητα, δημιουργώντας μια ισχυρή ζώνη παρεμπόδισης. Ο φυτοπαθογόνος μύκητας διαπερνά το διηθητικό χαρτί στο οποίο έχει γίνει η προσθήκη methanol και λειτουργεί ως αρνητικός μάρτυρας.



Εικόνα 3.33 Έλεγχος της αντιβιοτικής δράσης των απομονωμένων ακατέργαστων ενώσεων. Α) Οι ενώσεις απομονώθηκαν από το μέτωπο των βακτηρίων (B- extract) καθώς και από τη ζώνη παρεμπόδισης μεταξύ του παθογόνου μύκητα και των βακτηρίων (B/F- extract). Ως αρνητικός μάρτυρας εφαρμόσθηκε σε διηθητικό χαρτί methanol. Β) Οι ενώσεις που απομονώθηκαν από τη ζώνη παρεμπόδισης μεταξύ του παθογόνου μύκητα και των βακτηρίων X (α) και Cal.r.29 (β).

Οι ακατέργαστες αντιμικροβιακές ενώσεις που απομονώθηκαν διαχωρίστηκαν στη συνέχεια σε αναλυτική κλίμακα με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (Thin-layer chromatography, TLC) (Εικ. 3.33Α). Ο διαχωρισμός των ενώσεων του ακατέργαστου μίγματος βασίζεται στην πολικότητα τους. Οι πιο πολικές ενώσεις (φωσφολιπίδια) προσροφούνται ισχυρότερα στο προσροφητικό μέσο και κατά συνέπεια μετατοπίζονται έχοντας μικρότερο παράγοντα υστέρησης (Retardation factor, R_f) σε σχέση με τις λιγότερο πολικές ενώσεις. Ως R_f ορίζεται ο λόγος της απόστασης που έχει διανύσει μια ένωση στην πλάκα TLC προς την απόσταση που έχει διανύσει ο διαλύτης από το σημείο τοποθέτησης του δείγματος. Όπως παρατηρείται και στην Εικόνα 3.34, το μίγμα ενώσεων που απομονώθηκε

από κάθε βακτηριακό στέλεχος διαχωρίστηκε σε αρκετά κλάσματα με βάση την πολικότητά τους. Προκειμένου να επαληθευθεί η αντιβιοτική δράση των διαχωρισμένων ενώσεων, εφαρμόστηκε στην TLC πλάκα η μέθοδος bioautography assay, κατά την οποία γίνεται εφαρμογή σπορίων του μύκητα *Botrytis cinerea* με τη μέθοδο της διπλής στιβάδας.



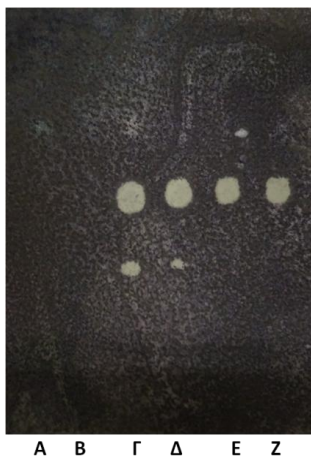
Εικόνα 3.34 Έλεγχος της βιοδραστικότητας των ακατέργαστων αντιβιοτικών ενώσεων των ενδοφυτικών βακτηρίων εναντίον του φυτοπαθογόνου μύκητα *Botrytis cinerea* με τη μέθοδο TLC- bioautography. α-β) Διοδραστικές ενώσεις των ενδοφυτικών βακτηρίων απομονώθηκαν από το μέτωπο των βακτηρίων (B- extract) χωρίς την εφαρμογή του παθογόνου μύκητα Cal.l.11 (A), Cal.r.11 (C), Cal.f.2.1 (E), Cal.f.4 (G), Cal.l.30 (I) και Cal.r.29 (K) αντίστοιχα και από τη ζώνη παρεμπόδισης μεταξύ του παθογόνου μύκητα και των βακτηρίων (B/F- extract) εναντίον του φυτοπαθογόνου μύκητα Cal.l.11 (B), Cal.r.11 (D), Cal.f.2.1 (F), Cal.f.4 (H), Cal.l.30 (J) και Cal.r.29 (L). γ-δ) Διαχωρισμένες ενώσεις του ενδοφυτικού βακτηρίου Cal.r.19 χωρίς την εφαρμογή του φυτοπαθογόνου μύκητα (M) και με την εφαρμογή του φυτοπαθογόνου μύκητα (N).

Στον Πίνακα 3.21 καταγράφεται ο παράγοντας υστέρησης (R_f) για την κάθε ένωση που διαχωρίστηκε και παρουσιάζει αντιβιοτική δράση, με την δημιουργία ευδιάκριτης ζώνης μετά την εφαρμογή του φυτοπαθογόνου μύκητα. Οι ενώσεις που προέκυψαν μετά το διαχωρισμό τους με τη χρωματογραφία λεπτής στιβάδας αντιστοιχούν σε συγκεκριμένη αντιβιοτική ένωση η οποία προκύπτει από το R_f της κάθε ένωσης.

Πίνακας 3.21 Υπολογισμός του παράγοντα υστέρησης (R_f) για κάθε ζώνη που εμφάνισε αντιβιοτική δράση μετά την εφαρμογή του φυτοπαθογόνου μύκητα *B. cinerea* στην πλάκα TLC, για την κάθε εφαρμογή ξεχωριστά.

Βακτηριακά στελέχη		R_f				
		Ζώνη 0	Ζώνη 1	Ζώνη 2	Ζώνη 3	Ζώνη 4
A	Cal.l.11	-	-	0.40	0.36	-
B	Cal.l.11- <i>B. cinerea</i>	-	-	0.39	0.37	-
C	Cal.r.11	-	-	0.39	0.36	0.31
D	Cal.r.11- <i>B. cinerea</i>	-	-	0.39	0.37	0.31
E	Cal.f.2.1	-	-	0.39	0.36	0.31
F	Cal.f.2.1- <i>B. cinerea</i>	-	-	0.39	0.36	0.31
G	Cal.f.4	-	-	0.39	0.36	0.28
H	Cal.f.4- <i>B. cinerea</i>	-	-	0.40	0.36	0.31
I	Cal.l.30	-	-	0.39	0.36	0.29
J	Cal.l.30- <i>B. cinerea</i>	-	-	0.40	0.37	0.32
K	Cal.r.29	-	0.48	-	0.35	-
L	Cal.r.29- <i>B. cinerea</i>	-	0.49	-	0.36	-
M	Cal.r.19	0.55	0.48	-	-	-
N	Cal.r.19- <i>B. cinerea</i>	0.55	0.48	-	-	-

Σύμφωνα με τον Πίνακα 3.21 και την Εικόνα 3.34α-β, τα στελέχη Cal.l.11, Cal.r.11, Cal.f.2.1, Cal.f.4 και Cal.l.30 εμφανίζουν δύο ευδιάκριτες ζώνες ανταγωνιστικής δράσης των ενώσεών τους, οι οποίες δεν χάνονται με το πέρασμα των ωρών στα περισσότερα στελέχη και εμφανίζουν όμοιες τιμές του παράγοντα υστέρησης R_f (ζώνη 2 και ζώνη 3). Η ζώνη 4 με R_f τιμές μεταξύ 0.28 και 0.32, είναι ευδιάκριτη σε όλα τα προαναφερθέντα στελέχη εκτός του Cal.l.11. Το στέλεχος που ξεχωρίζει είναι το Cal.r.29, το οποίο εμφανίζει επίσης δύο έντονες ζώνες ανταγωνιστικής δράσης των ενώσεών τους, με τον παράγοντα υστέρησης να ταυτίζεται με εκείνον της κατηγορίας Ζώνη 2, ενώ η δεύτερη και πιο έντονη ζώνη παρουσιάζει πιο χαμηλή τιμή R_f (Ζώνη 1). Ταυτόχρονα, η τιμή του R_f της ζώνης 1 του βακτηρίου Cal.r.29, ταυτίζεται με εκείνη που εμφανίζεται και στο ανταγωνιστικό στέλεχος Bvel1 (E και Z) όπως παρουσιάζεται στην Εικόνα 3.35 παρακάτω.



Εικόνα 3.35 Έλεγχος της βιοδραστικότητας των ακατέργαστων αντιβιοτικών ενώσεων που απομονώθηκαν από το μέτωπο των βακτηρίων (B, Δ, Z) καθώς και από τη ζώνη παρεμπόδισης μεταξύ του παθογόνου μύκητα και των βακτηρίων (A, Γ, E) εναντίον του φυτοπαθογόνου μύκητα *Botrytis cinerea* με τη μέθοδο TLC- bioautography. Απομονωμένες ενώσεις του βακτηρίου *P. carnis* X χωρίς βιοδραστικότητα (A- B). Βιοδραστικές ενώσεις του στελέχους Cal.r.29 (Γ-Δ) και Bvel1 (E-Z).

Τέλος, το ανταγωνιστικό στέλεχος X δεν ανταποκρίθηκε θετικά στη μέθοδο bioautography assay και δεν εμφάνισε ευδιάκριτες ζώνες ανταγωνιστικότητας (Εικ. 3.35), παρά την ανταγωνιστική δράση των απομονωμένων ακατέργαστων ενώσεών του (Εικ. 3.33B).

3.4.3 Ανίχνευση των γονιδίων που κωδικοποιούν για τις αντιβιοτικές ενώσεις Iturin, Fengycin και Surfactin με PCR

Όλα τα παραπάνω στελέχη μελετήθηκαν για την ανίχνευση τριών πολύ σημαντικών αντιβιοτικών ενώσεων που παράγονται από ισχυρά ανταγωνιστικά βακτήρια του γένους *Bacillus*. Η ανίχνευση των γονιδίων πραγματοποιήθηκε με τη δημιουργία κατάλληλων καθολικών εκκινήτων (Universal Primers) για γονίδια που κωδικοποιούν για τα αντιβιοτικά Iturin, Fengycin και Surfactin και την πραγματοποίηση αλυσιδωτής αντίδρασης της

πολυμεράσης (PCR). Στον Πίνακα 3.22 παρουσιάζεται με (+) ύπαρξη του μελετώμενου γονιδίου για κάθε βακτηριακό στέλεχος. Όλα τα στελέχη εμφάνισαν θετικό προϊόν για την ύπαρξη του γονιδίου που κωδικοποιεί για το αντιβιοτικό Fengycin, ενώ για το αντιβιοτικό Iturin μόνο το στέλεχος Cal.l.30 δεν εμφάνισε προϊόν στην PCR. Τα στελέχη Cal.r.29 και Cal.r.19 ήταν τα μόνα που εμφάνισαν προϊόν για το αντιβιοτικό Surfactin.

Πίνακας 3.22 Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR) για την ανίχνευση της ύπαρξης γονιδίων που κωδικοποιούν για τα αντιβιοτικά Iturin, Fengycin και Surfactin.

Βακτηριακά Στέλεχη	PCR		
	Iturin	Fengycin	Surfactin
Cal.r.29	+	+	+
Cal.f.4	+	+	-
Cal.f.2.1	+	+	-
Cal.l.11	+	+	-
Cal.l.30	+	+	-
Cal.r.11	+	+	-
Cal.r.19	+	+	+

3.5 Μελέτη των επιλεγμένων ενδοφυτικών βακτηρίων Cal.l.30, Cal.f.4, και Cal.r.29 καθώς και του ριζοσφαιρικού βακτηρίου X ως μεμονωμένα και μίγματα βακτηρίων

3.5.1 Μεταβολομική ανάλυση με UHPLC-ESI HRMS

Οι δευτερογενείς μεταβολίτες που παράγονται από τα ανταγωνιστικά βακτήρια Cal.r.29, και Cal.l.30 εναντίον του φυτοπαθογόνου μύκητα *Botrytis cinerea*, ταυτοποιήθηκαν με 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).

3.5.1.1 Cal.r.29

Από τη μεταβολομική ανάλυση του ενδοφυτικού στελέχους Cal.r.29, ταυτοποιήθηκε ένας σημαντικός αριθμός δευτερογενών μεταβολιτών συμπεριλαμβανομένων των ισχυρών αντιμικροβιακών ενώσεων που ανήκουν στα κυκλικά λιποπεπτίδια των οικογενειών surfactin, fengycin και iturin (Πίν. 3.23).

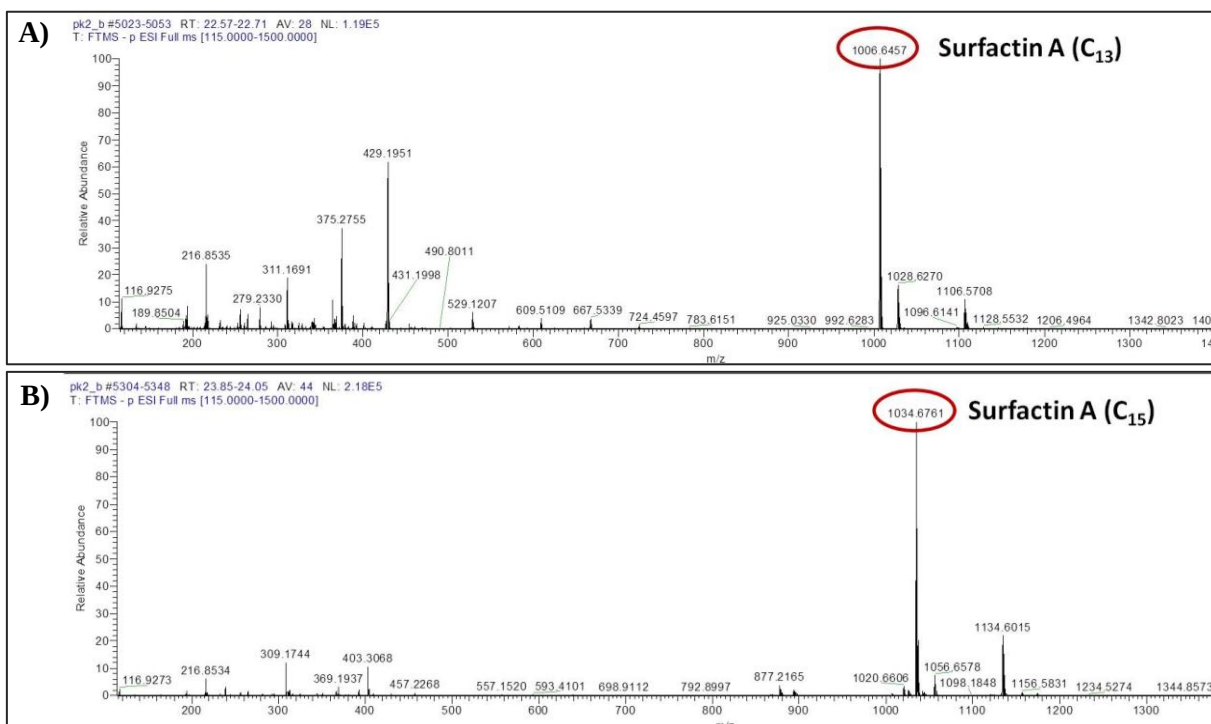
Πίνακας 3.23 Προσδιορισμός χημικού τύπου, μοριακής μάζας και χρόνου κατακράτησης των δευτερογενών μεταβολιτών του βακτηριακού στελέχους *Bacillus velezensis* Cal.r.29 μετά από UHPLC-ESI HRMS ανάλυση.

Antibiotic compounds	Molecular formula	Calculated mass (g/mol)	[M-H] ⁻		[M+H] ⁺		Reference or source
			Experimental m/z	RT (min)	Experimental m/z	RT (min)	
Surfactin A							
C ₁₃	C ₅₁ H ₈₉ N ₇ O ₁₃	1008,2915	1007,65199	22,699	ND	ND	Luo et al., 2015
C ₁₅	C ₅₃ H ₉₃ N ₇ O ₁₃	1036,3446	1035,68318	23,945	ND	ND	Wang et al., 2019
Iturin							
C ₁₄ -A2	C ₄₈ H ₇₄ N ₁₂ O ₁₄	1043,1732	1042,5424	14,31	ND	ND	Wang et al., 2019
C ₁₆ -A6/A7	C ₅₀ H ₇₈ N ₁₂ O ₁₄	1071,2263	1070,57581	15,617	ND	ND	Hiradate et al., 2000
Fengycin A							
C ₁₆	C ₇₂ H ₁₁₀ N ₁₂ O ₂₀	1463,7122	1462,797	16,61	ND	ND	Torres et al., 2016
L-dihydroantcapsin							
	C ₉ H ₁₅ NO ₄	201,2201	201,09954	11,395	ND	ND	Parker and Walsh, 2013
Oxydifficidin							
	C ₃₁ H ₄₅ O ₇ P	560,6616	560,29057	16,95	ND	ND	Im et al., 2020
Azelaic acid							
	C ₉ H ₁₆ O ₄	188,2209	188,10419	11,012	ND	ND	Javvadi et al., 2018
Bacillibactin							
	C ₃₉ H ₄₂ N ₆ O ₁₈	882,7802	ND	ND	882,2566	11,88	Cheon et al., 2019

*ND (Non- detected): Μη ανιχνεύσιμα

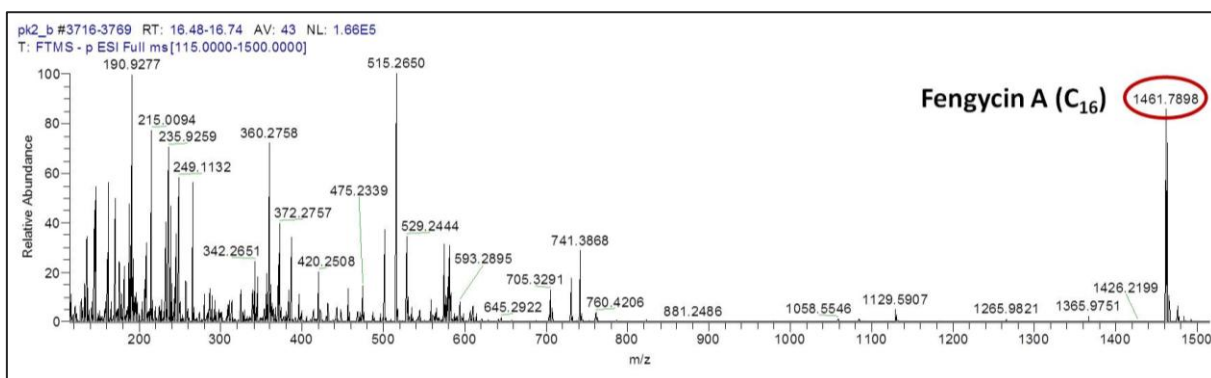
Συγκεκριμένα, όπως παρουσιάζεται στον Πίνακα 3.23 και στα φάσματα μαζών της Εικόνας 3.36A και 3.36B, το βακτηριακό στέλεχος Cal.r.29 παράγει δύο ανάλογα της ισχυρής

επιφανειοδραστικής και παράλληλα αντιμικροβιακής ένωσης surfactin A. Συγκεκριμένα, ταυτοποιήθηκαν δύο ανάλογα στον αρνητικό χημικό ιοντισμό, το C₁₃ surfactin A με $m/z = 1007,65199$ και το C₁₅ surfactin A με $m/z = 1035,68318$.



Εικόνα 3.36 Φάσματα μαζών των αντιβιοτικών ενώσεων A) C₁₃ Surfactin A και B) C₁₅ Surfactin A, του βακτηρίου Cal.r.29, που ταυτοποιήθηκαν με UHPLC-ESI HRMS.

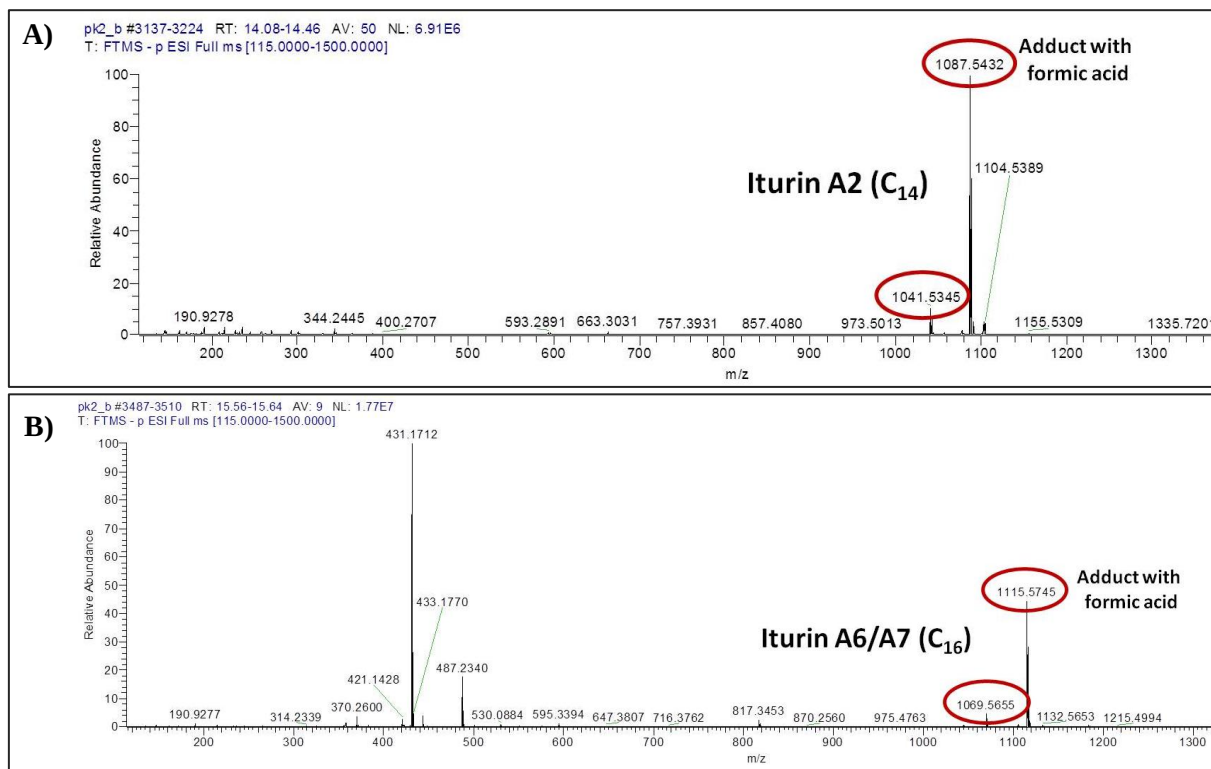
Για το κυκλικό λιποπεπτίδιο fengycin απομονώθηκε και ταυτοποιήθηκε το ανάλογο C₁₆ fengycin A με $m/z = 1462,797$ και σε χρόνο κατακράτησης 16,61 min, όπως παρουσιάζεται στην Εικόνα 3.37.



Εικόνα 3.37 Φάσμα μαζών της αντιβιοτικής ένωσης C₁₆ Fengycin A, του βακτηρίου Cal.r.29, που ταυτοποιήθηκε με UHPLC-ESI HRMS.

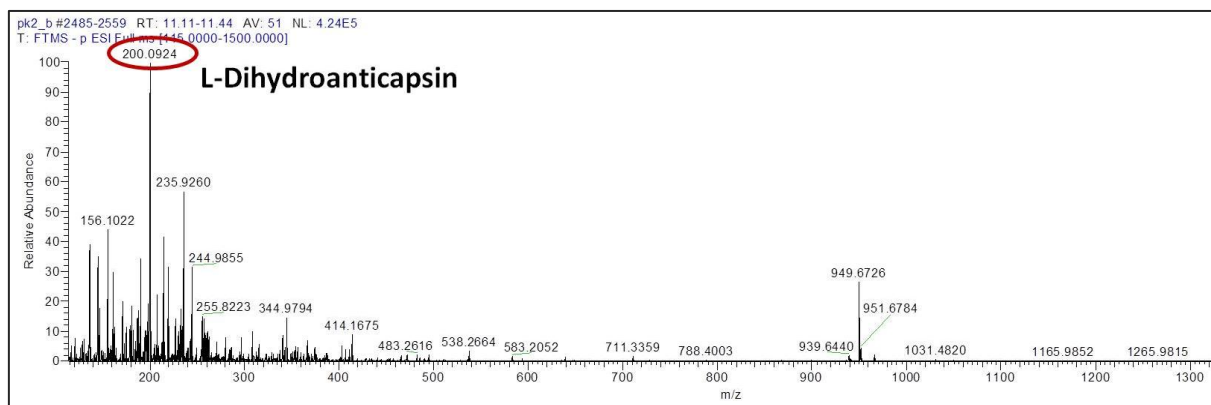
Επιπλέον, για το κυκλικό λιποπεπτίδιο Iturin A ταυτοποιήθηκαν επίσης δύο ανάλογα στον αρνητικό ιοντισμό, όπως απεικονίζονται στην εικόνα 3.38A και 3.38B και παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.22. Συγκεκριμένα ταυτοποιήθηκαν τα C₁₄ iturin A2 (C₄₈H₇₄N₁₂O₁₄) με $m/z =$

1042,5424 και C₁₆ iturin A6/A7 (C₅₀H₇₈N₁₂O₁₄) με m/z = 1070,57581, σε χρόνο κατακράτησης 13,31 και 15,617 αντίστοιχα.



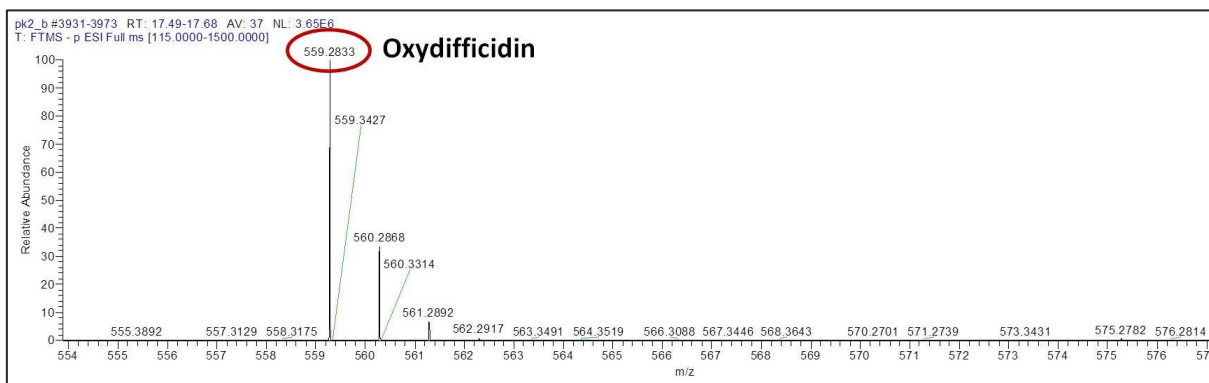
Εικόνα 3.38 Φάσματα μαζών των αντιβιοτικών ενώσεων A) C₁₄ Iturin A2 και B) C₁₆ Iturin A6/A7, του βακτηρίου Cal.r.29, που ταυτοποιήθηκαν με UHPLC-ESI HRMS.

Σε χρόνο κατακράτησης 11,39 ανιχνεύτηκε η πρόδρομη ένωση του αντιβιοτικού bacilysin, L-dihydroantcapsin (C₉H₁₅NO₄) με μάζα m/z 201,09954. Η ένωση bacilysin αποτελεί σημαντική αντιμικροβιακή ένωση καταλύοντας ταυτόχρονα βακτήρια αλλά και μύκητες (Εικ. 3.39).



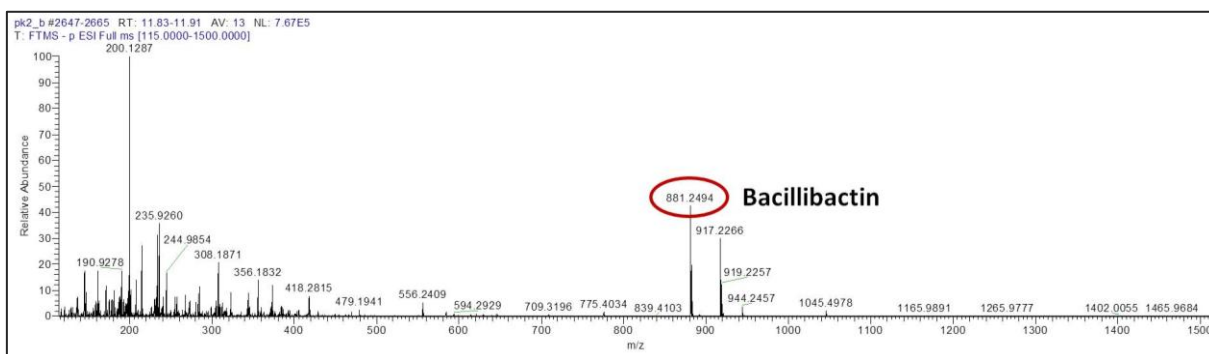
Εικόνα 3.39 Φάσμα μαζών της αντιβιοτικής ένωσης L-Dihydroantcapsin, του βακτηρίου Cal.r.29, που ταυτοποιήθηκε με UHPLC-ESI HRMS.

Μία εξίσου σημαντική αντιβακτηριακή ένωση που ταυτοποιήθηκε είναι η oxydifficidin με χημικό τύπο $C_{31}H_{45}O_7P$, σε χρόνο κατακράτησης 17,554 min, και $m/z = 560,29057$, όπως παρουσιάζεται στο φάσμα μαζών της Εικόνας 3.40.



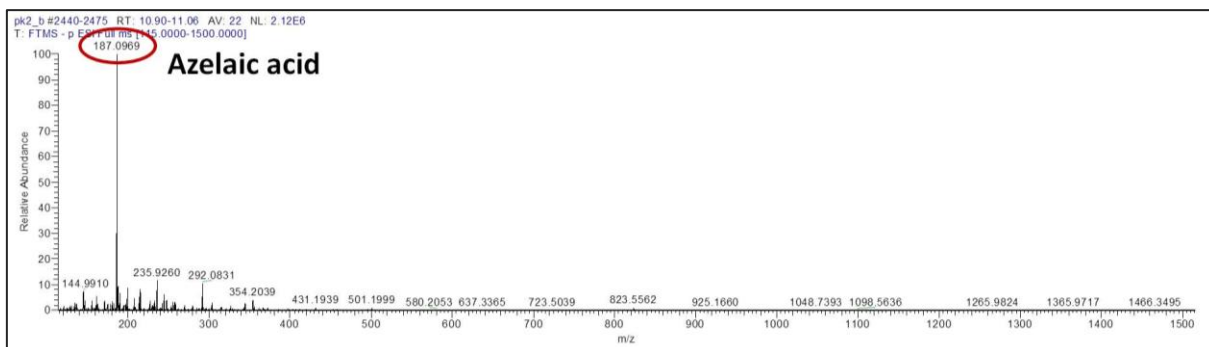
Εικόνα 3.40 Φάσμα μαζών της αντιβιοτικής ένωσης Oxydifficidin, του βακτηρίου Cal.r.29, που ταυτοποιήθηκε με UHPLC-ESI HRMS.

Από τις πιο σημαντικές ενώσεις που απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν ήταν η σιδηροφόρος ένωση bacillibactin ($C_{39}H_{42}N_6O_{18}$) (Πίν. 3.22). Η κορυφή με $m/z = 882,2566$, εντοπίστηκε στο θετικό ιονισμό σε χρόνο κατακράτησης 11,88 (Εικ. 3.41).



Εικόνα 3.41 Φάσμα μαζών της αντιβιοτικής ένωσης Bacillibactin, του βακτηρίου Cal.r.29, που ταυτοποιήθηκε με UHPLC-ESI HRMS.

Τέλος, αναφέρεται η ταυτοποίηση της δραστικής ένωσης azelaic acid ($C_9H_{16}O_4$) (Πίν. 3.22). Στο φάσμα μαζών της Εικόνας 3.42 παρουσιάζεται η κορυφή μάζας $m/z = 188,10419$, η οποία εντοπίστηκε στον αρνητικό ιονισμό σε χρόνο κατακράτησης 11,012.



Εικόνα 3.42 Φάσμα μαζών της αντιβιοτικής ένωσης Azelaic acid, του βακτηρίου Cal.r.29, που ταυτοποιήθηκε με UHPLC-ESI HRMS.

3.5.5.2 Cal.l.30

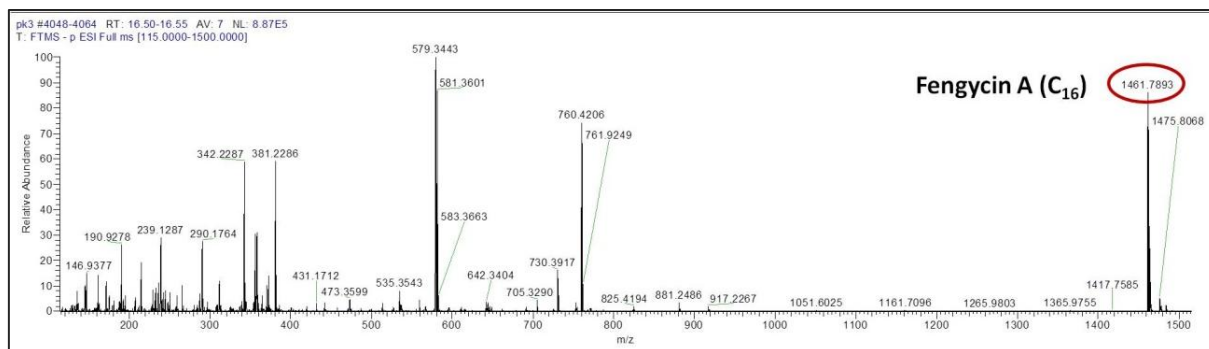
Όπως παρουσιάζεται στον Πίνακα 3.24, το βακτηριακό στέλεχος Cal.l.30 παράγει ένα πλήθος δευτερογενών μεταβολιτών και αναλόγων αυτών συμπεριλαμβανομένων εκείνων που ανήκουν στις τρεις βασικές οικογένειες κυκλικών λιποπεπτιδίων surfactin, fengycin και iturin, καθώς και τέσσερα ανάλογα του αντιβιοτικού bacillaene.

Πίνακας 3.24 Προσδιορισμός χημικού τύπου, μοριακής μάζας και χρόνου κατακράτησης των δευτερογενών μεταβολιτών του βακτηριακού στελέχους *Bacillus halotolerans* Cal.l.30 μετά από UHPLC-ESI HRMS ανάλυση.

Antibiotic compounds	Molecular formula	Calculated mass (g/mol)	[M-H]-		[M+H]+		Reference or source
			Experimental m/z	RT (min)	Experiment al m/z	RT (min)	
Surfactin A							
C ₁₃	C ₅₁ H ₈₉ N ₇ O ₁₃	1008,2915	1007,65199	22,699	ND	ND	Luo et al., 2015
C ₁₅	C ₅₃ H ₉₃ N ₇ O ₁₃	1036,3446	1035,68318	23,945	ND	ND	Wang et al., 2019
Fengycin A							
C ₁₆	C ₇₂ H ₁₁₀ N ₁₂ O ₂₀	1463,7122	1462,797	16,51	ND	ND	Torres et al., 2016
Bacillaene							
A	C ₃₄ H ₄₈ N ₂ O ₆	580,7547	580,35051	16,365	ND	ND	Moldenhauer et al., 2010
dihydrobacillaene A	C ₃₄ H ₅₀ N ₂ O ₆	582.7706	582,36017	16,24	ND	ND	Moldenhauer et al., 2010
B	C ₄₀ H ₅₈ N ₂ O ₁₁	742,8953	742,40399	14,357	ND	ND	Li et al., 2021
C	C ₄₄ H ₆₄ N ₂ O ₁₄	844,984	844,43629	14,984	ND	ND	Schneider, 2010
L-dihydroantcapsin							
	C ₉ H ₁₅ NO ₄	201,2201	201,09954	11,395	ND	ND	Parker and Walsh, 2013
Azelaic acid							
	C ₉ H ₁₆ O ₄	188,2209	188,10419	11,022	ND	ND	Javvadi et al., 2018
Bacillibactin							
	C ₃₉ H ₄₂ N ₆ O ₁₈	882,7802	ND	ND	882,2566	11,88	Cheon et al., 2019

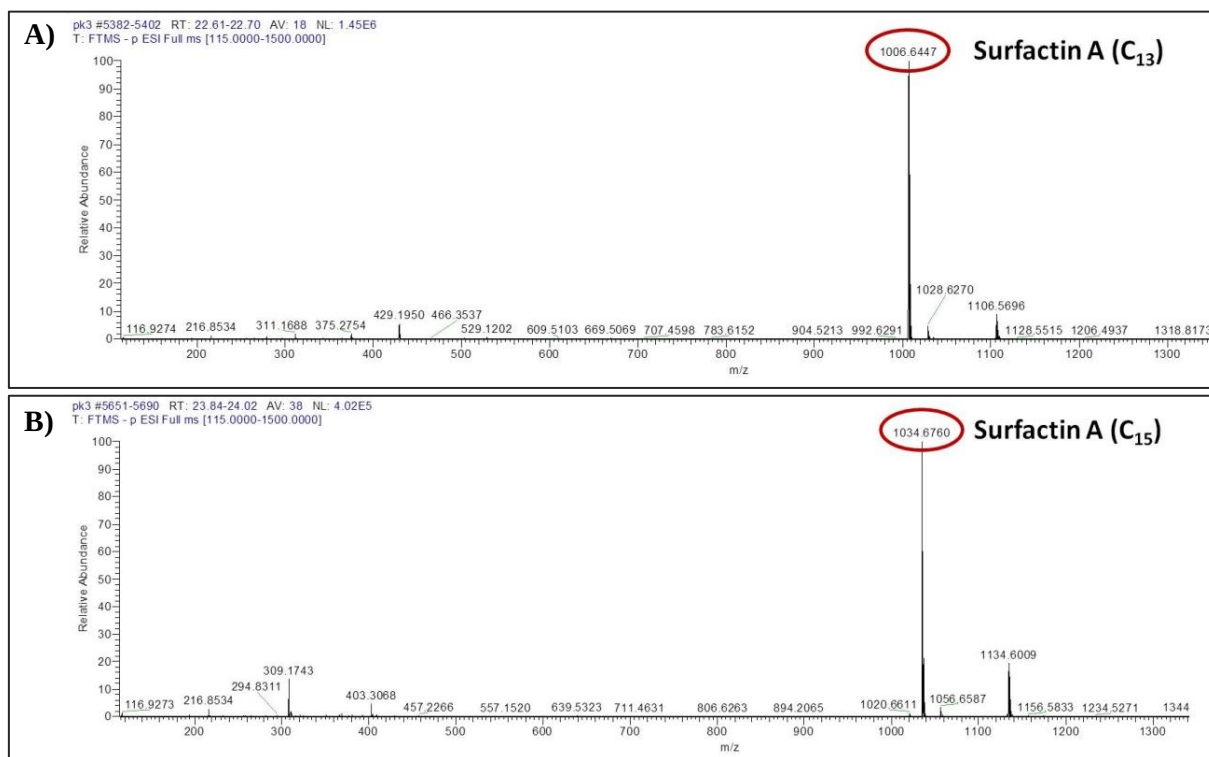
*ND (Non- detected): Μη ανιχνεύσιμα

Μια σημαντική ένωση που ταυτοποιήθηκε στον αρνητικό ιοντισμό είναι το ανάλογο του κυκλικού λιποπεπτιδίου C₁₆ fengycin A με χημικό τύπο C₇₂H₁₁₀N₁₂O₂₀. Η κορυφή του χρωματογραφήματος εντοπίστηκε σε χρόνο κατακράτησης 16,51 min, με $m/z = 1462,797$ (Πίν. 3.23 και Εικ. 3.43).



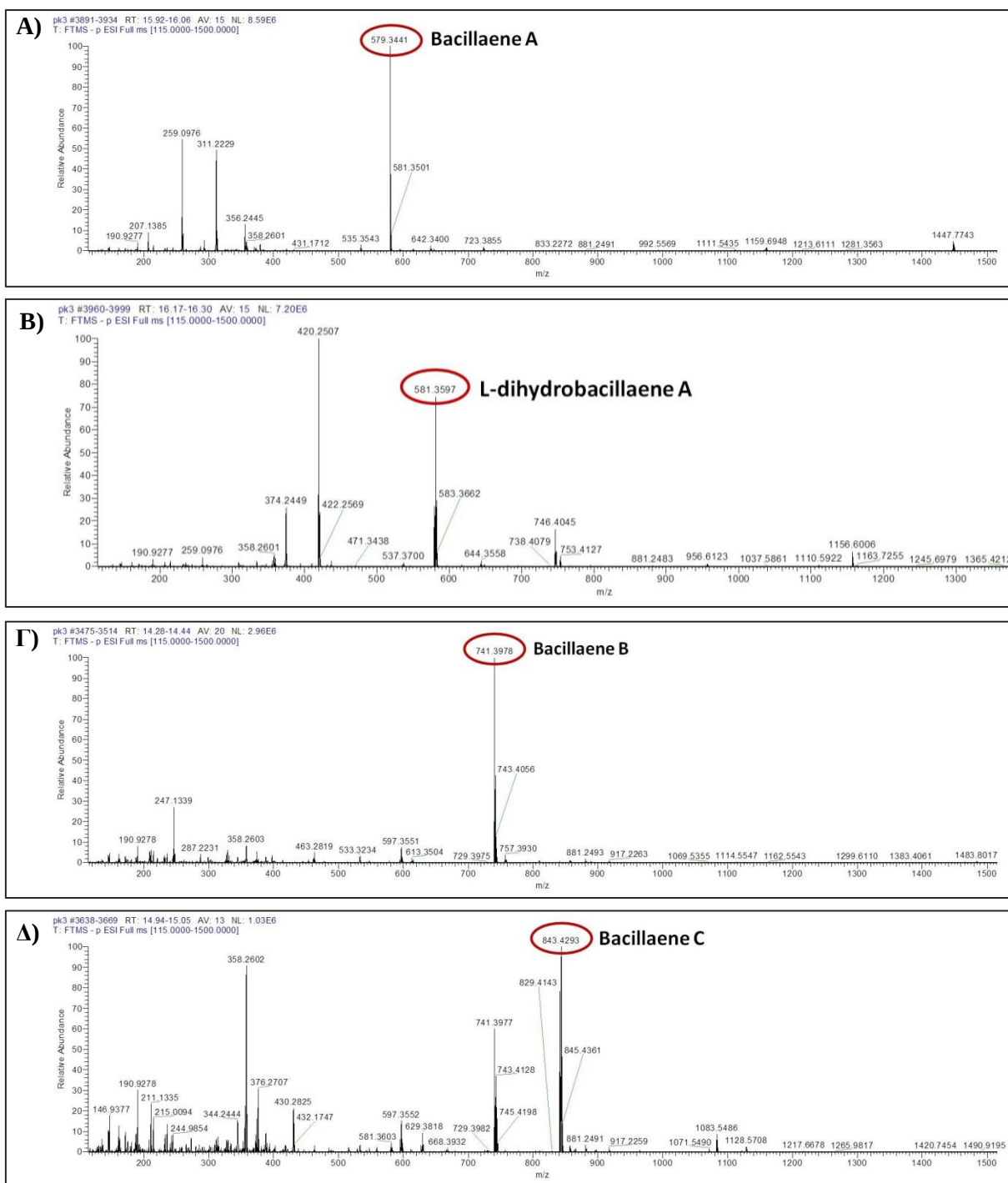
Εικόνα 3.43 Φάσμα μαζών της αντιβιοτικής ένωσης C₁₆ Fengycin A, του βακτηρίου Cal.l.30, που ταυτοποιήθηκε με UHPLC-ESI HRMS.

Επίσης, στον αρνητικό ιοντισμό ανιχνεύθηκαν δύο ανάλογα του αντιβιοτικού surfactin A, τα C₁₃ surfactin A με $m/z = 1007,65199$ και το C₁₅ surfactin A με $m/z = 1035,68318$, σε χρόνο κατακράτησης 22,699 min και 23,945 min, αντίστοιχα, όπως παρουσιάζεται στα φάσματα μαζών της Εικόνας 3.44.



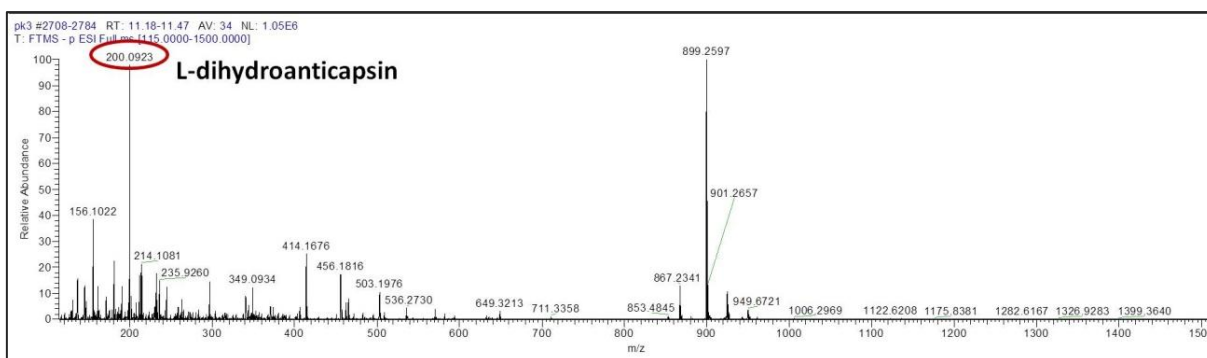
Εικόνα 3.44 Φάσματα μαζών των αντιβιοτικών ενώσεων A) C₁₃ Surfactin A και B) C₁₅ Surfactin A, του βακτηρίου Cal.1.30, που ταυτοποιήθηκαν με UHPLC-ESI HRMS.

Ταυτόχρονα, στον αρνητικό ιοντισμό ανιχνεύτηκαν τέσσερα ανάλογα του αντιβιοτικού bacillaene (Εικ. 3.45). Συγκεκριμένα, ταυτοποιήθηκαν οι ενώσεις bacillaene A (C₃₄H₄₈N₂O₆) με m/z 580,35051 και χρόνο κατακράτησης 16,361 min, dihydrobacillaene A (C₃₄H₅₀N₂O₆) με m/z 582,36017 και χρόνο κατακράτησης 16,24, bacillaene B (C₄₀H₅₈N₂O₁₁) με m/z 742,40399 m/z και χρόνο κατακράτησης 14,357 και τέλος η ένωση bacillaene C (C₄₄H₆₄N₂O₁₄) με m/z 844,984 και χρόνο κατακράτησης 14,984 (Πίν. 3.23).



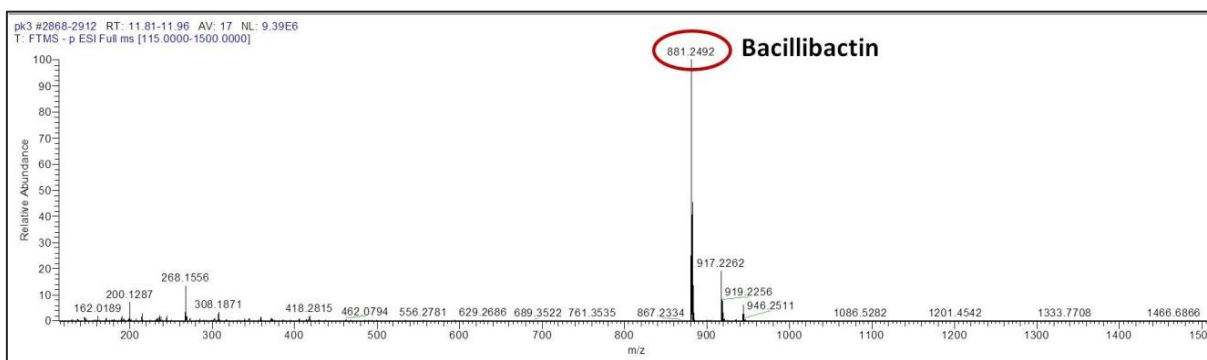
Εικόνα 3.45 Φάσματα μαζών των αντιβιοτικών ενώσεων Α) Bacillaene A1, Β) Dihydrobacillaene, Γ) Bacillaene B1 και Δ) Bacillaene C2 του βακτηρίου Cal.1.30, που ταυτοποιήθηκαν με UHPLC-ESI HRMS.

Επιπλέον, στον αρνητικό ιοντισμό ταυτοποιήθηκε η πρόδρομη ένωση του αντιβιοτικού bacilysin, L-dihydroantcapsin, με μάζα $m/z = 201,09954$ και χρόνο κατακράτησης 11,279, όπως παρατηρείται στον Πίνακα 3.23 και το φάσμα μαζών της Εικόνας 3.46.



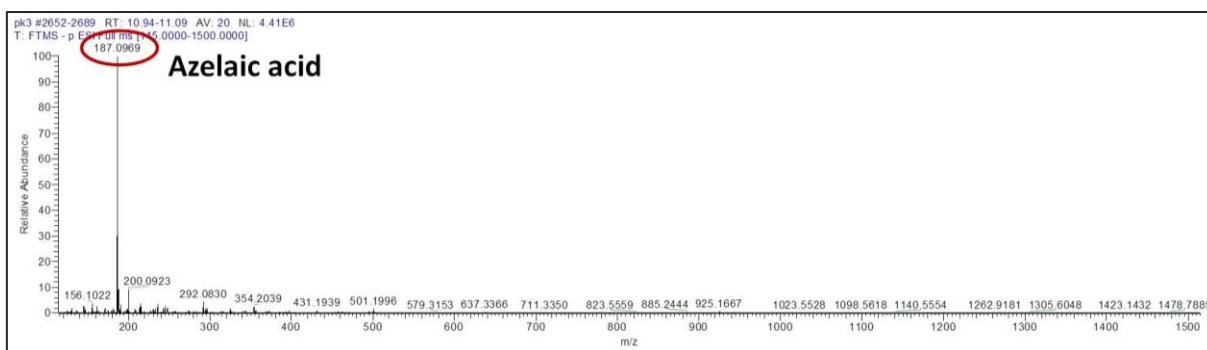
Εικόνα 3.46 Φάσμα μαζών της αντιβιοτικής ένωσης L-dihydroantcapsin του βακτηρίου Cal.l.30, που ταυτοποιήθηκαν με UHPLC-ESI HRMS.

Από τις πιο σημαντικές ενώσεις που απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν ήταν η σιδηροφόρος ένωση bacillibactin ($C_{39}H_{42}N_6O_{18}$) (Πίν. 3.23). Η κορυφή του χρωματογραφήματος εντοπίστηκε στο θετικό ιονισμό, σε χρόνο κατακράτησης 11,88 και με $m/z = 882,7802$ (Εικ. 3.47).



Εικόνα 3.47 Φάσμα μαζών της αντιβιοτικής ένωσης Bacillibactin, του βακτηρίου Cal.l.30, που ταυτοποιήθηκε με UHPLC-ESI HRMS.

Τέλος, ταυτοποιήθηκε η δραστική ένωση azelaic acid ($C_9H_{16}O_4$) (Πίν. 3.22). Στο φάσμα μαζών της Εικόνας 3.48 παρουσιάζεται η κορυφή μάζας $m/z = 188,10419$, η οποία εντοπίστηκε στον αρνητικό ιονισμό σε χρόνο κατακράτησης 11,022 (Εικ. 3.47).

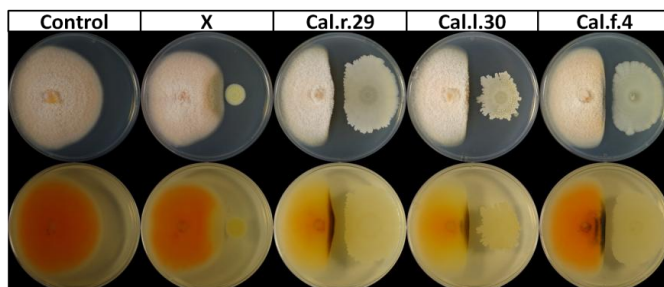


Εικόνα 3.48 Φάσμα μαζών της αντιβιοτικής ένωσης Azelaic acid, του βακτηρίου Cal.l.30, που ταυτοποιήθηκε με UHPLC-ESI HRMS.

3.5.2 Βιολογική προστασία καρπών ελιάς (detached fruit assay) από τον φυτοπαθογόνο μύκητα *Colletotrichum acutatum*

Τα ενδοφυτικά στελέχη Cal.r.29, Cal.l.30, Cal.f.4 και το ριζοσφαιρικό βακτήριο *P. carnis* X που ξεχώρισαν για τη ισχυρή αντιμικροβιακή τους δράση, εφαρμόστηκαν στη συνέχεια εναντίον του φυτοπαθογόνου μύκητα *Colletotrichum acutatum* σε *in vitro* και *in vivo* συνθήκες. Συγκεκριμένα, μελετήθηκε η παρεμπόδιση της εξάπλωσης του παθογόνου μύκητα σε στερεό θρεπτικό μέσο PDA και ταυτόχρονα η ελάττωση της σοβαρότητας της ασθένειας μετά τη διπλή εφαρμογή τους σε καρπούς ελιάς, ποικιλία Κορωνέικη.

Όπως παρουσιάζεται και στην Εικόνα 3.49 τόσο τα ενδοφυτικά στελέχη (Cal.r.29, Cal.l.30 και Cal.f.4) όσο και το ριζοσφαιρικό βακτήριο *P. carnis* X αναχαιτίζουν σε σημαντικό βαθμό την εξάπλωση του παθογόνου στο στερεό θρεπτικό μέσο ανάπτυξης. Όλα τα στελέχη σχηματίζουν έντονη ζώνη παρεμπόδισης αλλοιώνοντας ταυτόχρονα τις μυκηλιακές υφές, σε *in vitro* συνθήκες. Συγκεκριμένα, τα ενδοφυτικά βακτηριακά στελέχη μεταχρωματίζουν τις υφές του μύκητα, από πορτοκαλί σε σκούρο καφέ-μαύρο χρώμα αλλοιώνοντας παράλληλα τη μορφολογία τους, ενώ το ριζοσφαιρικό στέλεχος X μόνο αλλοιώνει την υφή τους.



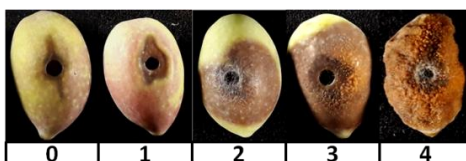
Εικόνα 3.49 Ανταγωνιστική δράση των ενδοφυτικών βακτηρίων Cal.r.29, Cal.l.30, Cal.f.4 και του ριζοσφαιρικού βακτηρίου *P. carnis* X εναντίον του φυτοπαθογόνου μύκητα *Colletotrichum acutatum* με τη μέθοδο της διπλής καλλιέργειας (dual culture).

Όπως παρουσιάζεται και στο Πίνακα 3.25, το βακτηριακό στέλεχος Cal.r.29 παρουσιάζει το μεγαλύτερο ποσοστό παρεμπόδισης με ποσοστό 43,83 %. Ακολουθούν τα στελέχη Cal.l.30 και Cal.f.4 με ποσοστά παρεμπόδισης 38,47 % και 31,52 %, ενώ το ριζοσφαιρικό βακτήριο *P. carnis* X με ποσοστό 21,30 %, παρουσιάζει το χαμηλότερο ποσοστό παρεμπόδισης συγκριτικά με τα υπόλοιπα στελέχη.

Η εφαρμογή τόσο των ανταγωνιστικών βακτηρίων όσο και του παθογόνου μύκητα πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο detached fruit assay σε ασυμπτωματικούς καρπούς ελιάς ποικιλίας Κορωνέικη, ενώ μετά από 3 ημέρες ταυτόχρονης ανάπτυξης γίνεται η καταγραφή των μολυσμένων καρπών (Εικ. 3.51B). Όπως παρουσιάζεται και στον Πίνακα 3.25, η ένταση της ασθένειας (Disease incidence, DI), μειώνεται σε σημαντικό βαθμό ύστερα από την

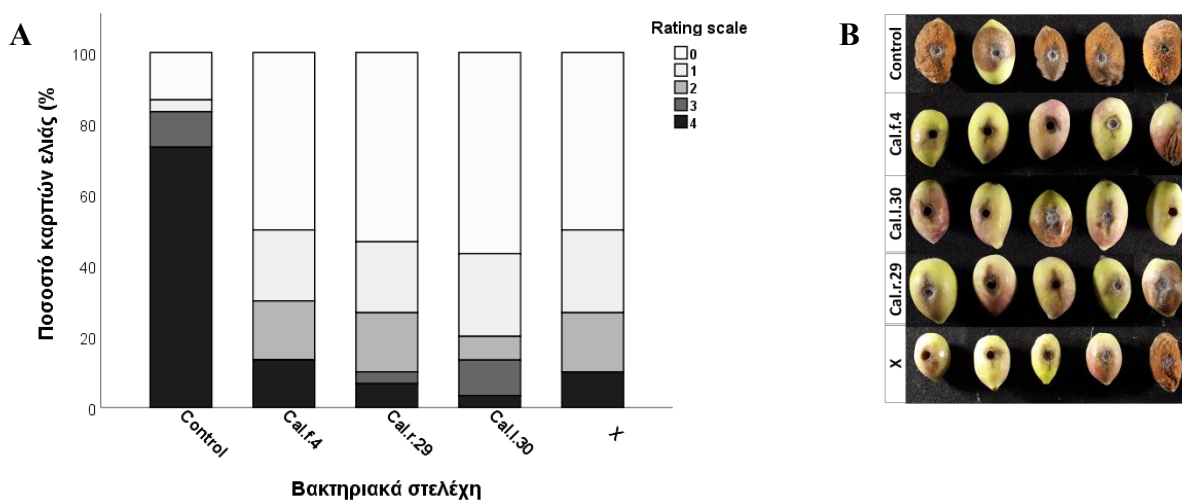
εφαρμογή και των τεσσάρων ανταγωνιστικών στελεχών, σε σύγκριση με τους καρπούς του μάρτυρα.

Όπως παρατηρείται και στην Εικόνα 3.50, από την εφαρμογή των βακτηρίων προέκυψε μια διαβαθμισμένη εξάπλωση του φυτοπαθογόνου μύκητα στους μελετώμενους καρπούς με αποτέλεσμα τον υπολογισμό της σοβαρότητας της ασθένειας (Disease severity, DS). Η σοβαρότητα της ασθένειας αποτυπώνεται σε μια διαβαθμισμένη κλίμακα ποσοστών (Rating scale) με τιμές: 0 (υγιής καρπός), 1 (1-25 %), 2 (26-50 %), 3 (51-75 %) και 4 (>75 %).



Εικόνα 3.50 Κλίμακα διαβάθμισης της σοβαρότητας της ασθένειας του φυτοπαθογόνου μύκητα *Colletotrichum acutatum* μετά την εφαρμογή των ανταγωνιστικών βακτηρίων με τη μέθοδο detached fruit assay σε καρπούς ελιάς.

Στο διάγραμμα Α της εικόνας 3.51 παρουσιάζεται το ποσοστό των καρπών που ανήκουν σε κάθε τιμή της διαβαθμισμένης κλίμακας, για κάθε μεταχείριση ξεχωριστά. Όλα τα βακτηριακά στελέχη μείωσαν σε σημαντικό βαθμό την σοβαρότητα της ασθένειας.



Εικόνα 3.51 Α) Ποσοστό καρπών ανά τιμή της κλίμακας βαθμολογίας της σοβαρότητας της ασθένειας του φυτοπαθογόνου μύκητα *Colletotrichum acutatum* μετά την εφαρμογή των ανταγωνιστικών βακτηρίων σε καρπούς ελιάς. Β) Εφαρμογή των βακτηρίων Cal.f.4, Cal.l.30, Cal.r.29 και X με τη μέθοδο detached fruit assay σε καρπούς ελιάς εναντίον του φυτοπαθογόνου μύκητα *Colletotrichum acutatum*.

Τα στελέχη που εμφάνισαν το μεγαλύτερο ποσοστό μολυσμένων καρπών με τιμή 4 στη διαβαθμισμένη κλίμακα της σοβαρότητας της ασθένειας, ήταν τα στελέχη Cal.f.4 και *P. carnis* X, με ποσοστά 13,33 % και 10,0 %, αντίστοιχα, ενώ ακολούθησαν τα στελέχη Cal.r.29 και Cal.l.30 με σημαντικά χαμηλά ποσοστά 6,67 % και 3,33 % αντίστοιχα. Το συνολικό ποσοστό μολυσμένων καρπών του μάρτυρα ήταν σημαντικά υψηλότερο φτάνοντας σε ποσοστό 73,33 %.

Όπως παρουσιάζεται στον Πίνακα 3.25, η εφαρμογή των ανταγωνιστικών βακτηρίων στους καρπούς ελιάς, μειώνει σε σημαντικό βαθμό το δείκτη σοβαρότητας της ασθένειας (Disease Severity Index, DSI) του φυτοπαθογόνου μύκητα *Colletotrichum acutatum*. Όλα τα στελέχη που εμβολιάσθηκαν στους καρπούς ελιάς, μειώνουν εξίσου σημαντικά την σοβαρότητα της ασθένειας, σε σύγκριση με το μάρτυρα, όπου η σοβαρότητα της ασθένειας είναι 81,67 %. Συγκεκριμένα ο δείκτης σοβαρότητας της ασθένειας των ενδοφυτικών στελεχών Cal.r.29, Cal.l.30 και Cal.f.4 είναι αντίστοιχα 24,44 %, 24,17 % και 26,67 %, ενώ του ριζοσφαιρικού βακτηρίου X είναι 24,17 % (Πίν. 3.25).

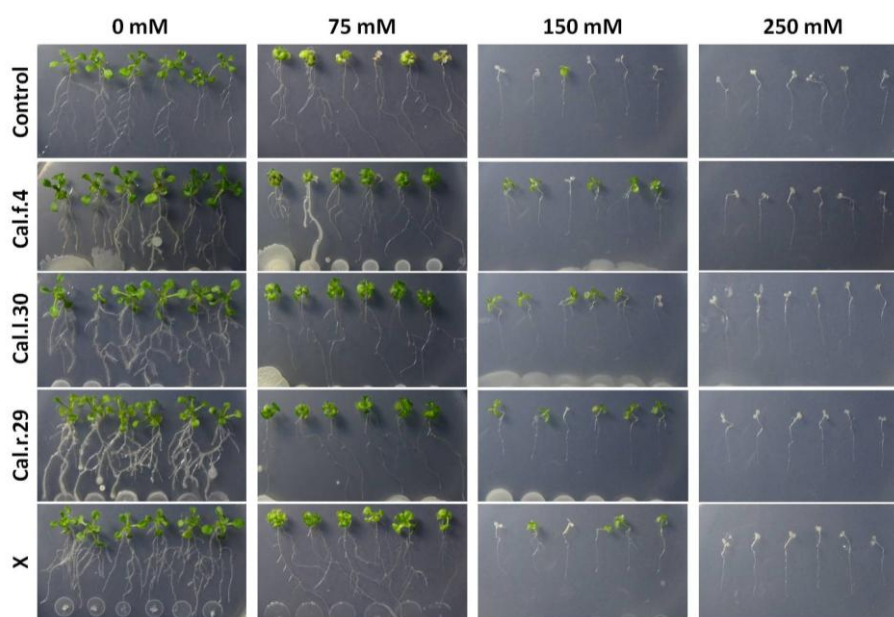
Πίνακας 3.25 Βιολογική αντιμετώπιση του φυτοπαθογόνου μύκητα *C. acutatum* μετά την εφαρμογή των ανταγωνιστικών βακτηρίων με την *in vivo* μέθοδο detached fruit assay σε καρπούς ελιάς και την *in vitro* μέθοδο dual culture. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο των μετρήσεων με τις τυπικές αποκλίσεις των τιμών τους. Τα διαφορετικά γράμματα σε κάθε περίπτωση υποδεικνύουν τις στατιστικώς σημαντικές διαφορές ($p < 0.05$) μεταξύ των μεταχειρίσεων, μετά από την πραγματοποίηση Tukey's test.

Βιολογική αντιμετώπιση του <i>Colletotrichum acutatum</i>			
Βακτηριακά στελέχη	Μέθοδος detached fruit assay σε καρπούς ελιάς <i>in vivo</i>		Μέθοδος διπλής καλλιέργειας <i>in vitro</i>
	Δείκτης σοβαρότητας ασθένειας (%)	Ένταση ασθένειας (%)	Παρεμπόδιση του μυκηλίου (%)
Μάρτυρας	81,67 ± 3,82a	86,67 ± 5,76a	-
Cal.r.29	24,44 ± 0,96b	46,67 ± 5,76b	43,38 ± 1,28a
Cal.f.4	26,67 ± 3,82b	50,00 ± 10,00b	31,52 ± 4,10c
Cal.l.30	24,17 ± 2,20b	43,33 ± 5,76b	38,47 ± 1,80d
X	24,17 ± 1,44b	50,00 ± 10,00b	21,30 ± 1,28b

3.5.3 Εφαρμογή των βακτηριακών στελεχών Cal.r.29, Cal.l.30, Cal.f.4 και X σε φυτά *A. thaliana* Col-0 σε συνθήκες υψηλής αλατότητας

Τα ενδοφυτικά στελέχη *Bacillus velezensis* Cal.r.29, *Bacillus halotolerans* Cal.l.30, *Bacillus halotolerans* Cal.f.4 καθώς και το ριζοσφαιρικό στέλεχος *P. carnis* X, εφαρμόστηκαν σε φυτά *A. thaliana* Col-0 σε συνθήκες αβιοτικού στρες *in vitro*. Συγκεκριμένα, τα φυτά *A. thaliana* αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό μέσο ½ MS πειέχοντας διαφορετικές συγκεντρώσεις αλατότητας (0 mM, 75 mM, 150 mM και 250 mM NaCl).

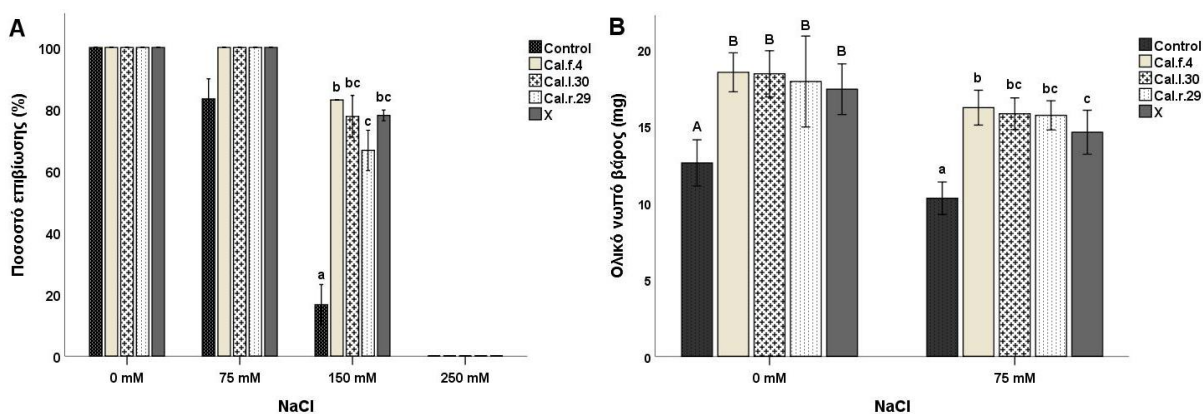
Όπως παρατηρείται και στην Εικόνα 3.52, οι βέλτιστες συνθήκες για την ανάπτυξη των φυτών *A. thaliana*, είναι το θρεπτικό μέσο ½ MS χωρίς την προσθήκη αλατιού (0 mM NaCl). Αντιθέτως, με την προσθήκη 250 mM NaCl στο μέσο ανάπτυξης, σε καμία από τις μεταχειρίσεις τα φυτά δεν κατάφεραν να επιβιώσουν. Τόσο τα φυτά του μάρτυρα όσο και εκείνα στα οποία εφαρμόστηκαν τα βακτηριακά στελέχη, εμφάνισαν ποσοστό θνησιμότητας 100 % σε τόσο ακραία συγκέντρωση NaCl.



Εικόνα 3.52 Εφαρμογή των βακτηριακών στελεχών Cal.l.30, Cal.f.4, Cal.r.29 και X σε φυτά *A. thaliana*, σε διαφορετικές συγκεντρώσεις NaCl (0 mM, 75 mM, 150 mM και 250 mM).

Η ανάπτυξη των φυτών σε υπόστρωμα με 150 mM NaCl, παρουσιάζει διαφορετικά αποτελέσματα. Όλες οι εφαρμογές επηρεάζονται από την αύξηση της συγκέντρωσης σε NaCl, με τη μεταχείριση του μάρτυρα να παρουσιάζει το χαμηλότερο ποσοστό επιβίωσης (16,67 %). Τα υψηλότερα ποσοστά επιβίωσης παρουσιάζουν οι εφαρμογές με τα βακτηριακά στελέχη Cal.f.4, Cal.l.30 και X, με ποσοστά 83,00 %, 77,67 % και 78 % αντίστοιχα. Το χαμηλότερο ποσοστό επιβίωσης εμφανίζει η μεταχείριση με το βακτηριακό στέλεχος Cal.r.29, με ποσοστό 66,67 %. Η προσθήκη 75 mM NaCl στο υπόστρωμα με τον ταυτόχρονο

εμβολιασμό του υποστρώματος με τα βακτηριακά στελέχη Cal.l.30, Cal.f.4, Cal.r.29 και X, δεν επηρεάζει τη ζωτικότητα των φυτών. Συγκεκριμένα, όλα τα φυτά κατάφεραν να επιβιώσουν, με εξαίρεση τα φυτά μάρτυρες όπου επιβιώνει μόνο το 83 % των φυτών (Διαγρ. 3.12A).



Διάγραμμα 3.12 Α) Ποσοστό επιβίωσης (%) των φυτών *A. thaliana* Col-0 σε συνθήκες υψηλής αλατότητας με και χωρίς την εφαρμογή των βακτηριακών στελεχών Cal.f.4, Cal.l.30, Cal.r.29 και X. Τα φυτά αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό μέσο ½ MS με 0 mM, 75 mM, 150 mM και 250 mM NaCl. Οι ράβδοι αντιπροσωπεύουν το ποσοστό επιβίωσης (%) των φυτών, με τις τυπικές αποκλίσεις των τιμών ($n=3$). Τα διαφορετικά γράμματα στη μεταχείριση με την προσθήκη 150 mM NaCl στο μέσο ανάπτυξης, υποδεικνύουν τις στατιστικές σημαντικές διαφορές ($p < 0.05$) μεταξύ των εφαρμογών μετά από την πραγματοποίηση Tukey's test. Β) Επίδραση των στελεχών Cal.f.4, Cal.l.30, Cal.r.29 και X στο ολικό νωπό βάρος των φυτών *A. thaliana* Col-0, σε υπόστρωμα με και χωρίς NaCl. Τα φυτά αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό μέσο ½ MS με 0 mM και 75 mM NaCl. Οι ράβδοι αντιπροσωπεύουν το ολικό νωπό βάρος (mg) των φυτών, με τις τυπικές αποκλίσεις των τιμών ($n=12$). Τα διαφορετικά γράμματα υποδεικνύουν τις στατιστικές σημαντικές διαφορές ($p < 0.05$) μεταξύ των εφαρμογών για κάθε μεταχείριση ξεχωριστά, μετά από την πραγματοποίηση Tukey's test.

Η προσθήκη 75 mM NaCl στο μέσο ανάπτυξης μειώνει σημαντικά το βάρος των φυτών για την κάθε μεταχείριση ξεχωριστά, σε σύγκριση με τα φυτά που αναπτύσσονται σε υπόστρωμα χωρίς επιπλέον NaCl (0 mM). Ωστόσο, η εφαρμογή των βακτηρίων στο ίδιο μέσο ανάπτυξης με τα φυτά, έχει ως αποτέλεσμα τη σημαντική αύξηση του βάρους των φυτών σε σύγκριση με τα φυτά του μάρτυρα (Control). Τόσο στη μεταχείριση με την προσθήκη 75 mM NaCl, όσο και στη μεταχείριση χωρίς την προσθήκη αλατιού, το βάρος των φυτών παρουσιάζεται σημαντικά αυξημένο με την εφαρμογή των βακτηρίων.

Σύμφωνα με το Διάγραμμα 3.15B στο υπόστρωμα με την προσθήκη 75 mM NaCl, το ενδοφυτικό στέλεχος Cal.f.4 ξεχωρίζει σε σύγκριση με τα υπόλοιπα στελέχη, παρουσιάζοντας τις υψηλότερες τιμές ολικού νωπού βάρους των φυτών. Ακολουθούν τα στελέχη Cal.l.30 και Cal.r.29, ενώ τις χαμηλότερες τιμές ολικού νωπού βάρους παρουσιάζει το ριζοσφαιρικό στέλεχος X.

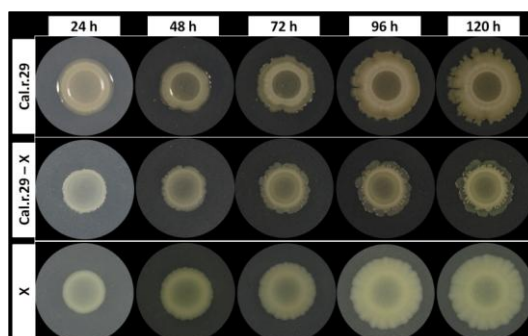
3.5.4 Συμβατότητα μυγμάτων βακτηρίων *in vitro*

Τα ενδοφυτικά βακτηριακά στελέχη του γένους *Bacillus* Cal.f.4, Cal.l.30 και Cal.r.29, καθώς και το ριζοσφαιρικό βακτήριο *Ps. carnis* X συνδυάστηκαν με τέτοιο τρόπο ώστε να δημιουργηθούν τα μίγματα βακτηρίων Cal.l.30- Cal.f.4, Cal.l.30- Cal.r.29 και Cal.r.29- X. Τα μίγματα μελετήθηκαν αρχικά για τη συμβατότητά τους σε *in vitro* συνθήκες με τη μέθοδο μικτής μακροαποικίας (mixed colony spot) και τη μέθοδο αλληλεπίδρασης των μακροαποικιών κατά ζεύγη (colony pairwise interaction).

3.5.4.1 Συμβατότητα βακτηρίων με τη μέθοδο της μικτής μακροαποικίας (mixed colony spot)

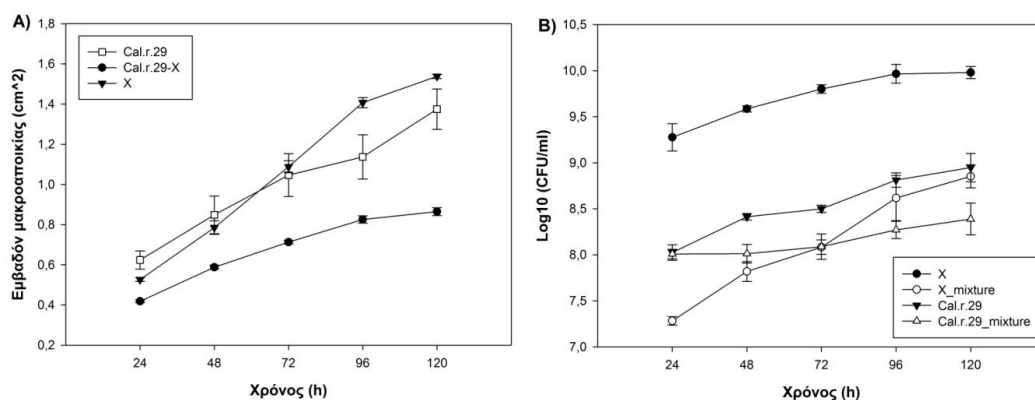
3.5.4.1.1 *Bacillus velezensis* Cal.r.29- *Pseudomonas carnis* X

Το πρώτο μίγμα που δημιουργήθηκε είναι μεταξύ του ενδοφυτικού βακτηρίου *Bacillus velezensis* Cal.r.29 και του ριζοσφαιρικού βακτηρίου *P. carnis* X. Στην Εικόνα 3.53, παρουσιάζεται η μακροαποικία του μίγματος των στελεχών Cal.r.29 και X σε αναλογία 1:1, καθώς και οι μακροαποικίες τους ως μεμονωμένα στελέχη.



Εικόνα 3.53 Μέθοδος μικτής μακροαποικίας (mixed colony spot) μεταξύ του ενδοφυτικού στελέχους Cal.r.29 και του ριζοσφαιρικού στελέχους X. Ταυτόχρονη εφαρμογή και αποτύπωση των μεμονωμένων στελεχών του μίγματος. Η παρατήρηση και αποτύπωση της αλληλεπίδρασης πραγματοποιήθηκε σε χρονικό διάστημα 5 ημερών.

Σύμφωνα με το Διάγραμμα 3.14A και τον Πίνακα 3.26, το εμβαδόν της μακροαποικίας του μίγματος είναι εμφανώς μικρότερο σε σύγκριση με εκείνο των μεμονωμένων στελεχών από τη δεύτερη ημέρα και για κάθε ημέρα παρατήρησης. Την ίδια στιγμή, στις 48 h και 72 h παρατήρησης το εμβαδόν της μεμονωμένης αποικίας του ριζοσφαιρικού βακτηρίου X δε διαφέρει σημαντικά από το εμβαδόν της μακροαποικίας του ενδοφυτικού βακτηρίου Cal.r.29. Ωστόσο, μετά τις 72 h παρατήρησης, το εμβαδόν της μακροαποικίας του βακτηρίου X είναι εμφανώς μεγαλύτερο, σε σύγκριση με του ενδοφυτικού στελέχους Cal.r.29.

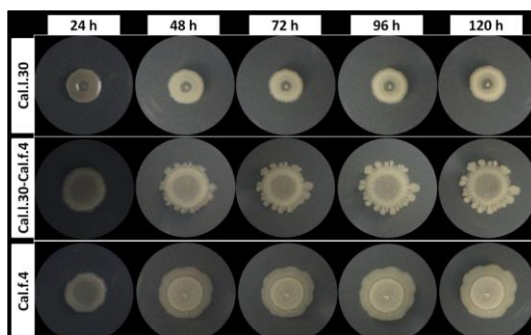


Διάγραμμα 3.13 Επίδραση της μεθόδου της μικτής μακροαποικίας (mixed colony spot) Α) στο εμβαδόν της μακροαποικίας και Β) στο λογάριθμο του αριθμού των κυττάρων των βακτηρίων Cal.r.29 και X. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο των μετρήσεων με τις τυπικές αποκλίσεις των τιμών στις 24 h, 48 h, 72 h, 96 h και 120 h παρατήρησης.

Η συγκέντρωση των βακτηρίων επηρεάστηκε επίσης από την εφαρμογή των στελεχών ως μίγμα βακτηρίων. Όπως παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 3.13B και τον Πίνακα 3.27, η εφαρμογή των βακτηρίων ως μίγμα, μειώνει σε σημαντικό βαθμό τον αριθμό των κυττάρων τους σε σύγκριση με την εφαρμογή τους ως μεμονωμένα στελέχη. Ταυτόχρονα, η συγκέντρωση των κυττάρων του X είναι μεγαλύτερη σε σχέση με του ενδοφυτικού στελέχους Cal.r.29 και στις δύο εφαρμογές του. Αξιοσημείωτη είναι η αύξηση των κυττάρων του βακτηρίου X κατά την εφαρμογή του ως μίγμα με το Cal.r.29. Συγκεκριμένα, τις πρώτες 48 h το στέλεχος Cal.r.29 παρουσιάζει μεγαλύτερο αριθμό κυττάρων σε σύγκριση με του βακτηρίου X, ενώ μετά τις 72 h η σχέση αυτή αντιστρέφεται.

3.5.4.1.2 *Bacillus halotolerans* Cal.l.30- *Bacillus halotolerans* Cal.f.4

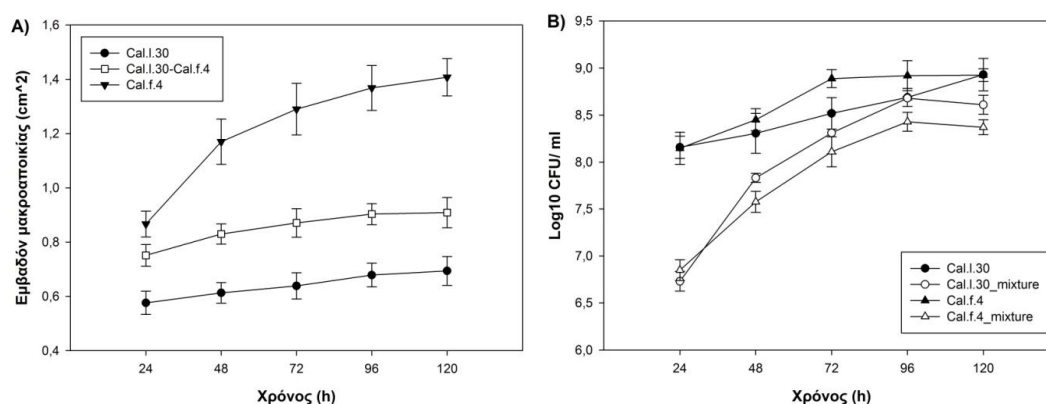
Το δεύτερο μίγμα που δημιουργήθηκε είναι μεταξύ του ενδοφυτικών βακτηρίων *Bacillus halotolerans* Cal.l.30 και *Bacillus halotolerans* Cal.f.4. Στην Εικόνα 3.54, παρουσιάζεται η μικτή μακροαποικία των στελεχών σε αναλογία 1:1, καθώς και οι μακροαποικίες τους ως μεμονωμένα στελέχη.



Εικόνα 3.54 Μέθοδος μικτής μακροαποικίας (mixed colony spot) μεταξύ των ενδοφυτικών βακτηρίων Cal.l.30 και Cal.f.4. Η παρατήρηση και αποτύπωση της αλληλεπίδρασης πραγματοποιήθηκε σε χρονικό διάστημα 5 ημερών.

Όπως παρατηρείται στην Εικόνα 3.54 και σύμφωνα με το Διάγραμμα 3.14A, το μίγμα των ενδοφυτικών βακτηρίων παρουσιάζει ενδιάμεσες τιμές εμβαδού μακροαποικίας καθ' όλες τις

ημέρες παρατήρησης. Συγκεκριμένα, το ενδοφυτικό στέλεχος Cal.f.4 εμφανίζει το υψηλότερο εμβαδόν μακροαποικίας σε σύγκριση με το Cal.l.30 στέλεχος το οποίο παρουσιάζει το χαμηλότερο εμβαδό μακροαποικίας (Πίν. 3.26).

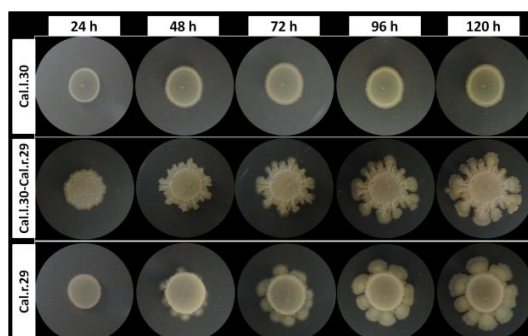


Διάγραμμα 3.14 Επίδραση της μεθόδου της μικτής μακροαποικίας (mixed colony spot) Α) στο εμβαδόν της μακροαποικίας και Β) στο λογάριθμο του αριθμού των κυττάρων των βακτηρίων Cal.l.30 και Cal.f.4. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο των μετρήσεων με τις τυπικές αποκλίσεις των τιμών στις 24 h, 48 h, 72 h, 96 h και 120 h παρατήρησης.

Ο πληθυσμός των κυττάρων επηρεάστηκε επίσης από την εφαρμογή των βακτηριακών στελεχών ως μίγμα. Όπως παρατηρείται στο Διάγραμμα 3.15B και τον Πίνακα 3.27, η συγκέντρωση των κυττάρων του Cal.l.30 και Cal.f.4 ως μεμονωμένες εφαρμογές δε διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τους κατά τις πρώτες 48 h παρατήρησης. Το ίδιο παρατηρείται και μεταξύ των στελεχών κατά την εφαρμογή τους ως μίγμα τις ίδιες ημέρες παρατήρησης. Από τις 72 h παρατήρησης και μετά, η εφαρμογή του βακτηριακού στελέχους Cal.f.4 ως μίγμα παρουσίασε τη χαμηλότερη συγκέντρωση κυττάρων σε σύγκριση με κάθε άλλη εφαρμογή. Τέλος, ο αριθμός κυττάρων των βακτηρίων Cal.l.30 και Cal.f.4 ως μεμονωμένες εφαρμογές παρουσιάζουν συνεχή αύξηση φτάνοντας και τα δύο το μέγιστο αριθμό κυττάρων την πέμπτη ημέρα παρατήρησης.

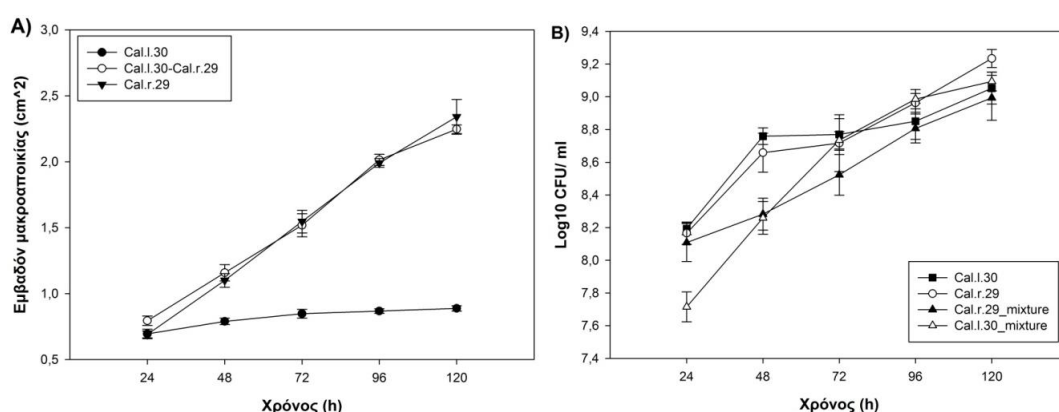
3.5.4.1.3 *Bacillus halotolerans* Cal.l.30- *Bacillus velezensis* Cal.r.29

Το τελευταίο μίγμα που δημιουργήθηκε είναι μεταξύ του ενδοφυτικών βακτηρίων *Bacillus halotolerans* Cal.l.30 και *Bacillus velezensis* Cal.r.29. Στην Εικόνα 3.55, εμφανίζεται η μικτή μακροαποικία των στελεχών Cal.l.30 και Cal.r.29 σε αναλογία 1:1, καθώς και οι μακροαποικίες τους ως μεμονωμένα στελέχη.



Εικόνα 3.55 Μέθοδος μικτής μακροαποικίας (mixed colony spot) μεταξύ των ενδοφυτικών βακτηρίων Cal.l.30 και Cal.r.29. Η παρατήρηση και αποτύπωση της αλληλεπίδρασης πραγματοποιήθηκε σε χρονικό διάστημα 5 ημερών. Ταυτόχρονα με το μίγμα έγινε η εφαρμογή και αποτύπωση των μεμονωμένων στελεχών του τις ίδιες ημέρες παρατήρησης.

Όπως παρατηρείται στην Εικόνα 3.54 και σύμφωνα με το Διάγραμμα 3.15A, από τη δεύτερη ημέρα παρατήρησης και μετά, το μεμονωμένο στέλεχος Cal.r.29 καθώς και το μίγμα Cal.r.29-Cal.l.30 εμφανίζουν το υψηλότερο εμβαδόν μακροαποικίας. Τις ίδιες ημέρες παρατήρησης το μεμονωμένο στέλεχος Cal.l.30 παρουσιάζει τις μικρότερες τιμές εμβαδού μακροαποικίας (Πίν. 3.26).



Διάγραμμα 3.15 Επίδραση της μεθόδου της μικτής μακροαποικίας (mixed colony spot) Α) στο εμβαδόν της μακροαποικίας και Β) στο λογάριθμο του αριθμού των κυττάρων των βακτηρίων Cal.r.29 και Cal.l.30. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο των μετρήσεων με τις τυπικές αποκλίσεις των τιμών στις 24 h, 48 h, 72 h, 96 h και 120 h παρατήρησης.

Ο αριθμός των κυττάρων επηρεάζεται επίσης σημαντικά από την εφαρμογή των στελεχών ως μίγμα βακτηρίων, σε σύγκριση με τη μεμονωμένη εφαρμογή τους (Διαγρ. 3.15B και Πίν. 3.27). Η συγκέντρωση του βακτηριακού στελέχους Cal.l.30 κατά την εφαρμογή του στο μίγμα μειώνεται σημαντικά κατά την πρώτη ημέρα παρατήρησης, σε αντίθεση με όλες τις υπόλοιπες εφαρμογές που εμφανίζουν ομοίως αυξημένες τιμές. Στις 48 h παρατήρησης τα βακτηριακά στελέχη Cal.l.30 και Cal.r.29 αυξάνουν εξίσου σημαντικά τον αριθμό των κυττάρων τους κατά τη μεμονωμένη τους εφαρμογή. Ταυτόχρονα, η συγκέντρωση των κυττάρων τους μειώνεται σημαντικά κατά την εφαρμογή τους ως μίγμα. Στις 72 h παρατήρησης ο αριθμός των κυττάρων όλων των εφαρμογών δε διέφερε σημαντικά μεταξύ τους. Τέλος, στις 120 h παρατήρησης η συγκέντρωση του βακτηρίου Cal.r.29 ως μεμονωμένο

στελέχος διέφερε σημαντικά σε σύγκριση με την εφαρμογή του ως μίγμα, ενώ το Cal.l.30 δεν διέφερε σημαντικά μεταξύ των εφαρμογών του.

Πίνακας 3.26 Εμβαδόν μακροαποικίας (cm²) των μεμονωμένων στελεχών αλλά και του μίγματος σε χρονικό διάστημα παρατήρησης 5 ημερών.

Βακτήρια	Εμβαδόν μακροαποικίας (cm ²)				
	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
Cal.l.30	0,5761a	0,6128a	0,6385a	0,6758a	0,6939a
Cal.l.30-Cal.f.4	0,75113b	0,8297b	0,8705b	0,9030b	0,9089b
Cal.f.4	0,8664c	0,1600c	1,2567c	1,36473c	1,3841c
Cal.l.30	0,6903a	0,7895a	0,8473a	0,8674a	0,8877a
Cal.l.30-Cal.r.29	0,6943a	1,0999b	1,5182b	1,9906b	2,2472b
Cal.r.29	0,7942b	1,1580b	1,5465b	2,0149b	2,3414b
X	0,4182a	0,5879a	0,71283a	0,8254a	0,8643a
X-Cal.r.29	0,5264b	0,7849b	1,0466b	1,1373b	1,3750b
Cal.r.29	0,6237c	0,8487b	1,0884b	1,4074c	1,5384c

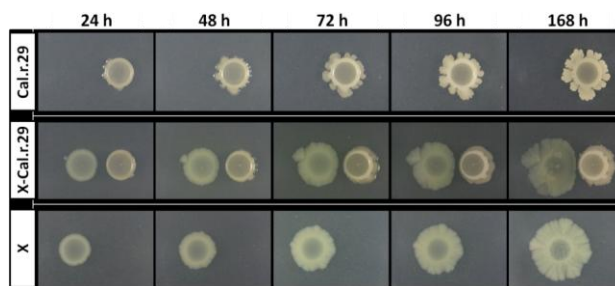
Πίνακας 3.27 Λογάριθμος του αριθμού των βακτηριακών κυττάρων (Log10 CFU/ ml) των μεμονωμένων στελεχών αλλά και του μίγματος σε χρονικό διάστημα παρατήρησης 5 ημερών.

Βακτήρια	Log10 CFU/ ml				
	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
Cal.l.30_mix	6,7311a	7,8321a	8,3099ab	8,6795b	8,6096b
Cal.l.30	8,1579b	8,3052b	8,5184b	8,6885b	8,9307c
Cal.f.4_mix	6,8504a	7,5774a	8,1093a	8,4286a	8,3702a
Cal.f.4	8,1471b	8,4505b	8,8882c	8,9197c	8,9256c
Cal.l.30_mix	7,7149a	8,2590a	8,7340a	8,9861b	9,0940ab
Cal.l.30	8,1933b	8,7592b	8,7698a	8,8504ab	9,0524ab
Cal.r.29_mix	8,1084b	8,2823a	8,5233a	8,8063a	8,9939a
Cal.r.29	8,1655b	8,6583b	8,7166a	8,9632ab	9,2341b
X_mix	7,2828a	7,8191a	8,0829a	8,6175b	8,8528b
X	9,2767c	9,5854d	9,8001c	9,9653c	9,9797c
Cal.r.29_mix	8,0093b	8,0123b	8,0884a	8,2713a	8,3894a
Cal.r.29	8,0248b	8,4139c	8,5004b	8,8127b	8,9483b

3.5.4.2 Συμβατότητα βακτηρίων με τη μέθοδο της αλληλεπίδρασης των μακροαποικιών τους κατά ζεύγη (colony pairwise interaction)

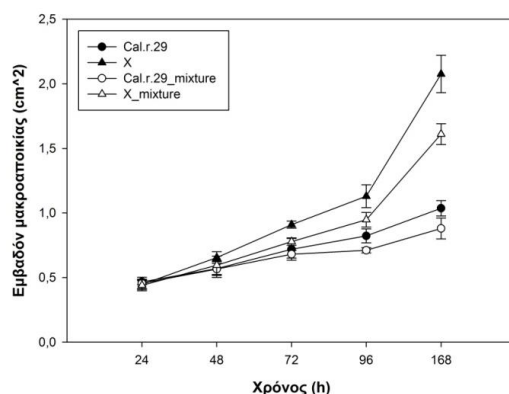
3.5.4.2.1 *Bacillus velezensis* Cal.r.29- *Pseudomonas carnis* X

Η μέθοδος της αλληλεπίδρασης των μακροαποικιών κατά ζεύγη πραγματοποιήθηκε σε αναλογία 1:1 μεταξύ των στελεχών Cal.r.29 και X. Όπως παρατηρείται και στην Εικόνα 3.56, μεταξύ των δύο στελεχών δημιουργείται μια εμφανής ζώνη περιορισμού, η οποία ωστόσο μειώνεται σημαντικά κατά τις ημέρες παρατήρησης. Τελικά, την τελευταία ημέρα παρατήρησης οι δύο αποικίες έρχονται σε επαφή.



Εικόνα 3.56 Μέθοδος της αλληλεπίδρασης των μακροαποικιών κατά ζεύγη (colony pairwise interaction) μεταξύ του ενδοφυτικού στελέχους Cal.r.29 και του ριζοσφαιρικού στελέχους X. Η παρατήρηση και αποτύπωση της αλληλεπίδρασης πραγματοποιήθηκε στις 24 h, 48 h, 72 h, 96 h και 168 h.

Ο περιορισμός της εξάπλωσης των βακτηρίων οδήγησε ταυτόχρονα στη μείωση του εμβαδού των μακροαποικιών των βακτηρίων στη μεταξύ τους αλληλεπίδραση, σε σύγκριση με τη μεμονωμένη εφαρμογή τους.

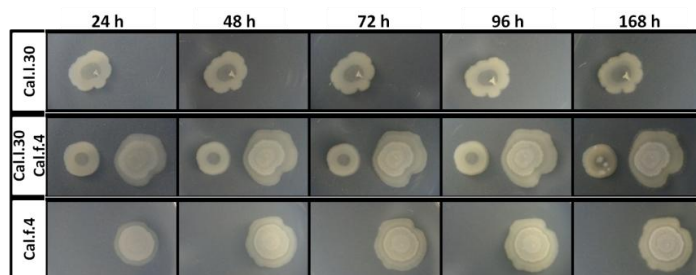


Διάγραμμα 3.16 Μέθοδος της αλληλεπίδρασης των μακροαποικιών κατά ζεύγη (colony pairwise interaction). Οι τιμές αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο του εμβαδού μακροαποικίας (cm^2) με τις τυπικές αποκλίσεις των τιμών στις 24 h, 48 h, 72 h, 96 h και 168 h παρατήρησης. Μεταξύ των τιμών της κάθε ημέρας παρατήρησης πραγματοποιήθηκε Tukey's test ($p < 0.05$).

Όπως παρατηρείται και στο Διάγραμμα 3.16 και τον Πίνακα 3.28, τις δύο πρώτες ημέρες παρατήρησης, το εμβαδόν των μακροαποικιών όλων των εφαρμογών δε διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τους. Από τις 72 h παρατήρησης και μετά, το βακτηριακό στέλεχος X κατά τη μεμονωμένη του εφαρμογή ξεχωρίζει παρουσιάζοντας το μεγαλύτερο εμβαδόν μακροαποικίας. Την ίδια στιγμή από τις 96 h συγκαλλιέργειας και μετά το βακτηριακό στέλεχος Cal.r.29, είτε ως μεμονωμένο στέλεχος είτε κατά την εφαρμογή του ανά ζεύγος, εμφανίζει το μικρότερο εμβαδόν μακροαποικίας. Την ίδια στιγμή, το βακτηριακό στέλεχος X κατά την εφαρμογή του ως μίγμα παρουσιάζει μεγαλύτερο εμβαδόν μακροαποικίας από εκείνο του Cal.r.29 και στις δύο του εφαρμογές.

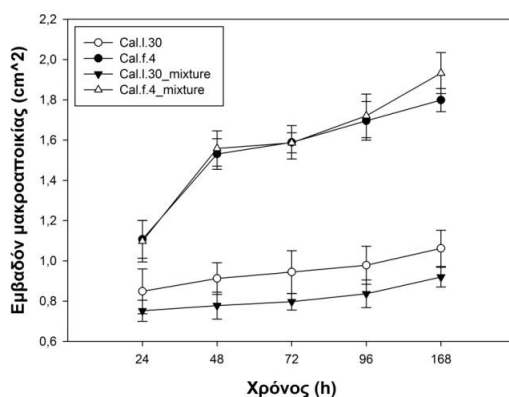
3.5.4.2.2 *Bacillus halotolerans* Cal.l.30- *Bacillus halotolerans* Cal.f.4

Η αλληλεπίδραση των μακροαποικιών κατά ζεύγη πραγματοποιήθηκε σε αναλογία 1:1 μεταξύ των στελεχών Cal.l.30 και Cal.f.4. Όπως παρατηρείται και στην Εικόνα 3.57, μεταξύ των δύο στελεχών δημιουργείται μια ζώνη περιορισμού, η οποία περιορίζει την ακτινωτή εξάπλωση των μακροαποικιών.



Εικόνα 3.57 Μέθοδος της αλληλεπίδρασης των μακροαποικιών κατά ζεύγη (colony pairwise interaction) μεταξύ του ενδοφυτικών στελεχών Cal.f.4 και Cal.l.30. Η παρατήρηση και αποτύπωση της αλληλεπίδρασης πραγματοποιήθηκε στις 24 h, 48 h, 72 h, 96 h και 168 h.

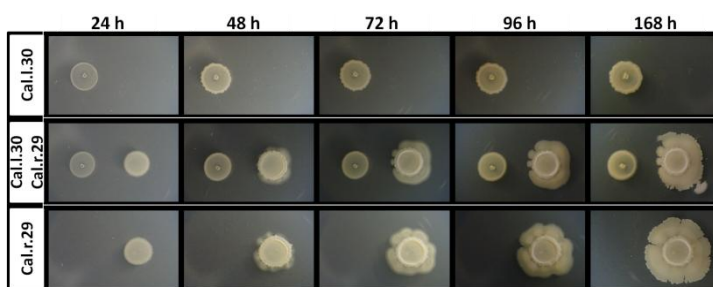
Όπως παρατηρείται στην Εικόνα 3.57 και περιγράφεται στο Διάγραμμα 3.17, ο περιορισμός της εξάπλωσης των βακτηρίων προς τη μια κατεύθυνση, δεν επηρεάζει σημαντικά το εμβαδόν των μακροαποικιών των βακτηρίων σε σύγκριση με τη μεμονωμένη εφαρμογή τους. Ταυτόχρονα, το εμβαδόν εξάπλωσης του βακτηριακού στελέχους Cal.f.4 και στις δύο εφαρμογές είναι σημαντικά μεγαλύτερο από το εμβαδόν του Cal.l.30 ανεξάρτητα της εφαρμογής του, καθ' όλες τις ημέρες παρατήρησης (Πίν. 3.28).



Διάγραμμα 3.17 Επίδραση της μεθόδου της αλληλεπίδρασης των μακροαποικιών κατά ζεύγη (colony pairwise interaction) στο εμβαδόν των μακροαποικιών. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο των μετρήσεων με τις τυπικές αποκλίσεις των τιμών στις 24 h, 48 h, 72 h, 96 h και 168 h παρατήρησης. Μεταξύ των τιμών της κάθε ημέρας παρατήρησης πραγματοποιήθηκε Tukey's test ($p < 0.05$).

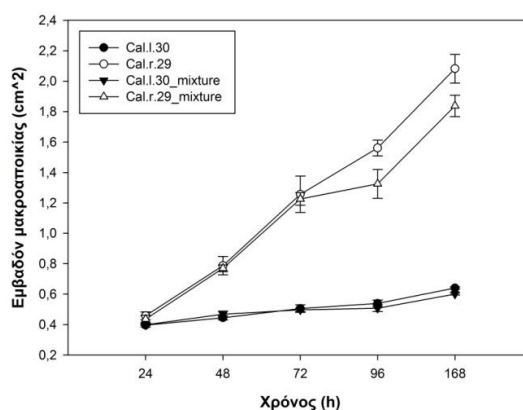
3.5.4.2.3 *Bacillus halotolerans* Cal.l.30- *Bacillus velezensis* Cal.r.29

Η αλληλεπίδραση των μακροαποικιών κατά ζεύγη πραγματοποιήθηκε σε αναλογία 1:1 μεταξύ των στελεχών Cal.l.30 και Cal.r.29. Όπως παρατηρείται και στην Εικόνα 3.58, μεταξύ των δύο στελεχών δημιουργείται μια εμφανής ζώνη περιορισμού. Η μακροαποικία κατά τη μεμονωμένη εφαρμογή του βακτηριακού στελέχους Cal.r.29 αναπτύσσεται ομαλά και με σταθερή ακτίνα. Η εφαρμογή του ωστόσο με το στέλεχος Cal.l.30, είχε ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη του βακτηρίου προς την αντίθετη κατεύθυνση από το σημείο εφαρμογής του βακτηρίου Cal.l.30. Ο περιορισμός της εξάπλωσης των βακτηρίων οδηγεί κατ' επέκταση στη μείωση του εμβαδού των μακροαποικιών των βακτηρίων στη μεταξύ τους αλληλεπίδραση σε σύγκριση με τη μεμονωμένη εφαρμογή τους.



Εικόνα 3.58 Μέθοδος της αλληλεπίδρασης των μακροαποικιών κατά ζεύγη (colony pairwise interaction) μεταξύ του ενδοφυτικών στελεχών Cal.l.30 και Cal.r.29. Η παρατήρηση και αποτύπωση της αλληλεπίδρασης πραγματοποιήθηκε στις 24 h, 48 h, 72 h, 96 h και 168 h.

Όπως περιγράφεται και στο Διάγραμμα 3.18 και τον Πίνακα 3.28, το εμβადόν εξάπλωσης του βακτηριακού στελέχους Cal.l.30 είναι σημαντικά μεγαλύτερο κατά τη μεμονωμένη εφαρμογή του, σε σύγκριση με την αλληλεπίδρασή του με το στέλεχος Cal.f.4, κάθε ημέρα παρατήρησης. Την ίδια στιγμή, η μονή εφαρμογή του ενδοφυτικού στελέχους Cal.f.4 δεν επηρεάζει σημαντικά το εμβადόν εξάπλωσης της μακροαποικίας του στο σύνολο των ημερών παρατήρησης.



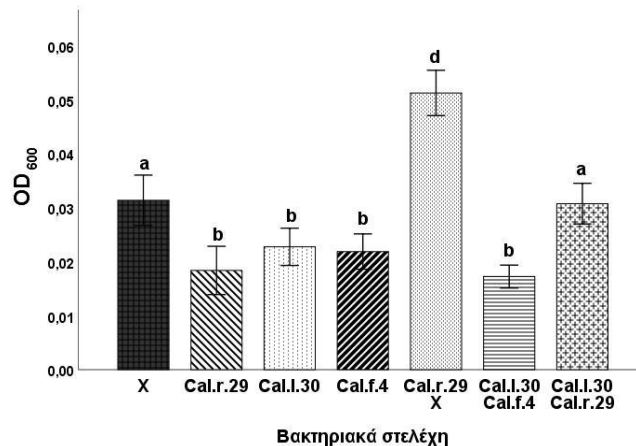
Διάγραμμα 3.18 Επίδραση της μεθόδου της αλληλεπίδρασης των μακροαποικιών κατά ζεύγη (colony pairwise interaction) στο εμβάδόν των μακροαποικιών. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο των μετρήσεων με τις τυπικές αποκλίσεις των τιμών στις 24 h, 48 h, 72 h, 96 h και 168 h παρατήρησης.

Βακτήρια	Χρόνος παρατήρησης (h)				
	24 h	48 h	72 h	96 h	168 h
Cal.l.30_mixture	0,7519a	0,7775a	0,7970a	0,8362a	0,9193a
Cal.l.30	0,8486a	0,9121a	0,9441a	0,9783a	1,0616a
Cal.f.4_mixture	1,0975b	1,3251b	1,5866b	1,6957b	1,8992b
Cal.f.4	1,1071b	1,5308b	1,5889b	1,7208c	1,7987b
Cal.l.30_mixture	0,3989a	0,4685a	0,4971a	0,5079a	0,6005a
Cal.l.30	0,3963a	0,4448a	0,5057a	0,5391a	0,6404a
Cal.r.29_mixture	0,4365ab	0,7700b	1,2262b	1,325b	1,8375b
Cal.r.29	0,4586b	0,7875b	1,2560b	1,561c	2,0822c
X_mixture	0,4398a	0,5953a	0,7781a	0,9471b	1,6107b
X	0,4461a	0,6545a	0,9094b	1,1302c	2,0757c
Cal.r.29_mixture	0,4553a	0,5655a	0,6804a	0,7107a	0,8794a
Cal.r.29	0,4661a	0,5689a	0,7187a	0,8225ab	1,0360a

Πίνακας 3.28 Εμβάδόν μακροαποικίας (cm²) των μεμονωμένων στελεχών αλλά και του μίγματος σε χρονικό διάστημα παρατήρησης 5 ημερών.

3.5.4.3 Επίδραση των μιγμάτων βακτηρίων στο σχηματισμό βιοϋμενίου *in vitro*

Ο σχηματισμός βιοϋμενίου παίζει σημαντικό ρόλο στην ικανότητα των βακτηρίων να προσκολλούνται σε επιφάνειες, συμπεριλαμβανομένων των εδαφικών συσσωματωμάτων και των επιφανειών των ριζών. Τα μίγματα των βακτηρίων που δημιουργήθηκαν (Cal.l.30-Cal.f.4, Cal.l.30-Cal.r.29 και X-Cal.r.29), μελετήθηκαν για την επίδρασή τους στο σχηματισμό βιοϋμενίου σε σύγκριση με τα μεμονωμένα τους στελέχη.



Διάγραμμα 3.19 Σχηματισμός βιοϋμενίου σε *in vitro* συνθήκες από τα μεμονωμένα στελέχη Cal.l.30, Cal.f.4, Cal.r.29 και X αλλά και τα μίγματά τους Cal.l.30-Cal.f.4, Cal.r.29-Cal.l.30 και Cal.r.29-X. Οι ράβδοι αντιπροσωπεύουν την απορρόφηση της χρωστικής Crystal violet σε OD₆₀₀ για κάθε μεμονωμένο στέλεχος αλλά και μίγμα βακτηρίων, με τις τυπικές αποκλίσεις των τιμών ($n=8$). Τα διαφορετικά γράμματα υποδεικνύουν τις στατιστικώς σημαντικές διαφορές ($p < 0.05$) μεταξύ των μεταχειρίσεων μετά από την πραγματοποίηση Tukey's test.

Όπως παρατηρείται και στο Διάγραμμα 3.19 τα μεμονωμένα ενδοφυτικά βακτήρια του γένους *Bacillus* (Cal.l.30-Cal.f.4 και Cal.r.29), δε διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τους ως προς την προσκολλητική τους ικανότητα σε *in vitro* συνθήκες. Αντίθετα, το ριζοσφαιρικό βακτήριο X ξεχωρίζει σε σύγκριση με τα υπόλοιπα στελέχη, εμφανίζοντας την υψηλότερη τιμή απορρόφησης και κατ' επέκταση την ισχυρότερη ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου.

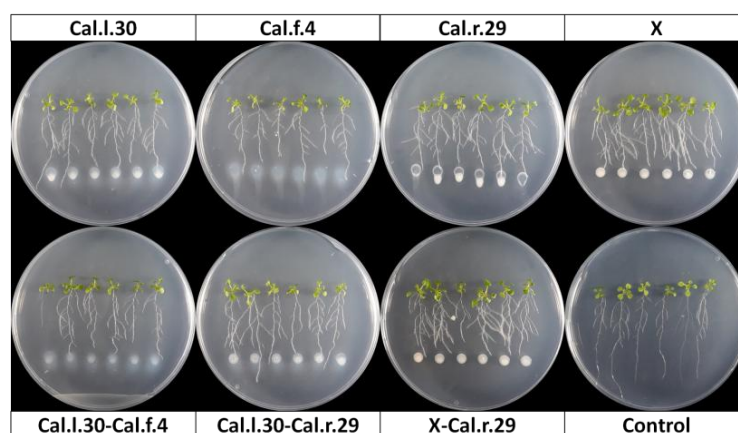
Το μίγμα των βακτηριακών στελεχών Cal.l.30- Cal.f.4, όσο και τα μεμονωμένα του στελέχη παρουσιάζουν όμοια ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου. Σε αντίθετη περίπτωση, το μίγμα των ενδοφυτικών βακτηρίων Cal.l.30-Cal.r.29 του γένους *Bacillus*, αυξάνει σημαντικά την προσκολλητική του ικανότητα, σε σύγκριση με τα μεμονωμένα του στελέχη. Τέλος, το μίγμα του ριζοσφαιρικού βακτηρίου X και του ενδοφυτικού στελέχους Cal.r.29 παρουσιάζει τις υψηλότερες τιμές απορρόφησης σε σχέση με τα μεμονωμένα του στελέχη αλλά και με όλες τις υπόλοιπες μεταχειρίσεις, παρουσιάζοντας ισχυρή ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου.

3.5.5 Εφαρμογή των βακτηριακών στελεχών Cal.r.29, Cal.l.30, Cal.f.4 και X ως μίγματα βακτηρίων σε φυτά *Arabidopsis thaliana* Col-0 *in vitro*

Τα μίγματα βακτηρίων που δημιουργήθηκαν και μελετήθηκαν ως προς την *in vitro* συμβατότητά τους, εφαρμόστηκαν σε φυτά *Arabidopsis thaliana*. Σκοπός αυτής της εφαρμογής, ήταν η μελέτη της επίδρασης των βακτηριακών στελεχών Cal.l.30, Cal.r.29, Cal.f.4 και X, ως μεμονωμένα στελέχη αλλά και ως μίγματα βακτηρίων (Cal.l.30-Cal.f.4, Cal.l.30-Cal.r.29 και X-Cal.r.29) στην ανάπτυξη και την αρχιτεκτονική της ρίζας των φυτών, καθώς και στην ικανότητα των βακτηρίων να αποικίζουν τη ρίζα.

3.5.5.1 Επίδραση των βακτηρίων στη ανάπτυξη και τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των φυτών

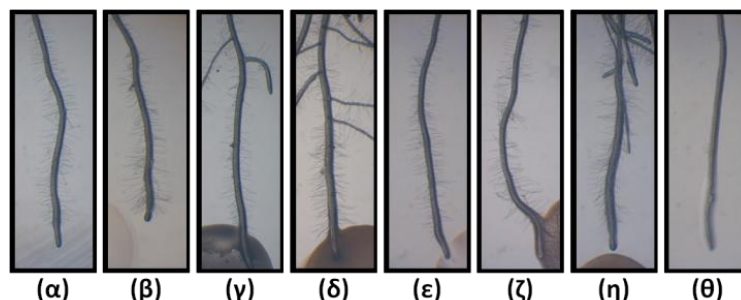
Τα μίγματα βακτηρίων που δημιουργήθηκαν αλλά και τα μεμονωμένα στελέχη αυτών, εμβολιάστηκαν σε προβλαστημένα φυτάρια *A. thaliana* Col-0 σε απόσταση 3 cm από το ακρορρίζιο. Όπως παρουσιάζεται και στην Εικόνα 3.59 όλες οι εφαρμογές των βακτηρίων επηρεάζουν σημαντικά τα μορφολογικά χαρακτηριστικά της ρίζας και την ανάπτυξη των φυτών, σε σύγκριση με τα φυτά μάρτυρες.



Εικόνα 3.59 Εφαρμογή των μεμονωμένων στελεχών Cal.l.30, Cal.f.4, Cal.r.29 και X καθώς και των μιγμάτων Cal.l.30-Cal.f.4, Cal.l.30-Cal.r.29 και X-Cal.r.29 σε φυτά *A. thaliana* *in vitro*.

Σε κάθε περίπτωση η εφαρμογή των μιγμάτων βακτηρίων Cal.l.30-Cal.f.4, Cal.l.30-Cal.r.29 και Cal.r.29-X, όσο και των μεμονωμένων στελεχών τους, αυξάνουν σημαντικά το ολικό νωπό βάρος των φυτών, ενώ επηρεάζουν ταυτόχρονα την αρχιτεκτονική της ρίζας (Πίν. 3.29). Συγκεκριμένα, μειώνουν το μήκος της κεντρικής ρίζας, αυξάνοντας παράλληλα το συνολικό αριθμό πλευρικών ριζών και τον αριθμό των ριζικών τριχιδίων (Πίν. 3.29). Όπως απεικονίζεται και στην Εικόνα 3.60, ο αριθμός ριζικών τριχιδίων των φυτών *Arabidopsis*

thaliana Col-0, αυξάνεται σημαντικά μετά την εφαρμογή των βακτηρίων είτε ως μεμονωμένα στελέχη, είτε ως μίγματα βακτηρίων σε σύγκριση με τα φυτά μάρτυρες.



Εικόνα 3.60 Στερεοσκοπική απεικόνιση του ακρορρίζιου των φυτών *A. thaliana* μετά την *in vitro* εφαρμογή των μεμονωμένων στελεγχών Cal.f.4 (α), Cal.l.30 (β), Cal.r.29 (γ) και X (δ), των μιγμάτων Cal.l.30-Cal.f.4 (ε), Cal.l.30-Cal.r.29 (ζ) και X-Cal.r.29 (η) και των φυτών του μάρτυρα (Control) (θ), σε απόσταση 3 cm από το ακρορρίζιο των φυτών.

Όπως παρουσιάζεται και στον Πίνακα 3.29, το μίγμα των ενδοφυτικών βακτηρίων Cal.l.30 και Cal.f.4 αυξάνει σημαντικά το ολικό νωπό βάρος των φυτών, παρουσιάζοντας την υψηλότερη τιμή (7,72 mg) σε σύγκριση με τα μεμονωμένα του στελέχη όσο και με τα φυτά μάρτυρες (4,83 mg). Ταυτόχρονα, επηρεάζει θετικά και τα μορφολογικά χαρακτηριστικά της ρίζας, εμφανίζοντας μαζί με το μεμονωμένο στέλεχος Cal.f.4, το μικρότερο μήκος κεντρικής ρίζας (3,16 cm). Ο συνολικός αριθμός πλευρικών ριζών αυξάνει σημαντικά τόσο κατά την εφαρμογή του μίγματος όσο και των μεμονωμένων στελεγχών του. Το βακτηριακό στέλεχος Cal.l.30 εμφανίζει τον υψηλότερο αριθμό ριζικών τριχιδίων (Εικ. 3.60β) σε σύγκριση με το ενδοφυτικό στέλεχος Cal.f.4 (Εικ. 3.60α) όσο και το μίγμα τους Cal.l.30-Cal.f.4 (Εικ. 3.60ε), με τις δύο τελευταίες μεταχειρίσεις να παρουσιάζουν ανάλογες τιμές ριζικών τριχιδίων.

Πίνακας 3.29 Επίδραση των βακτηρίων Cal.l.30, Cal.f.4, Cal.r.29 και X στα μορφολογικά χαρακτηριστικά και την ανάπτυξη του φυτού *A. thaliana* Col-0. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο των μετρήσεων και τις τυπικές αποκλίσεις των τιμών. Τα διαφορετικά γράμματα υποδεικνύουν στατιστικές σημαντικές διαφορές ($p < 0.05$) μεταξύ των τιμών για το κάθε μίγμα και τα μεμονωμένα του στελέχη ξεχωριστά, μετά από πραγματοποίηση Tukey's test.

Εφαρμογές βακτηρίων	Ολικό νωπό βάρος (mg)	Μήκος κεντρικής ρίζας (cm)	Αριθμός πλευρικών ριζών (N)	Αριθμός ριζικών τριχιδίων (N)
Μάρτυρας	4,83 ± 1,14a	7,29 ± 0,09a	6,67 ± 1,67a	37,17 ± 4,36a
Cal.l.30	6,14 ± 1,08ab	3,39 ± 0,11b	8,33 ± 1,67ab	197,00 ± 12,00c
Cal.f.4	6,12 ± 1,72ab	3,16 ± 0,15c	7,58 ± 1,78ab	186,33 ± 9,54bc
Cal.l.30-Cal.f.4	7,72 ± 1,50b	3,16 ± 0,09c	9,08 ± 2,07b	180,00 ± 7,10b
Μάρτυρας	4,83 ± 1,14a	7,29 ± 0,09a	6,67 ± 1,67a	37,17 ± 4,36a
Cal.l.30	6,14 ± 1,08ab	3,39 ± 0,11c	8,33 ± 1,67a	197,00 ± 12,00c
Cal.r.29	7,17 ± 1,44b	3,12 ± 0,10d	8,92 ± 2,84a	159,67 ± 11,76b
Cal.l.30-Cal.r.29	7,61 ± 2,31b	3,57 ± 0,38b	8,50 ± 2,07a	180,67 ± 10,69c
Μάρτυρας	4,83 ± 1,14a	7,29 ± 0,09a	6,67 ± 1,67a	37,17 ± 4,36a
X	10,60 ± 2,89c	3,19 ± 0,13b	11,25 ± 2,86b	187,83 ± 12,81c
Cal.r.29	7,17 ± 1,44ab	3,12 ± 0,10b	8,92 ± 2,84ab	159,67 ± 11,76b
X-Cal.r.29	9,08 ± 2,22bc	3,08 ± 0,12b	11,08 ± 3,48b	182,17 ± 9,13c

Το μίγμα Cal.l.30-Cal.r.29 όσο και τα μεμονωμένα του στελέχη, αύξησαν εξίσου σημαντικά το νωπό βάρος καθώς και τον αριθμό πλευρικών ριζών των φυτών κατά την

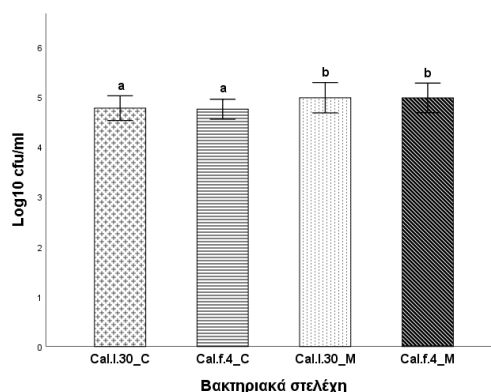
εφαρμογή τους στα φυτά *A. thaliana* (Πιν. 3.29). Οι εφαρμογές του μίγματος όσο και του στελέχους Cal.l.30, παρουσιάζουν τις υψηλότερες τιμές του συνολικού αριθμού ριζικών τριχιδίων (Εικ. 3.60β και 3.60ζ), με τις αντίστοιχες τιμές από την εφαρμογή του μεμονωμένου στελέχους Cal.r.29 να είναι εμφανώς μικρότερες (Εικ. 3.60γ).

Τέλος, η εφαρμογή του μίγματος X-Cal.r.29 έχει ως αποτέλεσμα τη σημαντική αύξηση του ολικού νωπού βάρους των φυτών καθώς και του συνολικού αριθμού ριζικών τριχιδίων. Τόσο το μίγμα όσο και το μεμονωμένο ριζοσφαιρικό στέλεχος X εμφανίζει τις υψηλότερες τιμές ολικού νωπού βάρους, με τιμές 9,08 mg και 10,60 mg αντίστοιχα, σε σύγκριση με το στέλεχος Cal.r.29 (7,17 mg) και τα φυτά του μάρτυρα 4,83 mg. Τα μεμονωμένα στελέχη Cal.r.29 και X όσο και το μίγμα τους, μείωσε εξίσου σημαντικά το μήκος της κεντρικής ρίζας των φυτών *Arabidopsis thaliana* ενώ ταυτόχρονα αύξησαν εξίσου σημαντικά το συνολικό αριθμό πλευρικών ριζών. Τέλος, ο συνολικός αριθμός ριζικών τριχιδίων αυξήθηκε το ίδιο σημαντικά με την εφαρμογή του μεμονωμένου στελέχους X (Εικ. 3.60δ) όσο και του μίγματος X-Cal.r.29 (Εικ. 3.60η), ενώ ο αριθμός ριζικών τριχιδίων μετά την εφαρμογή του στελέχους Cal.r.29 είναι σε σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα (Εικ. 3.60θ).

3.5.5.2 Αποικισμός των ριζών του φυτού *A. thaliana*

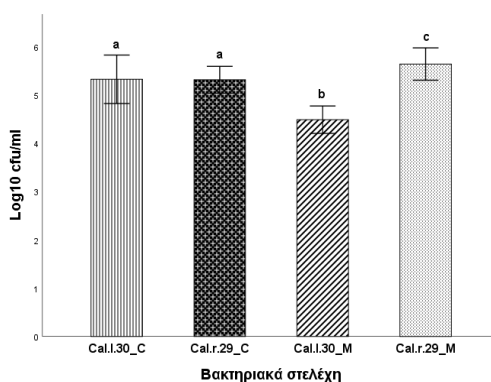
Τα επιλεγμένα βακτηριακά στελέχη όσο και τα μίγματα αυτών, μελετήθηκαν στη συνέχεια για την ικανότητά τους να αποικίζουν τη ρίζα των φυτών *Arabidopsis thaliana* Col-0, σε *in vitro* συνθήκες. Κάθε ένα από τα τρία μίγματα όσο και τα αντίστοιχα μεμονωμένα τους στελέχη, μελετήθηκαν ξεχωριστά για την ικανότητά τους να αποικίζουν τη ρίζα των φυτών μετά από 18 h συγκαλλιέργειας.

Όπως παρατηρείται στο Διάγραμμα 3.20, ο αριθμός των βακτηριακών κυττάρων των στελεχών Cal.l.30 και Cal.f.4 ως μεμονωμένα στελέχη (Cal.l.30_C και Cal.f.4_C αντίστοιχα) που προσκολλήθηκαν στη ρίζα των φυτών *A. thaliana*, δεν εμφάνισε στατιστικές σημαντικές διαφορές μεταξύ τους. Η εφαρμογή των δύο στελεχών ως μίγμα βακτηρίων, είχε ως αποτέλεσμα την ταυτόχρονη και όμοια αύξηση των προσκολλημένων κυττάρων και των δύο στελεχών (Cal.l.30_M και Cal.f.4_M), μετά από 18 h συγκαλλιέργειας. Και στις δύο περιπτώσεις, η εφαρμογή των βακτηριακών στελεχών ως μίγμα είχε ως αποτέλεσμα την αυξημένη προσκόλληση των κυττάρων τους στη ρίζα των φυτών, σε σύγκριση με την εφαρμογή τους ως μεμονωμένα στελέχη.



Διάγραμμα 3.20 Προσκόλληση των βακτηριακών κυττάρων των στελεχών Cal.l.30 και Cal.f.4 σε ρίζες του φυτού *A. thaliana* κατά την εφαρμογή τους ως μεμονωμένα στελέχη (Cal.l.30_C και Cal.f.4_C) και μίγμα μεταξύ τους (Cal.l.30_M και Cal.f.4_M). Απεικόνιση του λογαριθμικού αριθμού προσκολλημένων βακτηριακών κυττάρων (Log_{10} Cfu/ ml) σε συνάρτηση με την κάθε μεταχείριση. Οι ράβδοι αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο του αριθμού των κυττάρων με τις τυπικές αποκλίσεις των τιμών ($n=8$). Τα διαφορετικά γράμματα υποδεικνύουν τις στατιστικές σημαντικές διαφορές ($p < 0.05$) μεταξύ των μεταχειρίσεων μετά από την πραγματοποίηση Tukey's test.

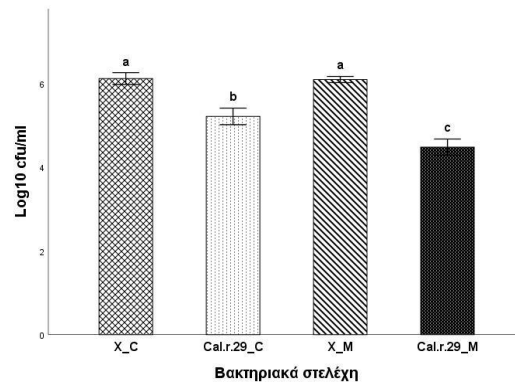
Όπως παρουσιάζεται και στο Διάγραμμα 3.21, ο αριθμός των προσκολλημένων κυττάρων του μίγματος Cal.l.30-Cal.r.29 στο ριζικό σύστημα των φυτών, δε διαφέρει σημαντικά κατά την εφαρμογή τους ως μεμονωμένα στελέχη (Cal.l.30_C και Cal.r.29_C). Αξιοσημείωτα είναι τα αποτελέσματα που προέκυψαν μετά την εφαρμογή των βακτηριακών στελεχών ως μίγμα βακτηρίων. Συγκεκριμένα παρατηρείται σημαντική μείωση των προσκολλημένων κυττάρων του στελέχους Cal.l.30 (Cal.l.30_M) στην επιφάνεια των ριζών, με ταυτόχρονη ωστόσο αύξηση των προσκολλημένων κυττάρων του στελέχους Cal.r.29 (Cal.r.29_M).



Διάγραμμα 3.21 Προσκόλληση των βακτηριακών κυττάρων των στελεχών Cal.l.30 και Cal.r.29 σε ρίζες του φυτού *A. thaliana* κατά την εφαρμογή τους ως μεμονωμένα στελέχη (Cal.l.30_C και Cal.r.29_C) και μίγμα μεταξύ τους (Cal.l.30_M και Cal.r.29_M). Απεικόνιση του λογαριθμικού αριθμού προσκολλημένων βακτηριακών κυττάρων (Log_{10} Cfu/ ml) σε συνάρτηση με την κάθε μεταχείριση. Οι ράβδοι αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο του αριθμού των κυττάρων με τις τυπικές αποκλίσεις των τιμών ($n=8$). Τα διαφορετικά γράμματα υποδεικνύουν τις στατιστικές σημαντικές διαφορές ($p < 0.05$) μεταξύ των μεταχειρίσεων μετά από την πραγματοποίηση Tukey's test.

Σε σύγκριση με τα προηγούμενα μίγματα, το μίγμα των βακτηρίων *P. carnis* X και Cal.r.29 εμφανίζει πολύ διαφορετικά αποτελέσματα. Όπως παρατηρείται στο Διάγραμμα 3.22, ο αριθμός των προσκολλημένων κυττάρων του ριζοσφαιρικού βακτηρίου *P. carnis* X δε διαφέρει σημαντικά κατά την εφαρμογή του είτε ως μεμονωμένο στέλεχος (X_C), είτε κατά την εφαρμογή του σε μίγμα (X_M) με το ενδοφυτικό βακτήριο Cal.r.29. Αντιθέτως, ο

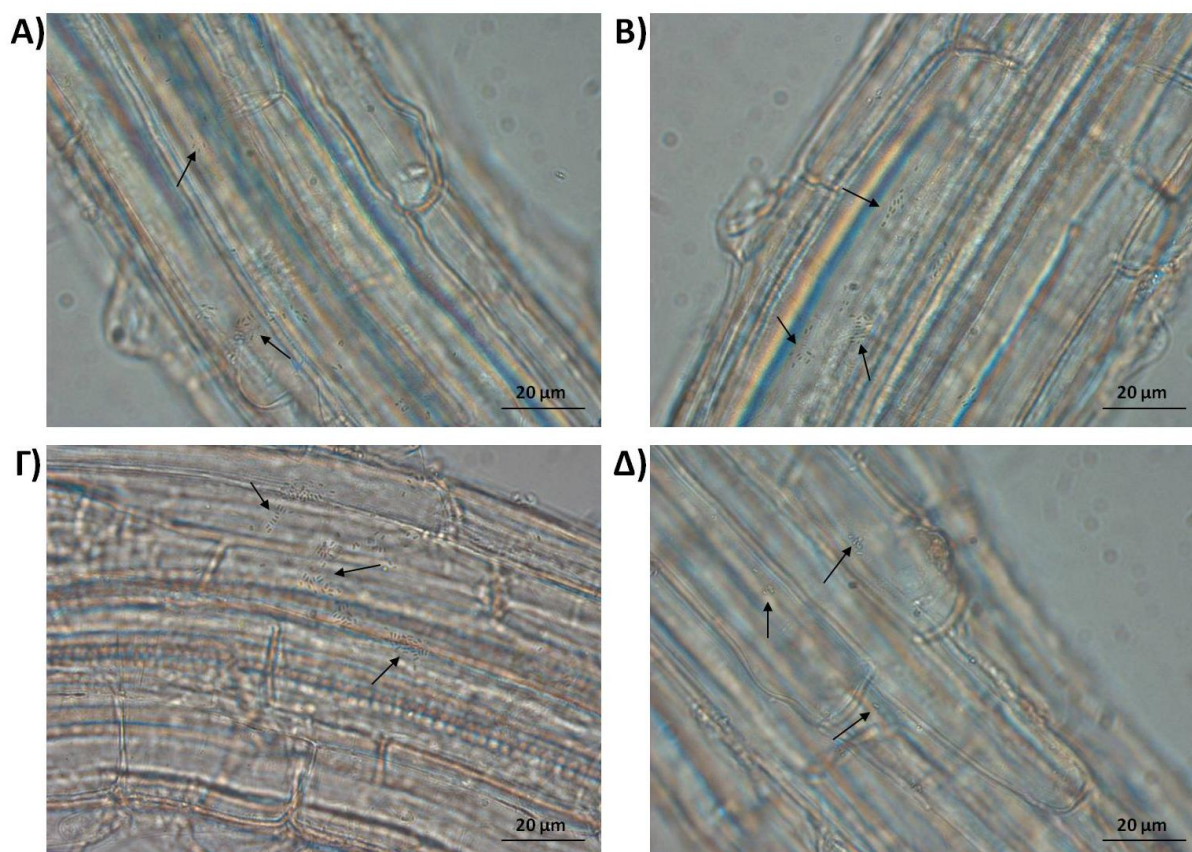
αριθμός των προσκολλημένων κυττάρων του ενδοφυτικού βακτηρίου Cal.r.29 μειώνεται σημαντικά κατά την εφαρμογή του ως μίγμα (Cal.r.29_M) με το *P. carnis* X, σε σύγκριση με την εφαρμογή του ως μεμονωμένο στελέχος (Cal.r.29_C). Την ίδια στιγμή ο αριθμός των προσκολλημένων κυττάρων του Cal.r.29 στελέχους είναι σημαντικά μικρότερος σε σύγκριση με τον αριθμό των κυττάρων του *P. carnis* X και στις δύο εφαρμογές.



Διάγραμμα 3.22 Προσκόλληση των βακτηριακών κυττάρων των στελεχών Cal.r.29 και X σε ρίζες του φυτού *A. thaliana* κατά την εφαρμογή τους ως μεμονωμένα στελέχη (Cal.r.29_C και X) και μίγμα μεταξύ τους (Cal.r.29_M και X_M). Απεικόνιση του λογαριθμικού αριθμού προσκολλημένων βακτηριακών κυττάρων (Log₁₀ Cfu/ ml) σε συνάρτηση με την κάθε μεταχείριση. Οι ράβδοι αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο του αριθμού των κυττάρων με τις τυπικές αποκλίσεις των τιμών (n= 8). Τα διαφορετικά γράμματα υποδεικνύουν τις στατιστικές σημαντικές διαφορές ($p < 0.05$) μεταξύ των μεταχειρίσεων μετά από την πραγματοποίηση Tukey's test.

3.5.5.2.1 Μικροσκοπική παρατήρηση των προσκολλημένων βακτηριακών κυττάρων στις ρίζες των φυτών *A. thaliana*

Σε συνέχεια της προηγούμενης εφαρμογής των βακτηρίων Cal.l.30, Cal.f.4, Cal.r.29 και X σε φυτά *A. thaliana*, ακολούθησε η μικροσκοπική παρατήρηση των προσκολλημένων τους κυττάρων σε όλη την έκταση της ρίζας, όπως παρατηρείται στην Εικόνα 3.61.

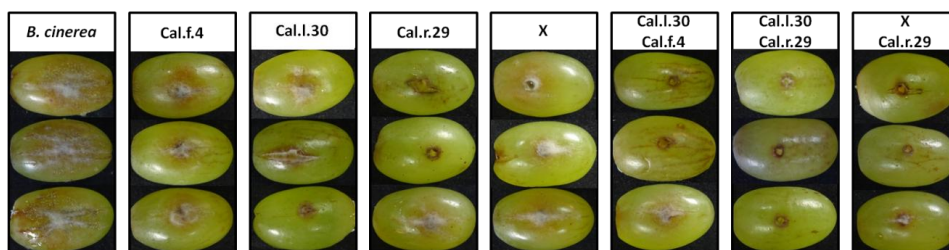


Εικόνα 3.61 Αποικισμός της ρίζας του φυτού *Arabidopsis thaliana* Col-0 από τα βακτηριακά στελέχη A) Cal.l.30, B) Cal.f.4, Γ) Cal.r.29 και Δ) *P. carnis* X (Κλίμακα: 20 μm).

Στις εικόνες 3.61A-Δ αποτυπώνονται σε οπτικό μικροσκόπιο με φίλτρο αντίθεσης φάσης τα βακτηριακά κύτταρα των στελεχών Cal.l.30, Cal.f.4, Cal.r.29 και X αντίστοιχα, τα οποία προσκολλήθηκαν στην επιφάνεια των ριζών *A. thaliana*, μετά τον *in vitro* εμβολιασμό τους. Ο εκτεταμένος αποικισμός της ρίζας παρατηρείται είτε από μεμονωμένα, είτε από συστάδες βακτηριακών κυττάρων σε όλο το μήκος της ρίζας.

3.5.6 Βιολογική προστασία καρπών επιτραπέζιου σταφυλιού (detached fruit assay) από το φυτοπαθογόνο μύκητα *Botrytis cinerea* μετά την εφαρμογή μεμονωμένων και μιγμάτων βακτηρίων

Τα ενδοφυτικά στελέχη Cal.r.29, Cal.l.30, Cal.f.4 και το ριζοσφαιρικό βακτήριο *P. carnis* X, εφαρμόστηκαν είτε ως μεμονωμένα στελέχη είτε ως μίγματα βακτηρίων σε καρπούς σταφυλιού για τη βιολογική αντιμετώπιση του φυτοπαθογόνου μύκητα *Botrytis cinerea* (Εικ. 3.62). Συγκεκριμένα, μελετήθηκε η επίδραση των βακτηρίων στην ελάττωση της σοβαρότητας της ασθένειας μετά την εφαρμογή τους σε καρπούς σταφυλιού, με τη μέθοδο detached fruit assay. Η εφαρμογή των βακτηρίων προηγήθηκε εκείνης του φυτοπαθογόνου μύκητα κατά δύο ημέρες.



Εικόνα 3.62 Βιολογική αντιμετώπιση του φυτοπαθογόνου μύκητα *Botrytis cinerea* σε καρπούς σταφυλιού με τη μέθοδο detached fruit assay. Εφαρμογή των βακτηριακών στελεχών Cal.l.30, Cal.f.4, Cal.r.29 και X ως μεμονωμένα στελέχη και των μιγμάτων Cal.l.30-Cal.f.4, Cal.l.30-Cal.r.29 και Cal.r.29-X, δύο ημέρες πριν την εφαρμογή του μύκητα.

Όπως παρουσιάζεται και στο Διάγραμμα 3.28Α το βακτηριακό στέλεχος Cal.r.29 παρουσιάζει το χαμηλότερο ποσοστό μολυσμένων καρπών, μειώνοντας σημαντικά τη ένταση της ασθένειας (Disease incidence, DI). Η εφαρμογή του είτε ως μεμονωμένο στέλεχος είτε ως μίγμα με το βακτήριο *P. carnis* X, παρουσιάζει εξίσου χαμηλό ποσοστό μολυσμένων καρπών. Ακολουθούν οι εφαρμογές του μεμονωμένου στελέχους Cal.l.30, όσο και των μιγμάτων του Cal.l.30-Cal.f.4 και Cal.l.30-Cal.r.29, εμφανίζοντας εξίσου σημαντικά μειωμένη συχνότητα της ασθένειας. Τέλος, η εφαρμογή του μεμονωμένων βακτηριακών στελεχών Cal.f.4 και X δε μειώνει σημαντικά τη συχνότητα της ασθένειας, παρουσιάζοντας ανάλογο αριθμό μολυσμένων καρπών σε σύγκριση με τη μεταχείριση με το φυτοπαθογόνο μύκητα.

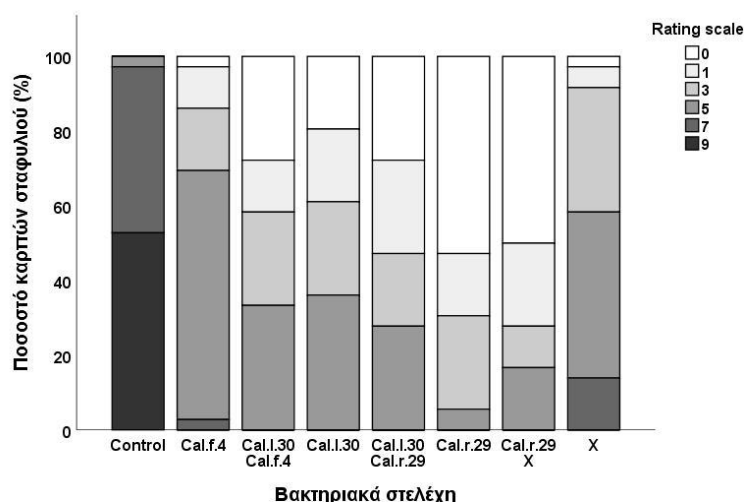
Ταυτόχρονα, με τη μείωση του συνολικού αριθμού μολυσμένων καρπών, η εφαρμογή των ανταγωνιστικών βακτηρίων μειώνει σημαντικά το εμβαδόν κάλυψης των καρπών από το φυτοπαθογόνο μύκητα. Όπως παρουσιάζεται και στην Εικόνα 3.63, από την εφαρμογή των βακτηρίων προκύπτει μια διαβαθμισμένη εξάπλωση του φυτοπαθογόνου μύκητα στους μελετώμενους καρπούς, με αποτέλεσμα τον υπολογισμό της σοβαρότητας της ασθένειας

(Disease Severity, DS), εκφρασμένη σε ποσοστιαία διαβαθμισμένη κλίμακα (Rating scale) με τιμές: 0= υγιής καρπός, 1= 1-10 %, 3= 11-25 %, 5= 26-50%, 7= 51-75 % και 9= >75 %.



Εικόνα 3.63 Κλίμακα διαβάθμισης της σοβαρότητας της ασθένειας του φυτοπαθογόνου μύκητα *Botrytis cinerea* μετά την εφαρμογή των ανταγωνιστικών βακτηρίων με τη μέθοδο detached fruit assay σε καρπούς σταφυλιού.

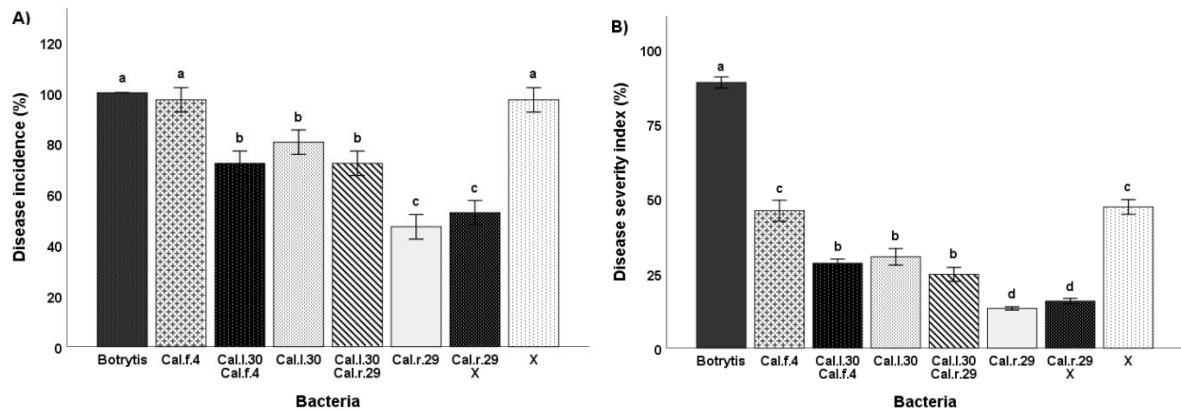
Σύμφωνα με την παραπάνω κλίμακα διαβάθμισης της ασθένειας υπολογίσθηκε το ποσοστό των καρπών που ανήκουν σε κάθε τιμή της κλίμακας, για κάθε μεταχείριση ξεχωριστά. Σύμφωνα με το Διάγραμμα 3.23, όλες οι εφαρμογές των βακτηρίων είτε ως μεμονωμένα στελέχη είτε ως μίγματα βακτηρίων, δεν παρουσιάζουν καρπούς στην τιμή 9 της κλίμακας διαβάθμισης της σοβαρότητας της ασθένειας. Την ίδια στιγμή οι μεταχειρίσεις με τα μεμονωμένα στελέχη Cal.l.30 και Cal.r.29, αλλά και των μιγμάτων όπου εμπλέκονται (Cal.l.30-Cal.r.29, Cal.l.30-Cal.f.4 και Cal.r.29-X), εμφανίζουν μολυσμένους καρπούς μόνο στις τιμές 1, 3 και 5 της κλίμακας. Τέλος, οι μοναδικές εφαρμογές που παρουσιάζουν μολυσμένους καρπούς στην τιμή 7 της διαβαθμισμένης κλίμακας σοβαρότητας της ασθένειας, είναι με τα μεμονωμένα βακτηριακά στελέχη Cal.f.4 και X.



Διάγραμμα 3.23 Ποσοστό καρπών (%) ανά τιμή της κλίμακας βαθμονόμησης της σοβαρότητας της ασθένειας του φυτοπαθογόνου μύκητα *Botrytis cinerea* μετά την εφαρμογή των ανταγωνιστικών βακτηρίων σε καρπούς σταφυλιού.

Με τη βοήθεια της διαβαθμισμένης κλίμακας της σοβαρότητας της ασθένειας, μελετήθηκε η επίδραση των βακτηρίων στο δείκτη της σοβαρότητας της ασθένειας (Disease Severity Index, DSI). Σύμφωνα με το Διάγραμμα 3.24B, όλες οι μεταχειρίσεις μειώνουν σε σημαντικό βαθμό το δείκτη της σοβαρότητας της ασθένειας. Το χαμηλότερο ποσοστό παρουσιάζει η εφαρμογή με το στέλεχος Cal.r.29, τόσο ως μεμονωμένο στέλεχος όσο και ως μίγμα με το στέλεχος X. Ακολουθεί το βακτηριακό στέλεχος Cal.l.30 με την εφαρμογή του τόσο ως

μεμονωμένο στέλεχος όσο και ως μίγμα με τα στελέχη Cal.r.29 και Cal.f.4. Τέλος, τόσο ο δείκτης σοβαρότητας της ασθένειας όσο και η ένταση της ασθένειας μειώνεται λιγότερο μετά από την εφαρμογή των μεμονωμένων βακτηριακών στελεχών Cal.f.4 και X (Διαγρ. 3.24A και B).



Διάγραμμα 3.24 Βιολογική αντιμετώπιση του φυτοπαθογόνου μύκητα *Botrytis cinerea* με τη μέθοδο detached fruit assay σε καρπούς σταφυλιού. Εφαρμόστηκαν τα μεμονωμένα στελέχη Cal.l.30, Cal.f.4, Cal.r.29 και X, καθώς και τα μίγματα βακτηρίων Cal.l.30-Cal.f.4, Cal.l.30-Cal.r.29 και Cal.r.29-X. Α) Ένταση της ασθένειας (Disease incidence (%)). Β) Δείκτης σοβαρότητας της ασθένειας (Disease severity index (%)). Οι ράβδοι αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο των μετρήσεων με τις τυπικές αποκλίσεις των τιμών τους. Τα διαφορετικά γράμματα υποδεικνύουν τις στατιστικές σημαντικές διαφορές ($p < 0.05$) μεταξύ των μεταχειρίσεων, μετά από την πραγματοποίηση Tukey's test.

3.5.7 Εφαρμογή των βακτηριακών στελεχών Cal.l.30, Cal.f.4, Cal.r.29 και X σε φυτά *Solanum lycopersicum* var. Chondrokatsari Messinias σε συνθήκες θερμοκηπίου

3.5.7.1 Επίδραση των βακτηρίων στη ανάπτυξη και τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των φυτών τομάτας

Τα συμβατά μίγματα που δημιουργήθηκαν μετά από τα πειράματα *in vitro*, εφαρμόστηκαν στη συνέχεια στο φυτό οικονομικής σημασίας *Solanum lycopersicum* var. Chondrokatsari Messinias, σε συνθήκες θερμοκηπίου. Στόχος αυτής της εφαρμογής, ήταν να μελετηθεί η επίδραση των βακτηρίων ως μεμονωμένα στελέχη αλλά και ως μίγματα βακτηρίων στην ανάπτυξη του φυτού. Τα βακτήρια που δοκιμάστηκαν ήταν τα ενδοφυτικά βακτήρια Cal.l.30, Cal.f.4 και Cal.r.29, καθώς και το ριζοσφαιρικό βακτήριο *P. carnis* X.

3.5.7.1.1 Εφαρμογή των μεμονωμένων στελεχών Cal.l.30, Cal.f.4, Cal.r.29 και X

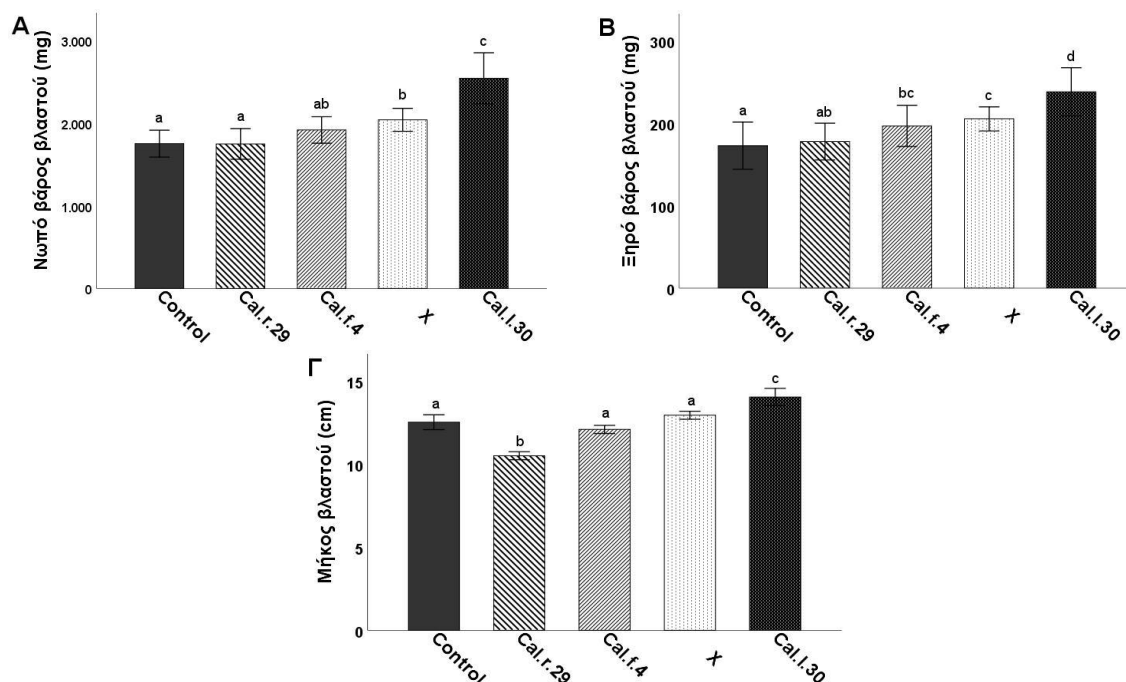
Τα ενδοφυτικά βακτήρια Cal.l.30, Cal.f.4 και Cal.r.29, καθώς και το ριζοσφαιρικό στέλεχος X εφαρμόστηκαν ως μεμονωμένα στελέχη σε φυτά τομάτας (*Solanum lycopersicum*), σε συνθήκες θερμοκηπίου. Τα βακτήρια εφαρμόστηκαν αρχικά με τη μέθοδο της βιοκάλυψης σε σπόρους τομάτας, ενώ εμβολιάστηκαν στη συνέχεια με ριζοπότισμα στις 15 και 30 ημέρες μετά την αρχική σπορά. Όπως παρατηρείται και στην Εικόνα 3.64, οι μετρήσεις και η φωτογράφιση των φυτών πραγματοποιήθηκαν στις 45 ημέρες (πέντε πραγματικά φύλλα) από την εφαρμογή των βακτηρίων.



Εικόνα 3.64 Εφαρμογή των ενδοφυτικών βακτηριακών στελεχών Cal.l.30, Cal.f.4, Cal.r.29 και του ριζοσφαιρικού βακτηρίου *P. carnis* X ως μεμονωμένα στελέχη σε φυτά *Solanum lycopersicum*, σε συνθήκες θερμοκηπίου.

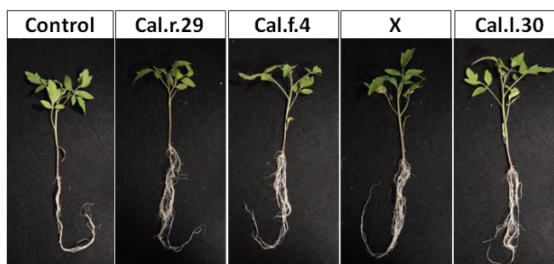
Συγκεκριμένα, τα μορφολογικά χαρακτηριστικά που μετρήθηκαν είναι το νωπό και ξηρό βάρος του υπέργειου και ριζικού συστήματος των φυτών, καθώς και το μήκος του βλαστού των φυτών τομάτας. Όπως, παρατηρείται και στην Εικόνα 3.64 και μετά την πραγματοποίηση της κατάλληλης στατιστικής ανάλυσης (Διαγρ. 3.25) το βακτήριο που ξεχωρίζει είναι το στέλεχος Cal.l.30, το οποίο επηρεάζει σημαντικά το υπέργειο τμήμα των φυτών τομάτας. Συγκεκριμένα, παρουσιάζει το μεγαλύτερο μήκος βλαστού και τις υψηλότερες τιμές νωπού

και ξηρού βάρους του βλαστού, σε σύγκριση τόσο με τα φυτά που εμβολιάστηκαν με τα υπόλοιπα στελέχη, όσο και με τα φυτά μάρτυρες.



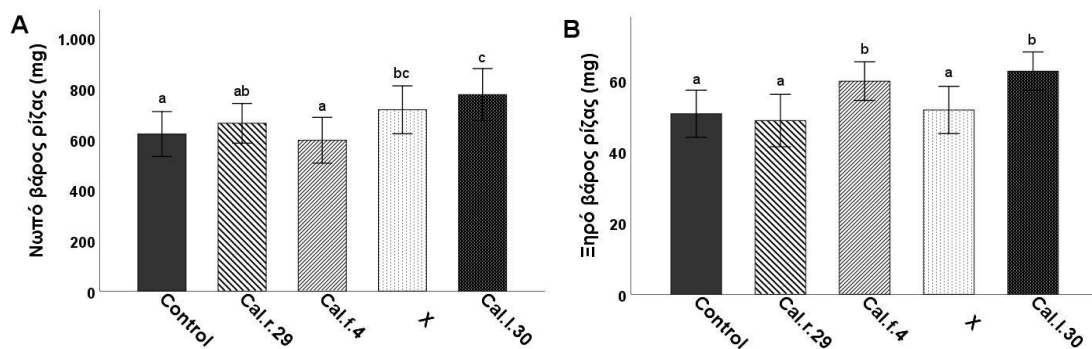
Διάγραμμα 3.25 Επίδραση των μεμονωμένων βακτηριακών στελεχών Cal.l.30, Cal.f.4, Cal.r.29 και X A) στο μήκος του βλαστού, B) στο νωπό βάρος του βλαστού και Γ) στο ξηρό βάρος του βλαστού των φυτών *Solanum lycopersicum* var. Chondrokatsari Messinias. Οι ράβδοι αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο των μετρήσεων των φυτών και τις τυπικές αποκλίσεις των τιμών (n= 20). Τα διαφορετικά γράμματα υποδεικνύουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές ($p < 0.05$) μεταξύ όλων των δειγμάτων μετά από την πραγματοποίηση Tukey's test.

Τα στελέχη Cal.f.4 και X, δεν αυξάνουν σημαντικά το ύψος των βλαστών σε σχέση με τα φυτά μάρτυρες, ενώ ξεχωρίζουν σημαντικά σε σύγκριση με το ενδοφυτικό βακτήριο Cal.r.29. Αντιθέτως, τόσο το νωπό όσο και ξηρό βάρος του υπέργειου τμήματος των φυτών τομάτας που εμβολιάστηκαν με τα παραπάνω στελέχη ξεχωρίζουν σε σύγκριση με τα φυτά μάρτυρες. Τέλος, τα φυτά που εμβολιάζονται με το στέλεχος Cal.r.29, παρουσιάζουν το μικρότερο ύψος βλαστού σε σύγκριση με τα φυτά μάρτυρες και ταυτόχρονα, τόσο το νωπό όσο και ξηρό βάρος του υπέργειου τμήματος των φυτών δεν επηρεάζονται σημαντικά, σε σύγκριση με τις τιμές των φυτών μάρτυρες. Η εφαρμογή και των τεσσάρων στελεχών στις ρίζες των φυτών επηρεάζει σημαντικά το ριζικό τους σύστημα, όπως παρατηρείται και στην Εικόνα 3.65.



Εικόνα 3.65 Επίδραση των ενδοφυτικών βακτηρίων Cal.l.30, Cal.f.4, Cal.r.29 και του ριζοσφαιρικού βακτηρίου X στο υπέργειο και ριζικό σύστημα του φυτού *Solanum lycopersicum*, σε συνθήκες θερμοκηπίου.

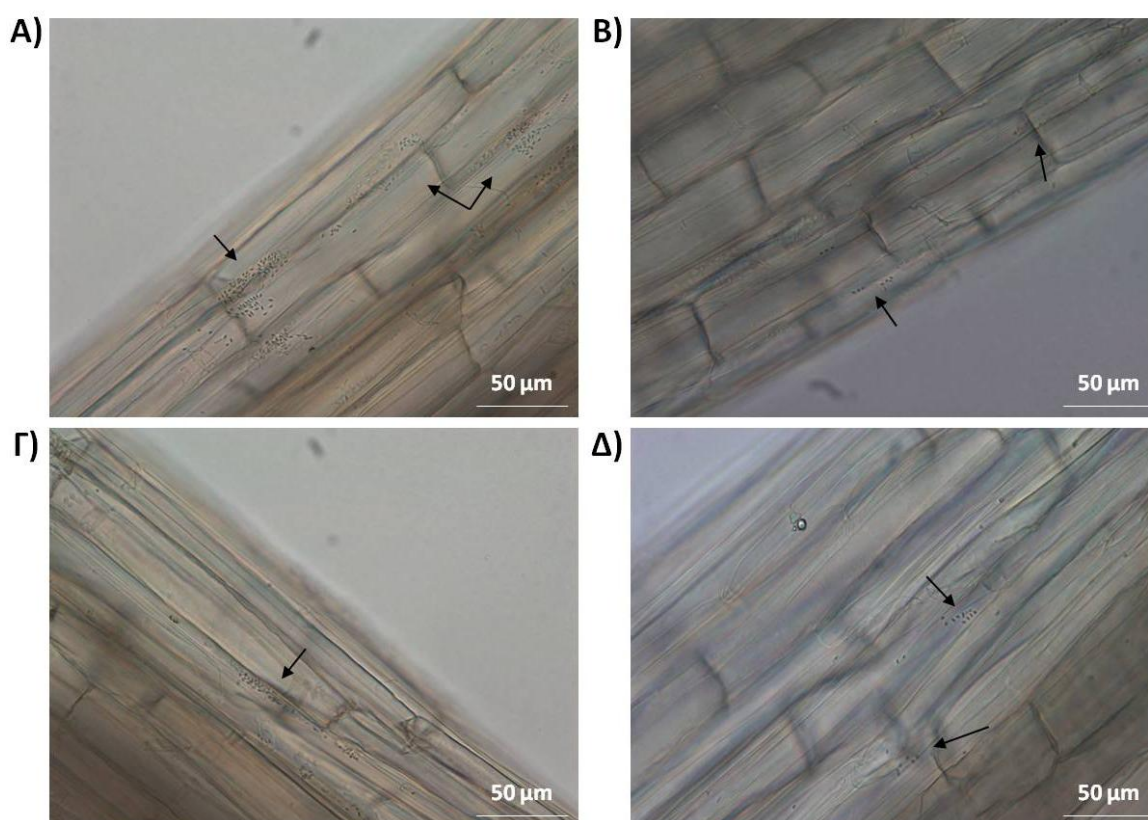
Μετά και την πραγματοποίηση στατιστικής ανάλυσης, βρέθηκε ότι τόσο το νωπό όσο και ξηρό βάρος των ριζών επηρεάζεται διαφορετικά από την εφαρμογή του κάθε βακτηριακού στελέχους (Διαγρ. 3.26). Συγκεκριμένα, το βακτήριο που επηρεάζει σε μεγαλύτερο βαθμό το ριζικό σύστημα των φυτών τομάτας, είναι το ενδοφυτικό βακτήριο Cal.l.30. Το βακτήριο παρουσιάζει τις μέγιστες τιμές νωπού και ξηρού βάρους, τόσο σε σύγκριση με τα φυτά που εμβολιάστηκαν με τα υπόλοιπα στελέχη, όσο και με τα φυτά μάρτυρες. Το νωπό βάρος της ρίζας των φυτών επηρεάζεται εξίσου σημαντικά με την εφαρμογή και του ριζοσφαιρικού βακτηρίου X. Αντιθέτως, το ξηρό βάρος, δεν επηρεάζεται το ίδιο σημαντικά. Τέλος, τα στελέχη Cal.r.29 και Cal.f.4, δεν επηρεάζουν σημαντικά το νωπό όσο και το ξηρό βάρος των φυτών τομάτας, σε σύγκριση με τα φυτά μάρτυρες.



Διάγραμμα 3.26 Επίδραση των μεμονωμένων βακτηριακών στελεχών Cal.l.30, Cal.f.4, Cal.r.29 και X A) στο ολικό νωπό βάρος της ρίζας και B) στο ολικό ξηρό βάρος της ρίζας των φυτών *Solanum lycopersicum* var. Chondrokatsari Messinias. Οι ράβδοι αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο των μετρήσεων των φυτών και τις τυπικές αποκλίσεις των τιμών (n=20). Τα διαφορετικά γράμματα υποδεικνύουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές ($p < 0.05$) μεταξύ όλων των δειγμάτων μετά από την πραγματοποίηση Tukey's test.

3.5.7.1.1.2 Μικροσκοπική παρατήρηση των προσκολλημένων βακτηριακών κυττάρων στη ρίζα των φυτών *Solanum lycopersicum* από τα μεμονωμένα βακτηριακά στελέχη

Τα βακτηριακά στελέχη Cal.l.30, Cal.r.29, Cal.f.4 και X που εμβολιάσθηκαν σε σπόρους τομάτας, παρατηρήθηκαν μικροσκοπικά για την ικανότητα προσκόλλησής τους στις ρίζες των φυτών. Συγκεκριμένα, οι σπόροι εμβολιάσθηκαν με τη μέθοδο της βιοκάλυψης (biopriming) και αναπτύχθηκαν σε *in vitro* συνθήκες για 7 ημέρες, μέχρι την μικροσκοπική τους παρατήρηση. Η μικροσκοπική παρατήρηση πραγματοποιήθηκε σε οπτικό μικροσκόπιο Olympus BX40 και οι εικόνες αποτυπώθηκαν με την ενσωματωμένη κάμερα Olympus DP71.

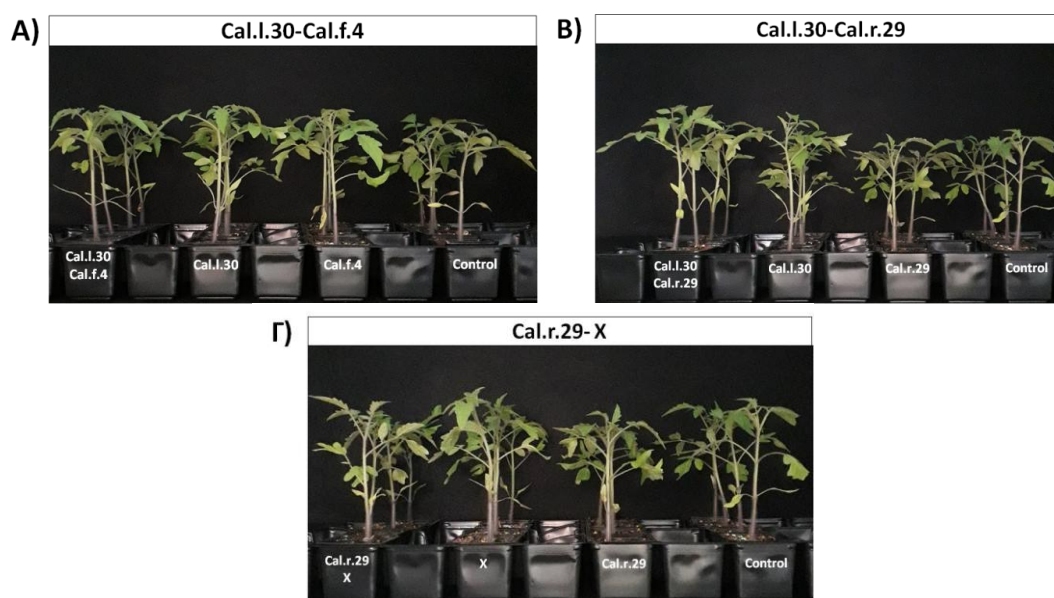


Εικόνα 3.66 Αποικισμός της ρίζας του φυτού *Solanum lycopersicum* από τα βακτηριακά στελέχη Α) Cal.l.30, Β) Cal.f.4, Γ) Cal.r.29 και Δ) X. Η μικροσκοπική παρατήρηση πραγματοποιήθηκε σε οπτικό μικροσκόπιο Olympus BX40 και οι εικόνες αποτυπώθηκαν με την ενσωματωμένη κάμερα Olympus DP71 (Κλίμακα: 50 μm).

Όπως παρατηρείται στην Εικόνα 3.66, τόσο τα ενδοφυτικά στελέχη Cal.l.30, Cal.f.4 και Cal.r.29 (Εικ. 3.66Α-Γ), όσο και το ριζοσφαιρικό στέλεχος X προσκολλούνται σε όλη την επιφάνεια της ρίζας είτε ως συστάδες κυττάρων, είτε ως μεμονωμένα κύτταρα.

3.5.7.1.2 Εφαρμογή των μιγμάτων βακτηρίων Cal.l.30-Cal.f.4, Cal.r.29-Cal.l.30 και Cal.r.29-X σε φυτά τομάτας

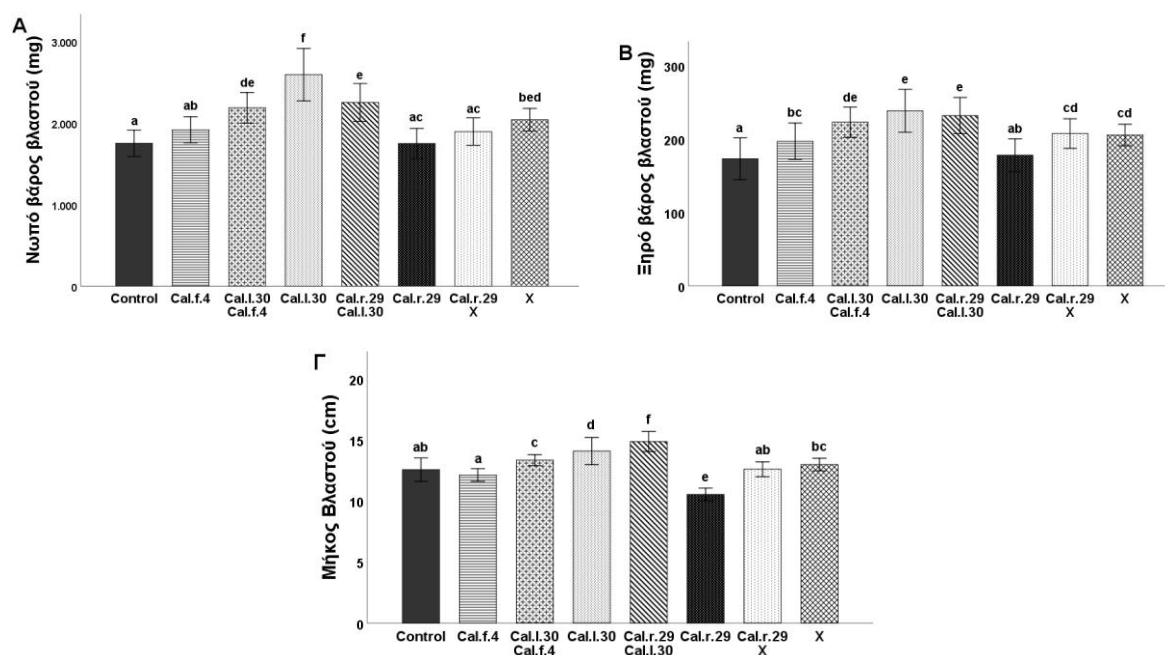
Μετά την εφαρμογή των βακτηρίων ως μεμονωμένα στελέχη σε φυτά τομάτας, πραγματοποιήθηκε η εφαρμογή τους ως μίγματα βακτηρίων. Τα μίγματα που προέκυψαν μετά από την *in vitro* μελέτη της συμβατότητας των στελεχών μεταξύ τους ήταν τρία. Το πρώτο μίγμα δημιουργήθηκε μεταξύ των ενδοφυτικών βακτηρίων Cal.l.30 και Cal.f.4, το δεύτερο μεταξύ των στελεχών Cal.l.30 και Cal.r.29 και το τρίτο μεταξύ του ενδοφυτικού βακτηρίου Cal.r.29 και του ριζοσφαιρικού στελέχους X. Καθένα από τα μίγματα εφαρμόσθηκαν σε φυτά τομάτας σε συνθήκες θερμοκηπίου και πραγματοποιήθηκε σύγκριση τους με τα φυτά μάρτυρες, καθώς και με τα φυτά των μεμονωμένων στελεχών (Εικ. 3.67).



Εικόνα 3.67 Εφαρμογή των τριών μιγμάτων βακτηρίων Α) Cal.l.30-Cal.f.4, Β) Cal.l.30-Cal.r.29 και Γ) Cal.r.29-X στην ανάπτυξη του φυτού *Solanum lycopersicum* σε συνθήκες θερμοκηπίου.

Όπως παρατηρείται και στην Εικόνα 3.67, η εφαρμογή μιγμάτων βακτηρίων επηρεάζει διαφορετικά την ανάπτυξη των φυτών τομάτας, σε σύγκριση με τα μεμονωμένα στελέχη. Μετά και από την πραγματοποίηση κατάλληλης στατιστικής ανάλυσης (Διαγρ. 3.27) το μίγμα που ξεχωρίζει παρουσιάζοντας το μεγαλύτερο μήκος βλαστού είναι το μίγμα Cal.l.30-Cal.r.29. Ακολουθεί το μίγμα Cal.l.30-Cal.f.4, από την εφαρμογή του οποίου προκύπτουν φυτά με μήκος βλαστού μεγαλύτερο σε σχέση με τα φυτά μάρτυρες, καθώς και από εκείνα που εμβολιάσθηκαν με το μεμονωμένο στέλεχος Cal.f.4, ενώ είναι πιο κοντά από εκείνα που εμβολιάσθηκαν με το ενδοφυτικό στέλεχος Cal.l.30. Το τελευταίο μίγμα (Cal.r.29-X) δεν επηρεάζει σημαντικά το ύψος των φυτών σε σχέση με τα φυτά μάρτυρες καθώς και με τα φυτά που εμβολιάσθηκαν με το ριζοσφαιρικό στέλεχος X. Αντιθέτως, τα φυτά που

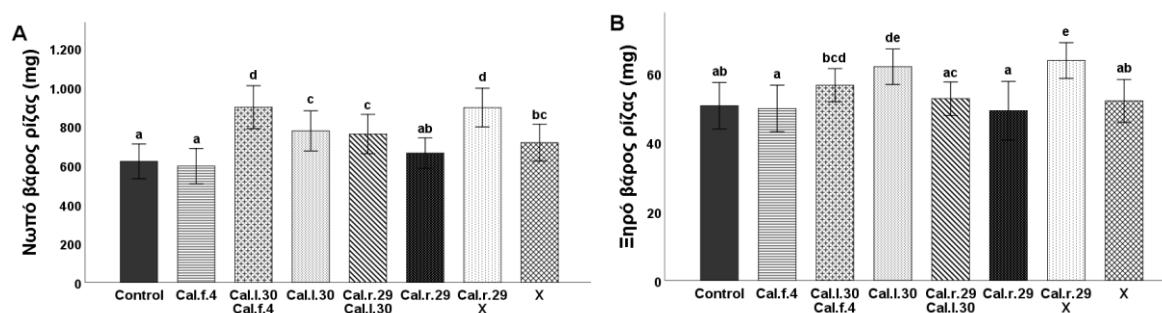
εμβολιάσθηκαν με το μεμονωμένο στέλεχος Cal.r.29 είναι πιο κοντά τόσο σε σχέση με τα φυτά που εμβολιάσθηκαν με το ριζοσφαιρικό βακτήριο X, όσο και με το μίγμα αυτών.



Διάγραμμα 3.27 Επίδραση των μεμονωμένων βακτηριακών στελεχών Cal.l.30, Cal.f.4, Cal.r.29 και X των τριών μιγμάτων αυτών (Cal.l.30-Cal.f.4, Cal.l.30-Cal.r.29 και Cal.r.29-X) Α) στο μήκος του βλαστού, Β) στο νωπό βάρος του βλαστού και Γ) στο ξηρό βάρος του βλαστού των φυτών *Solanum lycopersicum* var. Chondrokatsari Messinias. Οι ράβδοι αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο των μετρήσεων των φυτών και τις τυπικές αποκλίσεις των τιμών ($n=20$). Τα διαφορετικά γράμματα υποδεικνύουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές ($p < 0.05$) μεταξύ όλων των δειγμάτων μετά από την πραγματοποίηση Tukey's test.

Το υψηλότερο νωπό και ξηρό βάρος βλαστού παρουσιάζουν τα φυτά που εμβολιάσθηκαν με τα μίγματα Cal.l.30-Cal.f.4 και Cal.l.30-Cal.r.29, εμφανίζοντας τις υψηλότερες τιμές σε σύγκριση με το τρίτο μίγμα (Cal.r.29-X) όσο και με τα φυτά μάρτυρες. Ωστόσο, και στις δύο περιπτώσεις το κοινό και στα δύο μίγματα στέλεχος Cal.l.30, παρουσιάζει πιο υψηλές τιμές νωπού βάρους βλαστού σε σύγκριση με το κάθε μίγμα βακτηρίων. Την ίδια στιγμή, το ξηρό βάρος του βλαστού του μεμονωμένου στελέχους δε διαφέρει στατιστικώς σημαντικά από τα αντίστοιχα βάρη βλαστών όπου εμπλέκεται το Cal.l.30 σε μίγμα. Ταυτόχρονα, τα άλλα δύο μεμονωμένα στελέχη των μιγμάτων (Cal.r.29 και Cal.f.4) παρουσιάζουν χαμηλότερες τιμές νωπού και ξηρού βάρους σε σύγκριση με το αντίστοιχο μίγμα τους. Το νωπό βάρος των φυτών που εμβολιάσθηκαν με το μίγμα Cal.r.29-X, δεν παρουσιάζει στατιστικώς σημαντικές διαφορές με τα φυτά που εμβολιάσθηκαν με το Cal.r.29, ενώ ξεχωρίζουν εκείνα που εφαρμόσθηκαν με το στέλεχος X. Αντιθέτως, το ξηρό βάρος των βλαστών δεν εμφανίζει στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ της εφαρμογής του μίγματος και του X, με το στέλεχος Cal.r.29 να παρουσιάζει τις χαμηλότερες τιμές. Όπως παρατηρείται και στην Εικόνα 3.67, η εφαρμογή των μιγμάτων βακτηρίων επηρεάζει εκτός του υπέργειου τμήματος και το ριζικό σύστημα των φυτών τομάτας.

Το μίγμα που εμφανίζει τις υψηλότερες τιμές τόσο νωπού όσο και ξηρού βάρους της ρίζας, ήταν το Cal.r.29-X (Διαγρ. 3.28). Το συγκεκριμένο μίγμα παρουσιάζει τις υψηλότερες τιμές σε σύγκριση με τις αντίστοιχες μετρήσεις των μεμονωμένων στελεχών του, όσο και σε σύγκριση με τα φυτά μάρτυρες. Ταυτόχρονα, οι τιμές νωπού βάρους της ρίζας των μιγμάτων Cal.r.29-X και Cal.l.30-Cal.f.4 είναι σημαντικά υψηλότερες σε σύγκριση με κάθε άλλη μεταχείριση. Τέλος, το τρίτο μίγμα Cal.r.29-Cal.l.30 παρ' όλο που εμφανίζει τις χαμηλότερες τιμές νωπού βάρους ρίζας σε σύγκριση με τα υπόλοιπα μίγματα, είναι υψηλότερο σε σύγκριση με τα φυτά μάρτυρες. Αξιοσημείωτο είναι ότι το στέλεχος Cal.l.30 ξεχώρισε κατά την εφαρμογή του ως μεμονωμένο στέλεχος παρουσιάζοντας τις υψηλότερες τιμές ξηρού βάρους ρίζας, σε σύγκριση και με τα δύο μίγματα του όσο και τα δύο αντίστοιχα μεμονωμένα στελέχη των μιγμάτων.

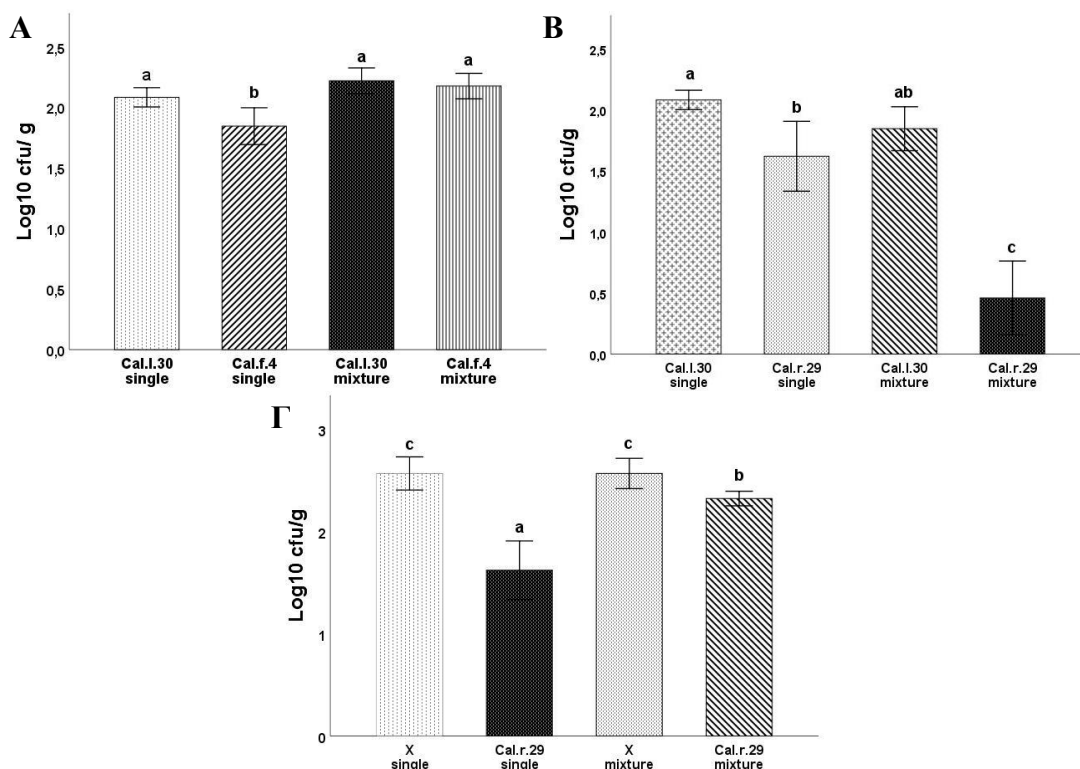


Διάγραμμα 3.28 Επίδραση των μεμονωμένων βακτηριακών στελεχών Cal.l.30, Cal.f.4, Cal.r.29 και X των τριών μιγμάτων αυτών (Cal.l.30-Cal.f.4, Cal.l.30-Cal.r.29 και Cal.r.29-X) Α) στο ολικό νωπό βάρος της ρίζας και Β) στο ολικό ξηρό βάρος της ρίζας των φυτών *Solanum lycopersicum* var. Chondrokatsari Messinias. Οι ράβδοι αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο των μετρήσεων των φυτών και τις τυπικές αποκλίσεις των τιμών ($n=20$). Τα διαφορετικά γράμματα υποδεικνύουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές ($p < 0.05$) μεταξύ όλων των δειγμάτων μετά από την πραγματοποίηση Tukey's test.

Μετά από σχεδόν δύο βδομάδες από τη σπορά των εμβολιασμένων σπόρων με μεμονωμένα και μίγματα βακτηρίων, ελέγξαμε την επιβίωση των στελεχών στην περιοχή της ριζόσφαιρας. Όλα τα βακτήρια κατάφεραν να επιβιώσουν στο προσκολλημένο χώμα των ριζών τομάτας, παρουσιάζοντας ωστόσο σημαντικές αυξομειώσεις ανάλογα με την εφαρμογή.

Όπως παρατηρείται και στο Διάγραμμα 3.29 το βακτηριακό στέλεχος Cal.r.29 παρουσίασε τις χαμηλότερες συγκεντρώσεις κυττάρων που κατάφεραν να αποικίσουν τη ριζόσφαιρα των φυτών τομάτας σε σύγκριση με τις υπόλοιπες εφαρμογές των βακτηρίων. Μάλιστα, η χαμηλότερη συγκέντρωση του παρατηρήθηκε μετά από την εφαρμογή του ως μίγμα με το στέλεχος Cal.l.30. Αντιθέτως, η συγκέντρωση του Cal.r.29 αυξήθηκε σημαντικά μετά από την εφαρμογή του ως μίγμα με το στέλεχος X, παρουσιάζοντας σημαντικά υψηλότερη συγκέντρωση ακόμη και από την εφαρμογή του ως μεμονωμένο στέλεχος. Την ίδια στιγμή η συγκέντρωση των κυττάρων του ριζοσφαιρικού στελέχους X παρέμεινε σταθερή και

επηρεάστηκε από την παρουσία του Cal.r.29. Τέλος, το βακτήριο Cal.l.30 αποίκισε εξίσου αποτελεσματικά τη ριζόσφαιρα των φυτών τομάτας, χωρίς να επηρεάζεται από την παρουσία των στελεχών Cal.f.4 και Cal.r.29· αντιθέτως, ευνόησε την αύξηση της συγκέντρωσης του Cal.f.4.



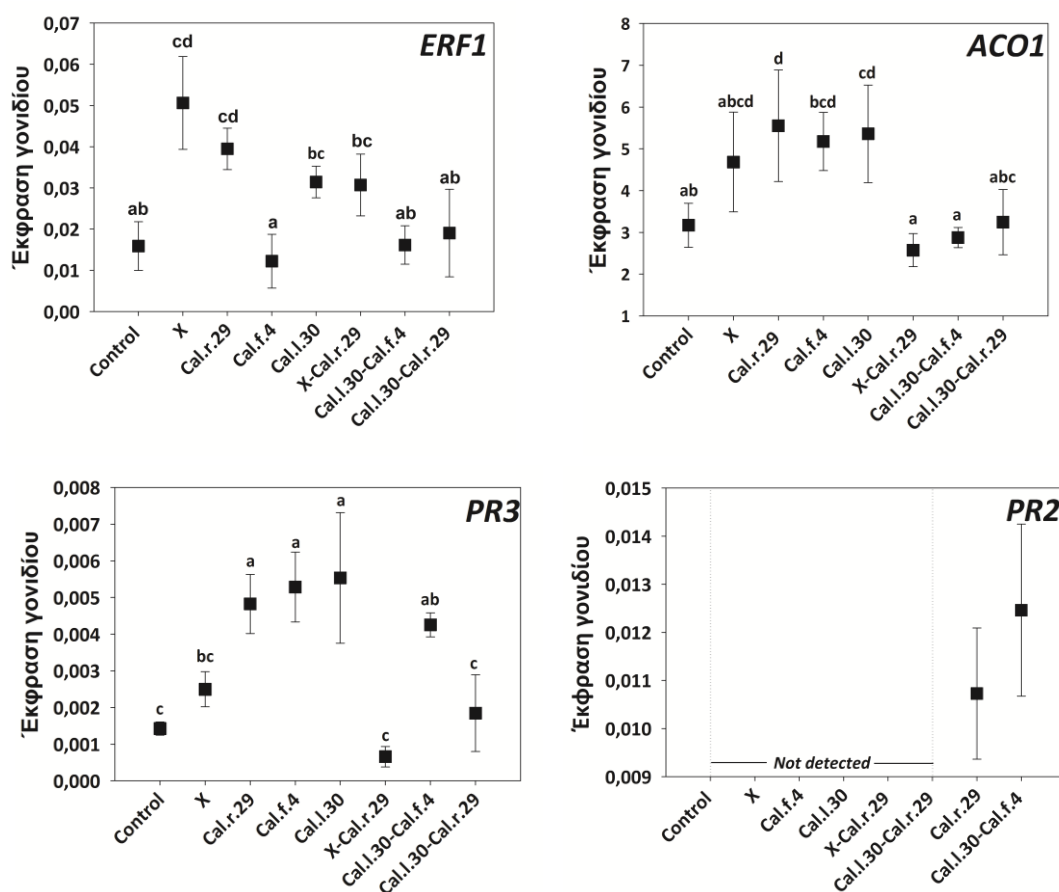
Διάγραμμα 3.29 Επιβίωση των μεμονωμένων βακτηριακών στελεχών Cal.l.30, Cal.f.4, Cal.r.29 και X στο προσκολλημένο χώμα (Log10 CfU/g χώματος) στις ρίζες των φυτών *Solanum lycopersicum* var. Chondrokatsari Messinias, δύο εβδομάδες μετά την εφαρμογή τους στους σπόρους με bio-priming. Τα βακτήρια εφαρμόστηκαν ως μεμονωμένα στελέχη (single) και ως μίγματα βακτηρίων (mixture) μεταξύ των Α) Cal.l.30 και Cal.f.4 Β) στο Cal.l.30 και Cal.r.29 και Γ) Cal.r.29- X. Οι ράβδοι αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο των μετρήσεων των φυτών και τις τυπικές αποκλίσεις των τιμών. Τα διαφορετικά γράμματα υποδεικνύουν στατιστικές σημαντικές διαφορές ($p < 0.05$) μεταξύ όλων των δειγμάτων μετά από την πραγματοποίηση Tukey's test.

3.5.7.2 Έκφραση των γονιδίων που εμπλέκονται στην επαγόμενη διασυστηματική ανοχή (ISR) των φυτών *Solanum lycopersicum* var. Chondrokatsari Messinias

Τα βακτηριακά στελέχη Cal.l.30, Cal.f.4, Cal.r.29 και X που εφαρμόστηκαν ως μεμονωμένα στελέχη και ως μίγματα βακτηρίων (Cal.l.30-Cal.f.4, Cal.l.30-Cal.r.29, Cal.r.29-X) σε φυτά *Solanum lycopersicum* var. Chondrokatsari Messinias, μελετήθηκαν στη συνέχεια για την ενεργοποίηση της επαγόμενης διασυστηματικής ανοχής (ISR) των φυτών. Τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων μελετήθηκαν στα δεύτερα πραγματικά φύλλα των φυτών περίπου δύο εβδομάδες μετά την εφαρμογή τους με τη μέθοδο bio-priming και 24 ώρες μετά την προσθήκη εμβολίου βακτηρίου στις ρίζες των φυτών τομάτας. Συγκεκριμένα μελετήθηκε η έκφραση των γονιδίων *ERF1*, *ACO1*, *PR2*, *PR3*, *PR1* και *TomLoxA* με την πραγματοποίηση ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου (RT-qPCR).

3.5.7.2.1 Επίπεδα έκφρασης γονιδίων μετά την εφαρμογή των βακτηρίων με biopriming

Όπως παρατηρείται στο Εικόνα 3.68, η εφαρμογή των βακτηριακών στελεχών X και Cal.r.29, αύξησε σημαντικά το επίπεδο έκφρασης του γονιδίου *ERF1*, σε σύγκριση με τις υπόλοιπες εφαρμογές βακτηρίων, όσο και τη μεταχείριση του μάρτυρα (Control). Συγκεκριμένα τα βακτηριακά στελέχη X και Cal.r.29 αυξάνουν κατά περίπου 3,2 φορές και κατά 2,5 φορές αντίστοιχα, την έκφραση του γονιδίου *ERF1*, σε σύγκριση με τη μεταχείριση του μάρτυρα (Control) (Πίν. 3.30). Χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης παρουσίασαν τα φυτά που εφαρμόστηκαν με το ενδοφυτικό στέλεχος Cal.f.4 και με το μίγμα Cal.f.4-Cal.l.30. Αντίθετα, τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *ERF1* των μεταχειρίσεων X-Cal.r.29 και Cal.l.30-Cal.r.29 δε διαφέρουν σημαντικά σε σύγκριση με τα επίπεδα έκφρασης της μεταχείρισης του μάρτυρα (Control).



Εικόνα 3.68 Επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *ERF1*, *ACO1*, *PR1* και *PR2* σε φυτά *Solanum lycopersicum* var. Chondrokatsari Messinias 8 ημέρες μετά από την εφαρμογή των μεμονωμένων βακτηριακών στελεχών X, Cal.l.30, Cal.f.4, Cal.r.29 αλλά και των μιγμάτων Cal.l.30-Cal.f.4, Cal.l.30-Cal.r.29, Cal.r.29-X, με τη μέθοδο seed biopriming. Στο διάγραμμα παρουσιάζεται ο μέσος όρος των τιμών ΔCt με τις κάθετες γραμμές να αντιπροσωπεύουν το διάστημα εμπιστοσύνης (95% CI) των τιμών. Τα διαφορετικά γράμματα υποδεικνύουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές ($p < 0.05$) μεταξύ όλων των δειγμάτων μετά από την πραγματοποίηση Tukey's test.

Η έκφραση του γονιδίου *ACO1* είναι σημαντικά αυξημένη μετά τις εφαρμογές των μεμονωμένων βακτηριακών στελεχών, ενώ από την εφαρμογή τους ως μίγματα βακτηρίων, τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου δεν αυξήθηκαν σημαντικά σε σύγκριση με το μάρτυρα (Control).

Τα υψηλότερα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *PR3* παρατηρήθηκαν με την εφαρμογή των βακτηριακών στελεχών *Cal.r.29*, *Cal.f.4*, *Cal.l.30* και του μίγματος *Cal.l.30-Cal.f.4*. Συγκεκριμένα, τα σχετικά επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *PR3* σε σύγκριση με το μάρτυρα είναι αυξημένα κατά 3,2, 3,4 και 4,1 φορές μετά την εφαρμογή των βακτηριακών στελεχών *Cal.r.29*, *Cal.f.4* και *Cal.l.30*, αντίστοιχα (Πίν. 3.30). Τέλος, οι υπόλοιπες εφαρμογές βακτηρίων (*X*, *X-Cal.r.29* και *Cal.l.30-Cal.r.29*) παρουσίασαν χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης του μελετώμενου γονιδίου, σε σύγκριση με το μάρτυρα.

Τέλος, το γονίδιο *PR2* εκφράστηκε μόνο στα φυτά που είχαν εφαρμοσθεί με το βακτηριακό στέλεχος *Cal.r.29* και το μίγμα βακτηρίων *Cal.l.30-Cal.f.4*. Τόσο στη μεταχείριση του μάρτυρα (Control), όσο και στις υπόλοιπες εφαρμογές βακτηρίων, δεν παρατηρείται έκφραση του γονιδίου *PR2*.

Πίνακας 3.30 Σχετική έκφραση των γονιδίων *ERF1*, *ACO1*, *PR1* και *PR2* για κάθε μεταχείριση, διάστημα εμπιστοσύνης (95% CI) και διαφορά στην έκφραση των μελετώμενων γονιδίων (fold change) για κάθε μεταχείριση σε σχέση με το μάρτυρα (Control), 15 ημέρες μετά την εφαρμογή του βακτηρίου στους σπόρους των φυτών *Solanum lycopersicum* var. *Chondrokatsari* Messinias με biopriming.

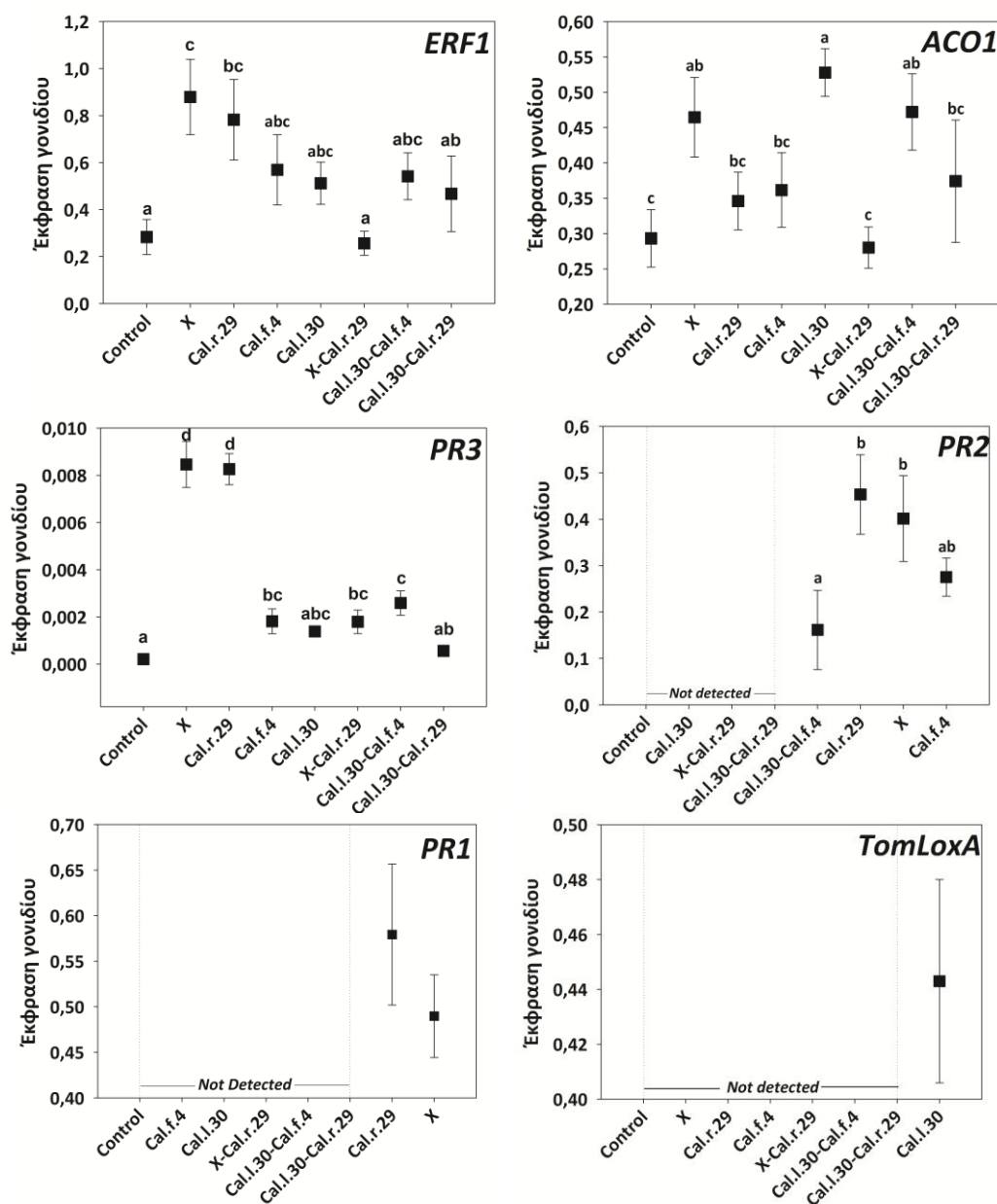
	<i>ERF1</i>	95% CI	Fold change	<i>ACO1</i>	95% CI	Fold change	<i>PR3</i>	95% CI	Fold change	<i>PR2</i>	95% CI
Control	0,0159	0,0059	1	3,1706	0,5271	1	0,0014	0,0002	1	-	-
X	0,0506	0,0113	3,1895	4,6843	1,1946	1,4654	0,0025	0,0005	2,0623	-	-
Cal.r.29	0,0395	0,0050	2,4870	5,5516	1,3336	1,7388	0,0048	0,0008	3,2261	0,0107	0,0014
Cal.f.4	0,0122	0,0065	0,7692	5,1759	0,6955	1,6370	0,0053	0,0001	3,4998	-	-
Cal.l.30	0,0314	0,0038	1,9804	5,3618	1,1662	1,6842	0,0055	0,0018	4,1277	-	-
X-Cal.r.29	0,0261	0,0105	1,9344	2,5764	0,3946	0,8140	0,0007	0,0003	1,4227	-	-
Cal.l.30-Cal.f.4	0,0161	0,0047	1,0166	2,8781	0,2409	0,9130	0,0043	0,0003	2,5863	0,0125	0,0018
Cal.l.30-Cal.r.29	0,0190	0,0106	1,1991	3,2464	0,7816	1,0167	0,0019	0,0011	1,8115	-	-

3.5.7.2.1 Επίπεδα έκφρασης γονιδίων 24 h μετά τον εμβολιασμό των βακτηρίων με ριζοπότισμα

Τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων διαφοροποιήθηκαν αρκετά μετά τον επιπρόσθετο εμβολιασμό των βακτηρίων με ριζοπότισμα. Όπως παρατηρείται στην Εικόνα 3.69, το γονίδιο *ACO1* παρουσιάζει τα υψηλότερα επίπεδα έκφρασης μετά την εφαρμογή των μεμονωμένων στελεχών *X* και *Cal.l.30*, καθώς και του μίγματος *Cal.l.3-Cal.f.4* (Εικ. 3.69). Τα υπόλοιπα στελέχη, δεν επηρεάζουν σημαντικά τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *ACO1* σε σύγκριση με το μάρτυρα (Control).

Το επίπεδο έκφρασης του γονιδίου *ERF1* παρουσιάζει τις υψηλότερες τιμές μετά την εφαρμογή των βακτηριακών στελεχών *X* και *Cal.r.29*. Συγκεκριμένα τα αντίγραφα του γονιδίου ήταν κατά 3,3 και 3 φορές υψηλότερα για το κάθε στέλεχος αντίστοιχα, σε σύγκριση

με το μάρτυρα (Control) (Πίν. 3.31). Ακολουθούν οι υπόλοιπες εφαρμογές βακτηρίων με σχετικά χαμηλή έκφραση του *ERF1*, ενώ το μίγμα βακτηρίων X-Cal.r.29 δεν επηρέασε σημαντικά τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *ERF1* σε σύγκριση με το μάρτυρα (Control).



Εικόνα 3.69 Επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *ERF1*, *ACO1*, *PR3*, *PR2*, *PR1* και *TomLoxA*, σε φυτά *Solanum lycopersicum* var. Chondrokatsari Messinias 24 h μετά από την εφαρμογή των μεμονωμένων βακτηριακών στελεχών X, Cal.l.30, Cal.f.4, Cal.r.29 αλλά και των μιγμάτων Cal.l.30-Cal.f.4, Cal.l.30-Cal.r.29, Cal.r.29-X, με ριζοπότισμα. Στο διάγραμμα παρουσιάζεται ο μέσος όρος των τιμών ΔC_t με τις κάθετες γραμμές να αντιπροσωπεύουν το διάστημα εμπιστοσύνης (95% CI) των τιμών. Τα διαφορετικά γράμματα υποδεικνύουν στατιστικές σημαντικές διαφορές ($p < 0.05$) μεταξύ όλων των δειγμάτων μετά από την πραγματοποίηση Tukey's test.

Επιπλέον παρατηρείται υπερέκφραση του γονιδίου *PR3* μετά την εφαρμογή των βακτηριακών στελεχών X και Cal.r.29 ως μεμονωμένα στελέχη. Συγκεκριμένα, το γονίδιο και στις δύο περιπτώσεις παρουσιάζει επίπεδα έκφρασης αυξημένα κατά περίπου 35,8 και 34,7 φορές αντίστοιχα, σε σύγκριση με το μάρτυρα (Control) (Πίν. 3.31). Τα υπόλοιπα στελέχη,

δεν επηρεάζουν σημαντικά τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *PR3* σε σύγκριση με το μάρτυρα (Control) μεταχείριση, παρουσιάζοντας τις χαμηλότερες τιμές.

Από την άλλη, το γονίδιο *PR2* εκφράζεται μόνο στα φυτά που έχουν εφαρμοσθεί με τα βακτηριακά στελέχη Cal.r.29, X και Cal.f.4 ως μεμονωμένα στελέχη, καθώς και με το μίγμα βακτηρίων Cal.l.30-Cal.f.4. Τα υψηλότερα επίπεδα έκφρασης παρουσιάζουν τα μεμονωμένα στελέχη Cal.r.29 και X συγκριτικά με το μίγμα Cal.l.30-Cal.f.4. Τέλος, τόσο μεταχείριση του μάρτυρα, όσο και στις υπόλοιπες εφαρμογές βακτηρίων, δεν παρατηρείται έκφραση του γονιδίου *PR2*.

Η έκφραση του γονιδίου *PR1* παρατηρείται μόνο στα φυτά που εμβολιάστηκαν με τα μεμονωμένα βακτηριακά στελέχη X και Cal.r.29. Τόσο στη μεταχείριση του μάρτυρα, όσο και στις υπόλοιπες εφαρμογές βακτηρίων, δεν ανιχνεύθηκε έκφραση του γονιδίου *PR1*.

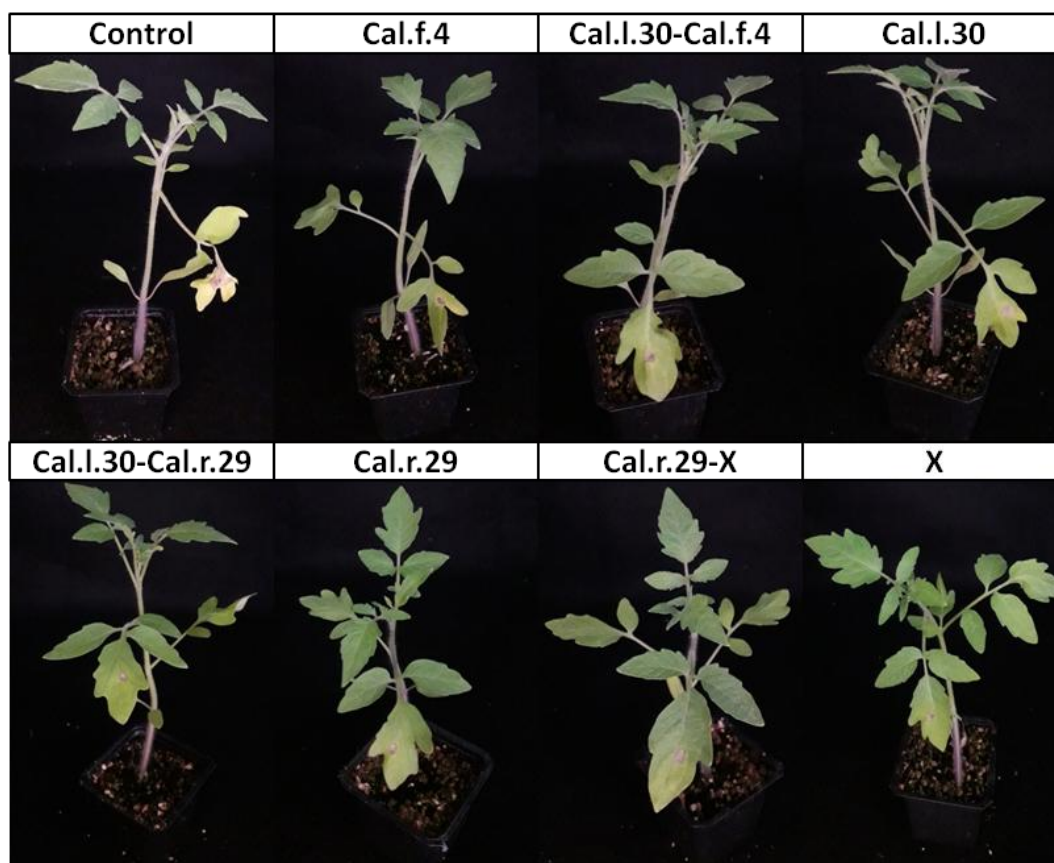
Όπως παρατηρείται και στο Εικόνα 3.69, η έκφραση του γονιδίου *TomLoxA* παρατηρείται μόνο στα φυτά που εμβολιάστηκαν με το βακτηριακό στέλεχος Cal.l.30. Τόσο στην μεταχείριση του μάρτυρα, όσο και στις υπόλοιπες εφαρμογές βακτηρίων, δεν ανιχνεύθηκε έκφραση του γονιδίου *TomLoxA*.

Πίνακας 3.31 Σχετική έκφραση των γονιδίων *ERF1*, *ACO1*, *PR1*, *PR2*, *PR3*, *TomLoxA* για κάθε μεταχείριση, διάστημα εμπιστοσύνης (95% CI) και διαφορά στην έκφραση των μελετώμενων γονιδίων (fold change) για κάθε μεταχείριση σε σχέση με το μάρτυρα (Control), 24 h μετά τον εμβολιασμό του βακτηρίου στις ρίζες των φυτών *Solanum lycopersicum* var. Chondrokatsari Messinias με biopriming.

	<i>ERF1</i>	95% CI	Fold change	<i>ACO1</i>	95% CI	Fold change	<i>PR3</i>	95% CI	Fold change	<i>PR2</i>	95% CI	<i>PR1</i>	95% CI	<i>TomLoxA</i>	95% CI
Control	0,2830	0,0747	1	0,2931	0,0405	1	0,0002	0,0002	1	-	-	-	-	-	-
X	0,9214	0,1552	3,2556	0,4646	0,0563	1,5851	0,0085	0,0010	35,7752	0,4012	0,0923	0,4897	0,0454	-	-
Cal.r.29	0,8605	0,1714	3,0404	0,3459	0,0410	1,1710	0,0082	0,0007	34,7206	0,4533	0,0858	0,5793	0,0774	-	-
Cal.f.4	0,5692	0,1497	2,0109	0,3616	0,0528	1,2337	0,0015	0,0005	6,2474	0,2751	0,0409	-	-	-	-
Cal.l.30	0,5632	0,0991	1,9897	0,5280	0,0337	1,8014	0,0007	0,0008	2,9888	-	-	-	-	0,4430	0,0371
X-Cal.r.29	0,2561	0,0512	0,9049	0,2801	0,0293	0,9555	0,0002	0,0001	0,7664	-	-	-	-	-	-
Cal.l.30-Cal.f.4	0,4720	0,1677	1,6676	0,4723	0,0540	1,6113	0,0012	0,0005	5,0216	0,1612	0,0853	-	-	-	-
Cal.l.30-Cal.r.29	0,5096	0,1289	1,8005	0,3742	0,0867	1,2766	0,0006	0,0004	2,5387	-	-	-	-	-	-

3.5.7.3 Βιολογική προστασία των φυτών *Solanum lycopersicum* var. *Chondrokatsari* Messinias εναντίον του φυτοπαθογόνου μύκητα *Botrytis cinerea* μέσω της επαγόμενης διασυστηματικής αντοχής (ISR)

Τα βακτηριακά στελέχη Cal.l.30, Cal.f.4, Cal.r.29 και X εφαρμόστηκαν σε φυτά τομάτας ως μεμονωμένα στελέχη και ως μίγματα βακτηρίων (Cal.l.30-Cal.f.4, Cal.l.30-Cal.r.29, Cal.r.29-X) και μελετήθηκαν για την ικανότητά τους να επάγουν τη διασυστηματική αντοχή των φυτών, με σκοπό την προστασία τους από το φυτοπαθογόνο μύκητα *Botrytis cinerea* (Εικ. 3.70). Η εφαρμογή του μύκητα πραγματοποιήθηκε σε φύλλα υγιεινών φυτών τομάτας *Solanum lycopersicum* var. *Chondrokatsari* Messinias μετά τον εμβολιασμό των βακτηρίων με τη μέθοδο της βιοκάλυψης (biopriming) σε σπόρους τομάτας και τη μετέπειτα εφαρμογή τους με ριζοπότισμα στη ρίζα των φυτών.

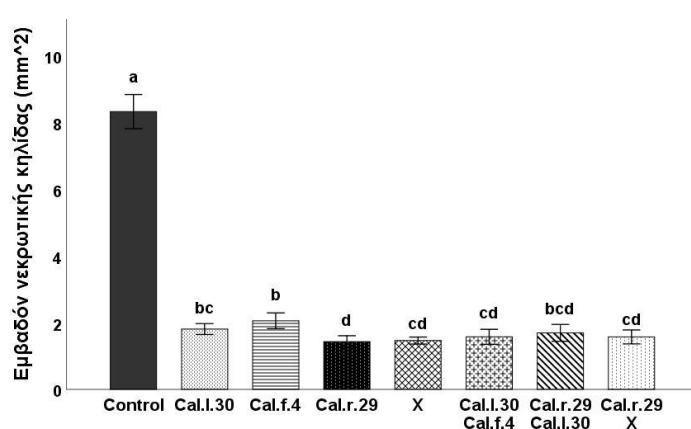


Εικόνα 3.70 Εφαρμογή των βακτηρίων Cal.l.30, Cal.r.29, Cal.f.4 και X ως μεμονωμένα στελέχη και ως μίγματα βακτηρίων (Cal.l.30-Cal.f.4, Cal.l.30-Cal.r.29 και Cal.r.29-X) σε φυτά *Solanum lycopersicum* var. *Chondrokatsari* Messinias σε συνθήκες θερμοκηπίου.

3.5.7.3.1 Μείωση της νεκρωτικής κηλίδας των φύλλων τομάτας

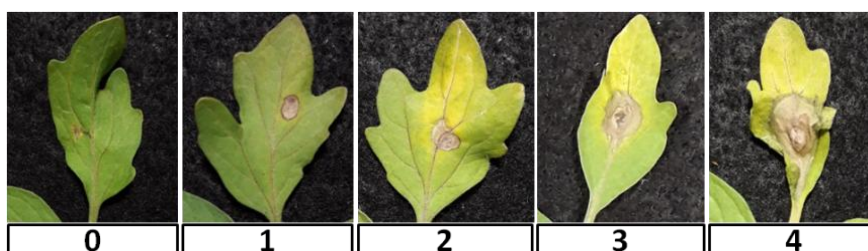
Η εφαρμογή των βακτηρίων στο σπόρο και στη ρίζα των φυτών τομάτας, έχει ως αποτέλεσμα τη επαγωγή της διασυστηματικής αντοχής των φυτών. Συγκεκριμένα, τα φυτά τομάτας που μολύνθηκαν με το φυτοπαθογόνο μύκητα *Botrytis cinerea*, παρουσιάζουν

μεγαλύτερη νεκρωτική κηλίδα στην επιφάνεια του φύλλου σε αντίθεση με τα φυτά που εμβολιάστηκαν με κάποιο από τα βακτηριακά στελέχη είτε ως μεμονωμένα στελέχη είτε ως μίγματα βακτηρίων. Όπως παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 3.30, όλα τα στελέχη μείωσαν σε σημαντικό βαθμό το εμβαδόν της νεκρωτικής στα φύλλα των φυτών *Solanum lycopersicum* var. Chondrokatsari Messinias που προκλήθηκε από το φυτοπαθογόνο στέλεχος *Botrytis cinerea*. Τα φυτά με την εφαρμογή του βακτηριακού στελέχους Cal.r.29 παρουσίασε το μικρότερο μέσο όρο εμβαδού νεκρωτικής κηλίδας και τα φυτά με την εφαρμογή του βακτηριακού στελέχους Cal.f.4 το μεγαλύτερο μέσο όρο. Οι υπόλοιπες μεταχειρίσεις βακτηρίων δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ τους.



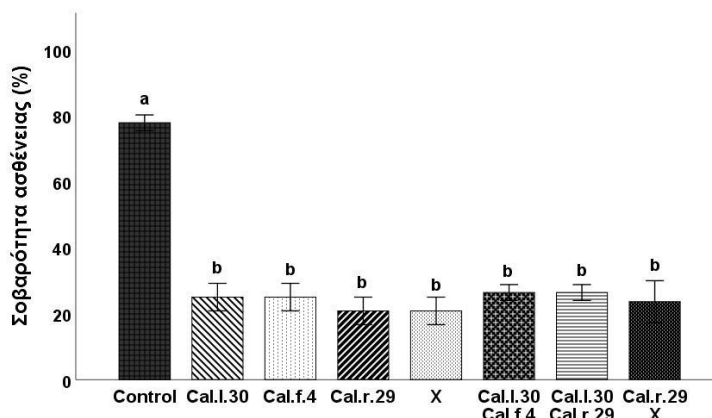
Διάγραμμα 3.30 Εμβαδόν νεκρωτικής κηλίδας (mm²) σε φύλλα μολυσμένων φυτών τομάτας από το φυτοπαθογόνο μύκητα *Botrytis cinerea* μετά την εφαρμογή των μεμονωμένων βακτηριακών στελεχών Cal.r.29, Cal.l.30, Cal.f.4 και X, καθώς και των τριών μιγμάτων βακτηρίων Cal.l.30-Cal.f.4, Cal.l.30-Cal.r.29 και Cal.r.29-X. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο των μετρήσεων με τις τυπικές αποκλίσεις των τιμών (n=6). Τα διαφορετικά γράμματα υποδεικνύουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές ($p < 0.05$) μεταξύ των τιμών, μετά από την πραγματοποίηση Tukey's test.

Όπως παρουσιάζεται στην Εικόνα 3.71, από την εφαρμογή των ανταγωνιστικών βακτηρίων εναντίον του φυτοπαθογόνου μύκητα *Botrytis cinerea* σε φυτά τομάτας, προέκυψε μια διαβαθμισμένη μείωση της διαμέτρου της νεκρωτικής κηλίδας στα μολυσμένα φύλλα. Ως αποτέλεσμα αυτού, υπολογίσθηκε η σοβαρότητα της ασθένειας (Disease severity, DS), εκφρασμένη σε ποσοστιαία διαβαθμισμένη κλίμακα (Rating scale) με τιμές: 0= ασυμπτωματικό φύλλο, 1=0.1- 5%, 2= 5.1- 20%, 3= 20.1- 40% και 4= 40.1- 100% (Lee et al., 2006).



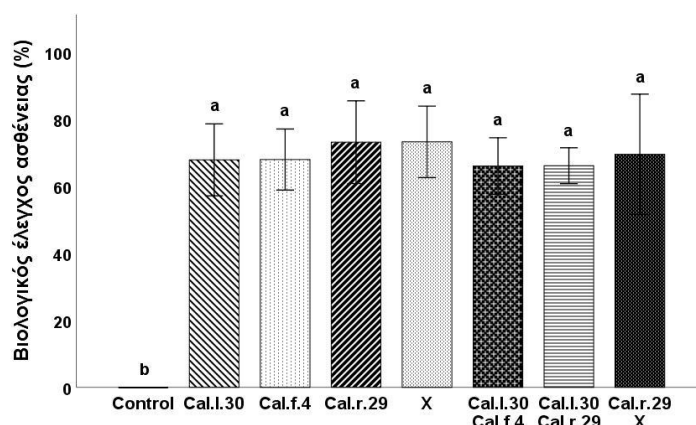
Εικόνα 3.71 Κλίμακα διαβάθμισης της σοβαρότητας της ασθένειας του φυτοπαθογόνου μύκητα *Botrytis cinerea* σε φυτά *Solanum lycopersicum*, μετά την εφαρμογή των ανταγωνιστικών βακτηριακών στελεχών Cal.l.30, Cal.f.4, Cal.r.29 και X και των μιγμάτων τους Cal.l.30-Cal.f.4, Cal.l.30-Cal.r.29 και Cal.r.29-X, σε συνθήκες θερμοκηπίου.

Η εφαρμογή των βακτηρίων ως μεμονωμένα στελέχη και ως μίγματα βακτηρίων, είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση της εξάπλωσης της νεκρωτικής κηλίδας στα φύλλα τομάτας σε σημαντικό βαθμό, με αποτέλεσμα τη μείωση της σοβαρότητας της ασθένειας. Όπως παρουσιάζεται και στο Διάγραμμα 3.31, όλες οι εφαρμογές μείωσαν σημαντικά την σοβαρότητα της ασθένειας σε σύγκριση με τα φυτά μάρτυρες.



Διάγραμμα 3.31 Ποσοστό της σοβαρότητας της ασθένειας (Disease Severity Index, DSI %) σε φύλλα μολυσμένων φυτών τομάτας από το φυτοπαθογόνο μύκητα *Botrytis cinerea* μετά την εφαρμογή των μεμονωμένων βακτηριακών στελεχών Cal.r.29, Cal.l.30, Cal.f.4 και X, καθώς και των τριών μιγμάτων βακτηρίων Cal.l.30-Cal.f.4, Cal.l.30-Cal.r.29 και Cal.r.29-X. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο των μετρήσεων με τις τυπικές αποκλίσεις των τιμών ($n=3$). Τα διαφορετικά γράμματα υποδεικνύουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές ($p < 0.05$) μεταξύ των τιμών ανά μεταχείριση, μετά από την πραγματοποίηση Tukey's test.

Τόσο οι μεταχειρίσεις των μεμονωμένων βακτηριακών στελεχών, όσο και των μιγμάτων τους παρουσίασαν μειωμένο ποσοστό της σοβαρότητας της ασθένειας που ωστόσο δε διέφερε σημαντικά μεταξύ των μεταχειρίσεων. Ταυτόχρονα, το ποσοστό βιολογικού ελέγχου της ασθένειας μεταξύ των μεμονωμένων στελεχών και μιγμάτων βακτηρίων ήταν υψηλό για όλες τις μεταχειρίσεις και δε διέφερε σημαντικά μεταξύ τους (Διαγρ. 3.32).



Διάγραμμα 3.32 Ποσοστό βιολογικού ελέγχου της ασθένειας (Disease Control Value, DCV %) σε φύλλα μολυσμένων φυτών τομάτας από το φυτοπαθογόνο μύκητα *Botrytis cinerea* σε φύλλα τομάτας, μετά την εφαρμογή των μεμονωμένων βακτηριακών στελεχών Cal.r.29, Cal.l.30, Cal.f.4 και X, καθώς και των τριών μιγμάτων βακτηρίων Cal.l.30-Cal.f.4, Cal.l.30-Cal.r.29 και Cal.r.29-X. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο των μετρήσεων με τις τυπικές αποκλίσεις των τιμών ($n=3$). Τα διαφορετικά γράμματα υποδεικνύουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές ($p < 0.05$) μεταξύ των τιμών ανά μεταχείριση, μετά από την πραγματοποίηση Tukey's test.

3.6 Γονιδιωματική ανάλυση των στελεχών Cal.l.30, Cal.l.11, Cal.f.4 και X.

Τα ισχυρά βακτηριακά στελέχη Cal.l.30, Cal.f.4, Cal.l.11 και X επιλέχθηκαν ως αντιπροσωπευτικά στελέχη για την αλληλούχιση του γονιδιώματός τους. Από τη φυλογενετική ανάλυση των στελεχών Cal.l.30, Cal.l.11 και Cal.f.4 με βάση το γονίδιο 16S rRNA, βρέθηκε ότι τα βακτήρια ανήκουν στο είδος *B. halotolerans*. Αντίστοιχα, η φυλογενετική ανάλυση του ριζοσφαιρικού στελέχους X, που πραγματοποιήθηκε σε προηγούμενες μελέτες, με τους φυλογενετικούς δείκτες 16S rRNA, ITS, rpoB, GacS και με πολλαπλά θραύσματα DNA στη μηχανή αναζήτησης BLAST του NCBI, έδειξαν ότι το στέλεχος X είναι κοντά φυλογενετικά στο βακτήριο *P. fluorescens* A506. Από τα αποτελέσματα της γονιδιωματικής επιβεβαιώθηκε ο αρχικός χαρακτηρισμός των στελεχών Cal.l.30, Cal.f.4 και Cal.l.11 ως *B. halotolerans*, σε αντίθεση με το πρώην χαρακτηρισμένο ως *P. fluorescens* X που ταυτοποιήθηκε τελικά ως *P. carnis* X.

Η φυλογενετική ανάλυση έχοντας ως μοναδικό γονίδιο αναφοράς το 16S rRNA γονίδιο δεν μπορεί να καθορίσει με ακρίβεια τη συγγένεια μεταξύ των στελεχών ενός είδους. Οι πολύ συντηρημένες αλληλουχίες των 16S rRNA νουκλεοτιδικών αλληλουχιών οδηγεί σε μετρίου επιπέδου διαφοροποίηση μεταξύ των βακτηριακών στελεχών και ειδών (Wall, 2016). Ίσως κάποιες από τις περιοχές αναγνώρισης που είναι υπεύθυνες για τη διαφοροποίηση των συγγενικών στελεχών να υπόκεινται σε ξεχωριστή εξελικτική πίεση σε σύγκριση με τους μελετώμενους φυλογενετικούς δείκτες. Ως εκ τούτου, προκειμένου η ταξινόμηση των στελεχών να είναι αξιόπιστη θα πρέπει να πραγματοποιείται μέσω του Average Nucleotide Identity (ANI) και του digital DNA-DNA Hybridization (dDDH), τα όποια αποτελούν ένα μέτρο υπολογισμού της φυλογενετικής απόστασης των γονιδιωμάτων (Genome-to-Genome Distance Calculation, GGDC) μεταξύ τους (Wall, 2016). Σύμφωνα με τους Chun και συνεργάτες, μόνο τα στελέχη που παρουσιάζουν ποσοστό ομολογίας του 16S rRNA γονιδίου $\geq 98.7\%$ θα πρέπει να επιλέγονται για ανάλυση dDDH (Chun et al., 2018).

3.6.1 Ανάλυση της φυλογενετικής απόστασης των γονιδιωμάτων των στελεχών Cal.l.30, Cal.f.4 και Cal.l.11 του είδους *B. halotolerans* με ANI και dDDH

Η ανάλυσή της φυλογενετικής απόστασης των γονιδιωμάτων (GGDC) έδειξε ότι όλα τα στελέχη του γένους *Bacillus* που μελετήθηκαν (Cal.l.30, Cal.l.11 και Cal.f.4) ανήκουν σε ένα μόνο είδος, με τις τιμές dDDH να κυμαίνονται μεταξύ 82 % και 93.40 %. Η dDDH ανάλυση με το γονιδίωμα του *B. halotolerans* ATCC 25096 (type strain) ήταν επίσης $>70.0\%$ και

συγκεκριμένα 93.40 %, 92.40 % και 87.90 % για τα στελέχη Cal.l.30, Cal.l.11 και Cal.f.4, αντίστοιχα (Πίν. 3.30).

Οι τιμές ANI που προέκυψαν ταυτίστηκαν με τα αποτελέσματα της dDDH ανάλυσης και επιβεβαίωσαν ότι όλα τα στελέχη Cal.l.30, Cal.l.11 και Cal.f.4 ανήκουν στο είδος *B. halotolerans*. Οι τιμές ANI σε σύγκριση με τη γονιδιωματική αλληλουχία του βακτηρίου *B. halotolerans* ATCC 25096 (type strain) ήταν σημαντικά υψηλές με ποσοστό πάνω από > 99 %. Όπως παρατηρείται και στον Πίνακα 3.32, παρ' όλο που με κάποια βακτήρια το ποσοστό ομολογίας του dDDH είναι στο 82 % και το ποσοστό ANI στο 99.2 %, από τη σύγκριση με το type strain *B. halotolerans* ATCC 25096 οι τιμές ήταν υψηλότερες από τα αναγνωρισμένα ως κατώτερα όρια των 70 % για το dDDH και 95–96 % για το ANI (Richter & Rosselló-Móra, 2009; Wayne et al., 1987).

Πίνακας 3.32 Υπολογισμός της φυλογενετικής απόστασης των γονιδιωμάτων (Genome-to-Genome Distance Calculation, GGDC) των στελεχών Cal.l.30, Cal.l.11 και Cal.f.4 μεταξύ τους και με πρότυπα γονιδιώματα και παρουσίαση των τιμών (%) ANI (Average Nucleotide Identity) και dDDH (digital DNA-DNA Hybridization).

	dDDH									
	Bacterial strain (Accession Nr)	Cal.l.30 (JAEACK0000000000)	Cal.l.11 (JAEACI0000000000)	Cal.f.4 (JAEACI0000000000)	<i>B. halotolerans</i> ZB201702 (CP029364)	<i>B. halotolerans</i> F43-1 (CP041357)	<i>Bacillus</i> sp. PAMC26543 (CP060193)	<i>B. halotolerans</i> XH-1 (CP061284)	<i>B. halotolerans</i> P1 (CP065858)	<i>B. halotolerans</i> ATCC 25096 (LPVF0000000000)
ANI	Cal.l.30 (JAEACK0000000000)	100	92.97	92.40	82.40	82.20	82.20	81.40	81.80	93.40
	Cal.l.11 (JAEACI0000000000)	99.11	100	99.90	82.50	82.20	82.30	81.40	81.70	92.40
	Cal.f.4 (JAEACI0000000000)	99.09	99.99	100	82.20	82.00	82.20	80.70	81.40	87.90
	<i>B. halotolerans</i> ZB201702 (CP029364)	98.07	98.07	98.05	100	95.00	90.20	94.90	90.30	82.10
	<i>B. halotolerans</i> F43-1 (CP041357)	98.01	98.03	98.04	99.37	100	89.80	93.40	89.70	82.00
	<i>Bacillus</i> sp. PAMC26543 (CP060193)	98.00	98.01	98.00	98.81	98.80	100	89.90	92.00	81.40
	<i>B. halotolerans</i> XH-1 (CP061284)	97.95	97.91	97.85	99.40	99.31	99.88	100	89.60	81.10
	<i>B. halotolerans</i> P1 (CP065858)	99.01	98.00	97.98	98.82	98.75	99.07	89.60	100	81.50
	<i>B. halotolerans</i> ATCC 25096 (LPVF0000000000)	99.26	99.12	99.08	99.02	98.02	98.01	97.89	97.99	100

3.6.2 Ανάλυση της φυλογενετικής απόστασης του γονιδιώματος του βακτηρίου *Pseudomonas carnis* X με ANI και dDDH

Μετά την ολοκλήρωση της αλληλούχισης του γονιδιώματος του στελέχους X (draft genome sequencing) και τη σύσταση του NCBI, η *in silico* ανάλυσή της φυλογενετικής απόστασης του γονιδιώματος του στελέχους X με ANI και dDDH έδειξε ότι το στέλεχος X ανήκει στο είδος *P. carnis*. Όπως παρατηρείται και στον Πίνακα 3.33, οι αποδεκτές τιμές ANI και dDDH, με ποσοστά > 97 % και >70 % αντίστοιχα, παρατηρήθηκαν μόνο για τα βακτήρια *Pseudomonas* sp. MYb193, *Pseudomonas* sp. J380 και *Pseudomonas carnis* 96A1.

Πίνακας 3.33 Υπολογισμός της φυλογενετικής απόστασης του γονιδιώματος (Genome-to-Genome Distance Calculation, GGDC) του στελέχους X με πρότυπα γονιδιώματα και παρουσίαση των τιμών (%) ANI (Average Nucleotide Identity) και dDDH (digital DNA-DNA Hybridization).

Bacterial Strains	GenBank Accession Nr	ANI (%)	dDDH (%)	bp
X	JAEACS000000000	100	100	5,984,267
<i>Pseudomonas</i> sp. MYb193	CP023269	98.52	87.80	6,211,636
<i>Pseudomonas</i> sp. J380	CP043060	97.48	79.40	6,261,650
<i>Pseudomonas fluorescens</i> A506	CP003041	95.24	62.80	5,962,570
<i>Pseudomonas lurida</i> MYb11	CP023272	86.93	32.50	6,100,532
<i>Pseudomonas carnis</i> 96A1	JAAMRA000000000	97.50	79.20	6,350,780

3.6.3 Πρόβλεψη συστάδων γονιδίων για τη βιοσύνθεση δευτερογενών μεταβολιτών στο γονιδίωμα του βακτηρίου *B. halotolerans* Cal.1.30

Οι συστάδες γονιδίων για τη βιοσύνθεση δευτερογενών μεταβολιτών (Secondary Metabolites Biosynthetic Gene Clusters, BGCs) που σχετίζονται με αντιμικροβιακές ιδιότητες, μελετήθηκαν με *in silico* ανάλυση σε όλα τα στελέχη του είδους *B. halotolerans*. Τα γονιδιώματα αναλύθηκαν με antiSMASH προκειμένου να λάβουμε μια πρώτη άποψη για τις προβλεπόμενες ενώσεις οι οποίες έχουν ομοιότητες με ήδη αναγνωρισμένες συστάδες γονιδίων. Σαφώς, οι προβλέψεις αυτές τονίζουν το δυναμικό των βακτηρίων σε επίπεδο γονιδιώματος αλλά όχι απαραίτητα τη δυνατότητα βιοσύνθεσης των δευτερογενών μεταβολιτών. Επιπλέον, η ανάλυση με antiSMASH επέτρεψε τη σύγκριση των BGCs με τις συστάδες γονιδίων κατάλληλων στελεχών αναφοράς.

Όπως παρουσιάζεται στον Πίνακα 3.34 οι συστάδες γονιδίων μέσω των *sfp*-εξαρτώμενων NRPSs για τη βιοσύνθεση δευτερογενών μεταβολιτών surfactin, plipastatin, bacillaene και bacillibactin βρέθηκαν και στα τρία στελέχη Cal.1.30, Cal.1.11 και Cal.f.4 του είδους *B. halotolerans*. Η συστάδα γονιδίων για την παραγωγή της ένωσης surfactin παρουσίασε 86 % ομοιότητα σε σύγκριση με το στέλεχος αναφοράς. Αντίστοιχα, για τη συστάδα γονιδίων βιοσύνθεσης της plipastatin, όλα τα στελέχη του είδους *B. halotolerans* παρουσίασαν 100 %

ομοιότητα με το πρότυπο στέλεχος. Τέλος, οι συστάδες γονιδίων για τη βιοσύνθεση των δευτερογενών μεταβολιτών bacillibactin, subtilosin A and bacilysin είναι παρούσες σε όλα τα στελέχη *B.halotolerans*, παρουσιάζοντας ομοιότητα 100 % με τα πρότυπα στελέχη.

Πίνακας 3.34 Συστάδες γονιδίων που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση δευτερογενών μεταβολιτών του βακτηρίου *B. halotolerans* Cal.I.30.

Cluster	Type	Compound	MIBiG ID (% of genes show similarity)	Predicted size (bp)
1	NRPS	Surfactin	BGC0000433_c1 (86 %)	65.394
2	T1PKS-NRPS	Kalimantacin A	BGC0001532_c1 (20%)	117.825
3	TransAT-PKS-NRPS	Bacillaene	BGC0001089_c1 (100%)	114.235
4	TransAT-PKS-NRPS	Mojavensin/Plipastatin	BGC0001095_c1 (100%)	129.752
5	NRPS	Bacillibactin	BGC0000309_c1 (100%)	49.738
6	Other	Bacilysin	BGC0001184_c1 (100%)	41.418
7	Sactipeptide	Subtilosin	BGC0001184_c1 (100%)	21.612

Η ανάλυση της συστάδας γονιδίων 4 (cluster 4), έδειξε ότι παρακείμενα της BGC για τη βιοσύνθεση του αντιβιοτικού fengycin (FEN)/ plipastatin (PPS), υπάρχει ακόμη μια BGC που φέρει ομοιότητες με εκείνο για την παραγωγή ενός λιποπεπτιδίου τύπου iturin (iturin- type), το mojavensin (Dunlap et al., 2019) (Εικ. 3.72).

B. halotolerans F41-3

B. halotolerans Cal.I.30

B. halotolerans FJAT-2398

B. cereus MBGJa3

Εικόνα 3.72 Σύγκριση των συστάδων γονιδίων για την βιοσύνθεση των δευτερογενών μεταβολιτών mojavensin (*ituA*, *ituB*, *ituC*) και plipastatin (*ppsA*, *ppsB*, *ppsC*, *ppsD*, *ppsE*) με antiSMASH, μεταξύ του *B. halotolerans* Cal.I.30 και των πρότυπων βακτηρίων *B. halotolerans* F41-3, *B. halotolerans* FJAT-2398 και *B. cereus* MBGJa3.

Μετά από BLAST ανάλυση των συστάδων γονιδίων βρέθηκε ότι κάποια βακτήρια του είδους *B. halotolerans* (*B. halotolerans* F41-3 και *B.halotolerans* P1) φέρουν μόνο τη BGC για τη βιοσύνθεση του plipastatin, ενώ άλλα στελέχη (*B. halotolerans* FJAT-2398) φέρουν και τις δύο BGCs για τη βιοσύνθεση των plipastatin και mojavensin (Εικ. 3.71). Η ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας με BlastN και με antiSMASH ανάλυση της συστάδας των γονιδίων, αποκάλυψαν επίσης την παρουσία των πανομοιότυπων GBCs για τη βιοσύνθεση των μεταβολιτών plipastatin και mojavensin στο βακτήριο *B. cereus* MBGJa3 (accession number: CP026523) (Εικ. 3.72).

Επιπλέον, όλα τα στελέχη *B. halotolerans* έχουν προβλέψεις για την ύπαρξη GBC για τη βιοσύνθεση της kalimantacin A, παρουσιάζοντας ωστόσο χαμηλή ομοιότητα (20%) με την ήδη χαρακτηρισμένη του πρότυπου στελέχους (Πίν. 3.32). Ωστόσο, μετά από BlastN, Blast P και antiSMASH ανάλυση των συστάδων γονιδίων, βρέθηκε ότι η πιθανή BGC της ένωσης kalimantacin A, παρουσιάζει υψηλή ομοιότητα με μια FAS-PKS συστάδα βιοσυνθετικών γονιδίων που βρέθηκαν στα βακτήρια *B. velezensis* SQR9 (accession number NZ_CP006890) και *B. velezensis* AP183 (NZ_CP029296) (Εικ. 3.73). Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 3.72, η συστάδα βιοσυνθετικών γονιδίων FAS-PKS του *B. velezensis* SQR9 πιθανά εμπλέκεται στη βιοσύνθεση ενός λιπαρού οξέος με μακριά ανθρακική αλυσίδα (C15 ή C17) το οποίο έχει παρουσιάσει αντιμικροβιακή δράση εναντίον μυκήτων και βακτηρίων.



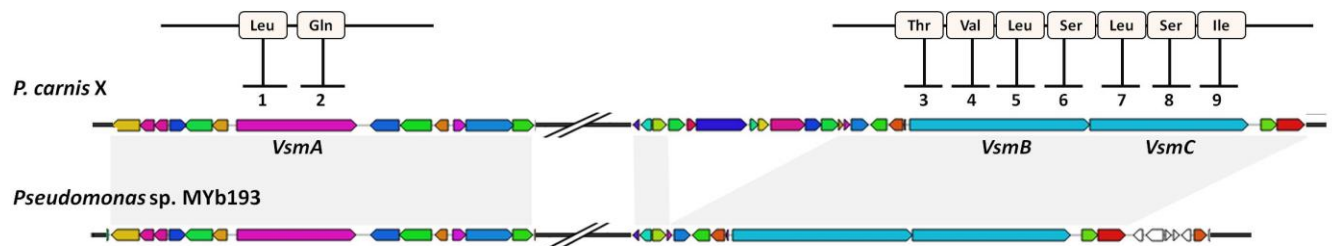
Εικόνα 3.73 Σύγκριση των συστάδων γονιδίων για την βιοσύνθεση του δευτερογενούς μεταβολίτη kalimantacin A με antiSMASH, μεταξύ του *B. halotolerans* Cal.1.30 και των πρότυπων βακτηρίων *B. velezensis* AP183, και *B. velezensis* SQR9.

3.6.4 Πρόβλεψη συστάδων γονιδίων για τη βιοσύνθεση δευτερογενών μεταβολιτών στο γονιδίωμα του βακτηρίου *P. carnis* X

Η *in silico* ανάλυση του βακτηρίου *P. carnis* X επιβεβαίωσε την ύπαρξη των γονιδίων που εμπλέκονται στην ανταγωνιστικότητα του στελέχους, όπως επισήμαναν σε προηγούμενη μελέτη τους οι Kremmydas και συνεργάτες (Kremmydas et al., 2013). Συγκεκριμένα, η *in silico* ανάλυση του γονιδιώματος του *P. carnis* X παρουσίασε 100 % με τις αλληλουχίες των γονιδίων *sup1* (αφυδρογονάση της γλυκόζης (*gcd*)), *sup2*, *sup3* και *sup4* (βιοσύνθεση της πυρρολοκινολινκινόνης (PQQ)) και των *sup5* και *sup6* γονιδίων, οργανωμένα σε υποθετικό οπερόνιο *supX* που περιέχουν ένα επιπλέον γονίδιο που κωδικοποιεί για μια μη- ριβοσωμική πεπτιδική συνθάση (NRPS), όπως κατατέθηκαν στη βάση δεδομένων GenBank (Kremmydas et al., 2013).

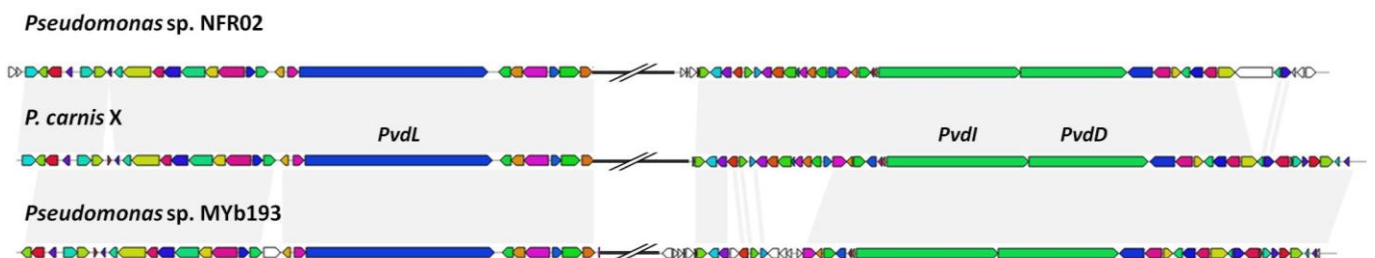
Μετά από BlastN ανάλυση βρέθηκε ότι τα NRPSs για τη βιοσύνθεση της ένωσης viscosinamide του βακτηρίου *P. carnis* X (μετονομασία από *P. fluorescens* X) παρουσιάζουν υψηλή ομοιότητα με ποσοστό > 98.63 % με εκείνα που εμφανίζονται στο γονιδίωμα των βακτηρίων *Pseudomonas* sp. U2W1, *Pseudomonas* sp. A2W4.9, *Pseudomonas* sp. MYb193

και *Pseudomonas* sp. J380 (Fukuda et al., 2021). Στην Εικόνα 3.71 γίνεται σύγκριση των συστάδων γονιδίων για τη βιοσύνθεση του δευτερογενή μεταβολίτη viscosinamide μεταξύ του *P. carnis* X και του *Pseudomonas* sp. MYb193, όπου σημειώνονται οι κοινές περιοχές μεταξύ τους. Ταυτόχρονα, με τη βοήθεια του NRPSpredictor2 έγινε η πρόβλεψη της αμινοξικής αλληλουχίας της πεπτιδικής αλυσίδας, η οποία ήταν πανομοιότυπη της ένωσης viscosinamide (Leu-Gln-Thr-Val-Leu-Ser-Leu-Ser-Ile) που ταυτοποιήθηκε για το βακτήριο *Pseudomonas* A2W4.9 (Εικ. 3.73) (Rotting et al., 2011). Με βάση τις συγκρίσεις των NRPS, το πιο κοντινό BGC που ωστόσο δεν κωδικοποιεί για την ένωση viscosinamide, βρέθηκε από το βακτήριο *P. lactis* SS101 (μετονομασία από *P. fluorescens* SS101).



Εικόνα 3.74 Σύγκριση των συστάδων γονιδίων για την βιοσύνθεση του δευτερογενούς μεταβολίτη viscosinamide (*VsmA*, *VsmB*, *VsmC*) μετά από antiSMASH ανάλυση, μεταξύ του *P. carnis* X και του *Pseudomonas* sp. MYb193. Πρόβλεψη και καταγραφή της αμινοξικής αλληλουχίας του δευτερογενή μεταβολίτη viscosinamide με τη βοήθεια του NRPSpredictor2.

Επιπλέον, μετά από antiSMASH ανάλυση βρέθηκε ότι το βακτηριακό στέλεχος *P. carnis* X (μετονομασία από *P. fluorescens* X), παρουσιάζει συστάδες γονιδίων για τη βιοσύνθεση ενός σημαντικού μη ριβοσωμικού πεπτιδίου (NRP), τη σιδηροφόρο ένωση pyoverdine. Με βάση τις συγκρίσεις των NRPS τα βακτηριακά στελέχη *Pseudomonas* sp. MYb193 και *Pseudomonas* sp. NFR02 παρουσιάζουν υψηλή ομολογία με τα αντίστοιχα BGCs του βακτηρίου *P. carnis* X με ποσοστά > 74 %. Στην εικόνα 3.74 παρουσιάζονται τα BGCs για τη βιοσύνθεση της ένωσης pyoverdine (*PvdL*, *PvdI* και *PvdD*), μεταξύ του βακτηρίου *P. carnis* X και των στελεχών NFR02 και MYb193, ενώ είναι σημειωμένες και οι περιοχές ομολογίας τους (Εικ. 3.75).



Εικόνα 3.75 Σύγκριση των συστάδων γονιδίων για την βιοσύνθεση της σιδηροφόρου ένωσης pyoverdine (*PvdL*, *PvdI* και *PvdD*) μετά από antiSMASH ανάλυση του βακτηρίου *P. carnis* X σε σύγκριση με εκείνη των *Pseudomonas* sp. MYb193 και *Pseudomonas* sp. NFR02.

Συζήτηση



4. Συζήτηση

Τα φυτά συνυπάρχουν με μια πλούσια κοινότητα ωφέλιμων βακτηρίων η οποία συναντάται τόσο επιφανειακά των ιστών και την περιοχή της ριζόσφαιρας, όσο και ενδοφυτικά. Ιδιαίτερη έμφαση έχει δοθεί στη μελέτη των ενδοφυτικών βακτηρίων, καθώς παρουσιάζουν σημαντικό πλεονέκτημα έναντι των ριζοσφαιρικών ή επιφυτικών βακτηρίων εξαιτίας της άμεσης αλληλεπίδρασής τους με το φυτό- ξενιστή.

Τα τελευταία χρόνια η απομόνωση ενδοφυτικών βακτηρίων από πλήθος φαρμακευτικών φυτών, έχει ενισχύσει σημαντικά τη μελέτη της βιοποικιλότητας των ενδοφυτικών βακτηρίων και των μηχανισμών δράσης τους, όσο και την επίδρασή τους στο φυτό- ξενιστή (Arunachalam & Gayathri, 2010; Beiranvand et al., 2017; Bhore et al., 2013; Mohammadi et al., 2016; Pereira et al., 2016; Shurigin et al., 2018). Το φυτό *Calendula officinalis* αποτελεί ένα από τα πιο σημαντικά φαρμακευτικά φυτά που εφαρμόζεται στην παραδοσιακή ιατρική από το 12 π.Χ. μέχρι και σήμερα, εξαιτίας του πλήθους των αντιμικροβιακών κυρίως ιδιοτήτων του (Khalid & Da Silva, 2012). Έως τώρα, μόνο μία μελέτη έχει πραγματοποιηθεί για τα ενδοφυτικά βακτήρια του φαρμακευτικού φυτού *Calendula officinalis*, από το οποίο απομονώθηκε ένας πολύ μικρός αριθμός βακτηρίων (πέντε στελέχη) και μάλιστα μόνο από τα φύλλα (τρία) και τους βλαστούς (δύο) (Mohammadi et al., 2016).

Στην παρούσα μελέτη απομονώθηκαν συνολικά 119 καλλιεργήσιμα ενδοφυτικά βακτήρια από φύλλα, άνθη και ρίζες του φαρμακευτικού φυτού *Calendula officinalis*, εκ των οποίων 37 αντιπροσωπευτικά στελέχη μελετήθηκαν για το σύνολο των ιδιοτήτων τους. Η μελέτη αυτή είχε σκοπό το χαρακτηρισμό των ενδοφυτικών βακτηρίων του φυτού *Calendula officinalis* και την αξιολόγηση των άμεσων και έμμεσων μηχανισμών δράσης τους για την πιθανή εφαρμογή τους ως παράγοντες που προάγουν την ανάπτυξη και προστασία των φυτών. Παράλληλα, μελετήθηκε εκτενέστερα το ήδη χαρακτηρισμένο ριζοσφαιρικό βακτήριο *Pseudomonas carnis* X του φυτού *Phaseolus vulgaris*, είτε μόνο του, είτε σε σύγκριση με τα ενδοφυτικά βακτήρια.

4.1 Επίδραση των ενδοφυτικών βακτηρίων του φυτού *Calendula officinalis* και του ριζοσφαιρικού βακτηρίου X του *Phaseolus vulgaris* στην ανάπτυξη των φυτών

Τα καλλιεργήσιμα ενδοφυτικά βακτήρια του φυτού *Calendula officinalis* που απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν ανήκουν στα γένη *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Pantoea*, *Stenotrophomonas* και *Agrobacterium*, τα οποία αποτελούν τα πιο συχνά γένη απομονωμένων ενδοφυτικών βακτηρίων (Santoyo et al., 2016). Μάλιστα, ένας μεγάλος αριθμός βακτηρίων

που ανήκουν στα παραπάνω γένη έχουν μελετηθεί συστηματικά για την ικανότητά τους να προάγουν την ανάπτυξη και προστασία των φυτών (Asari et al., 2016; Baldan et al., 2015; Zamioudis et al., 2013). Παρ' όλο που η απομόνωση των ενδοφυτικών βακτηρίων πραγματοποιήθηκε από ασυμπτωματικούς ιστούς, πολλά από τα είδη των βακτηρίων που ταυτοποιήθηκαν, έχουν χαρακτηριστεί βιβλιογραφικά ως ωφέλιμα και ταυτόχρονα πιθανά παθογόνα στελέχη, όπως τα βακτήρια των ειδών *Argobacterium tumefaciens*, *Ps. brassicacearum* και *Ps. viridiflava* (Belimov et al., 2007; Escobar & Dandekar, 2003; Jakob et al., 2002). Ωστόσο, σε καμία από τις εφαρμογές των ενδοφυτικών βακτηρίων όσο και του ριζοσφαιρικού βακτηρίου *P. carnis* X δεν παρατηρήθηκαν συμπτώματα παθογένειες στα φυτά *A. thaliana* Col-0, υπό αυτές τις συνθήκες εφαρμογής. Αντιθέτως, από τον *in vitro* εμβολιασμό των βακτηρίων στα φυτά *A. thaliana*, παρατηρήσαμε τη θετική επίδραση των περισσότερων στελεχών στην ανάπτυξη και τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των φυτών, όπως είναι το νωπό βάρος, το μήκος της κεντρικής ρίζας, ο αριθμός των πλευρικών ριζών, καθώς και ο αριθμός και το μήκος των ριζικών τριχιδίων.

Τα PGPB έχουν μελετηθεί εκτενώς για την επίδρασή τους στην ανάπτυξη και τη βελτίωση των μορφολογικών χαρακτηριστικών των φυτών με τη σύνθεση και παραγωγή φυτοορμονών, όπως το ινδολοξικό οξύ (IAA), καθώς και την παραγωγή βακτηριακών πτητικών ενώσεων (BVCs) οι οποίες επηρεάζουν τη ρύθμιση των ορμονών (Glick, 2012; Gravel et al., 2007; Mohite, 2013; Patten & Glick, 2002; Persello-Cartieaux et al., 2003; Rath et al., 2018; Wang et al., 2015; Xie et al., 1996).

Η χαμηλή συγκέντρωση παραγόμενου IAA από τα βακτήρια επηρεάζει τα φυτά με αποτέλεσμα να παρουσιάζουν πιο αυξημένο μήκος κεντρικής ρίζας, σε αντίθεση με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση που μειώνει το μήκος της κεντρικής ρίζας, αυξάνοντας ταυτόχρονα τον αριθμό των πλευρικών ριζών, καθώς και τον αριθμό και το μήκος των ριζικών τριχιδίων (Persello-Cartieaux et al., 2003; Xie et al., 1996). Στην παρούσα μελέτη, το 66,7 % των βακτηρίων του γένους *Bacillus* spp., το 100% των στελεχών *Pseudomonas* spp., συμπεριλαμβανομένου του X, καθώς και τα στελέχη των γενών *Agrobacterium* sp. και *Pantoea* sp., βρέθηκαν θετικά στη σύνθεση και την παραγωγή της φυτοορμόνης IAA ή παραγώγων της. Επιπρόσθετα, τα βακτήρια του γένους *Bacillus* spp., *Agrobacterium* sp. και *Pantoea* sp., βρέθηκαν θετικά στην παραγωγή της ακετοΐνης ή της οξειδωμένης της μορφής, 2,3- βουτανεδιόνη, ενώ κανένα στέλεχος του *Pseudomonas* spp. δε βρέθηκε θετικό στην παραγωγή των συγκεκριμένων πτητικών οργανικών ενώσεων. Η παραγωγή πλήθους βακτηριακών πτητικών ενώσεων, συμπεριλαμβανομένων της ακετοΐνης και της 2,3-

βουτανεδιόνης, επηρεάζουν επίσης σημαντικά την ανάπτυξη των φυτών και βελτιώνουν τα μορφολογικά χαρακτηριστικά του ριζικού συστήματος, είτε άμεσα, είτε ρυθμίζοντας το επίπεδο του παραγόμενου IAA (Bailly et al., 2014; Bavaresco et al., 2020; Chu et al., 2020; Rath et al., 2018; Ryu et al., 2003). Επομένως, η διαφορετική συγκέντρωση παραγόμενου IAA από τα βακτήρια σε συνάρτηση με τις παραγόμενες πτητικές ενώσεις ακετοΐνη και 2,3-βουτανεδιόνη, πολύ πιθανό να επηρέασε ανάλογα και τα μορφολογικά χαρακτηριστικά της ρίζας (Palacio-Rodríguez et al., 2017).

Συγκεκριμένα, τα βακτήρια Cal.r.35 (*Agrobacterium tumefaciens*) και Cal.l.7a (*Pantoea* sp.) που εμφάνισαν τη μεγαλύτερη παραγωγή IAA και βρέθηκαν θετικά στην παραγωγή ακετοΐνης *in vitro*, παρουσιάζουν φυτά *A. thaliana* με σημαντικά αυξημένο ολικό νωπό βάρος, το μικρότερο μήκος κεντρικών ριζών, καθώς και αυξημένο αριθμό πλευρικών ριζών και ριζικών τριχιδίων. Τα αντίθετα ακριβώς αποτελέσματα παρατηρήσαμε από τα στελέχη των βακτηρίων *B. mycoides* και *B. cereus* που παρουσίασαν χαμηλή συγκέντρωση παραγόμενου IAA, καθώς και από το βακτήριο Cal.r.8.2 (*Stenotrophomonas* sp.) το οποίο βρέθηκε αρνητικό στην παραγωγή IAA και ακετοΐνης *in vitro*. Τέλος, τα είδη βακτηρίων *B. subtilis*, *B. halotolerans*, *B. velezensis*, *B. megaterium*, *Ps. brassicacearum*, *Ps. kilonensis*, *Ps. koreensis* και *Ps. viridiflava*, καθώς και το στέλεχος X, που παράγουν ενδιάμεσες τιμές IAA *in vitro*, κατά την εφαρμογή τους σε απόσταση από τα φυτά *A. thaliana* Col-0 εμφανίζουν φυτά με αυξημένες τιμές ολικού νωπού βάρους, καθώς και μεγάλο αριθμό πλευρικών ριζών.

Οι παραγόμενες βακτηριακές πτητικές ενώσεις των ενδοφυτικών βακτηρίων και του ριζοσφαιρικού στελέχους X επηρέασαν εξίσου σημαντικά την ανάπτυξη των φυτών *A. thaliana* Col-0. Συγκεκριμένα, η εφαρμογή των βακτηρίων που ανήκουν στα είδη *B. subtilis*, *B. velezensis*, *B. halotolerans*, *B. megaterium*, *Ps. brassicacearum*, *Pseudomonas* sp., *Agrobacterium tumefaciens* και *Pantoea* sp., καθώς και το ριζοσφαιρικό βακτήριο *P. carnis* X, εμφανίζουν φυτά με τις υψηλότερες τιμές ολικού νωπού βάρους και εμβαδού φυλλικής επιφάνειας, σε σύγκριση με τα φυτά μάρτυρες. Μάλιστα, αυτά τα είδη βακτηρίων ξεχωρίζουν και κατά την άμεση εφαρμογή τους στα φυτά *A. thaliana*, όπως αναλύθηκε παραπάνω.

Η εφαρμογή των βακτηρίων στο ακρορρίζιο των φυτών *A. thaliana*, είχε ως αποτέλεσμα να επιδράσουν με διαφορετικό τρόπο στα μορφολογικά και αναπτυξιακά χαρακτηριστικά των φυτών. Τα φυτά παρουσιάζουν πιο κοντή κεντρική ρίζα, μειωμένο αριθμό πλευρικών ριζών και μειωμένο ολικό νωπό βάρος, σε σύγκριση με την εφαρμογή τους από απόσταση. Η περιοχή γύρω από το ακρορρίζιο είναι πλούσια σε θρεπτικά στοιχεία από τα ριζικά

εκκρίματα, με αποτέλεσμα να ευνοείται η ανάπτυξη των βακτηρίων και η αύξηση του πληθυσμού τους (Badri et al., 2009; Bais et al., 2008). Η μεγάλη συγκέντρωση των βακτηρίων (αρχική συγκέντρωση 10^8 cfu/ ml) σε τόση μικρή απόσταση από τα φυτά και παράλληλα η αυξημένη παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών, όπως το IAA, ίσως να οφείλονται για τα μειωμένα αναπτυξιακά χαρακτηριστικά των φυτών. Με την υπόθεση αυτή συμφωνούν οι Persello-Cartieaux και συνεργάτες, σύμφωνα με τους οποίους η εφαρμογή βακτηρίων με συγκέντρωση έως και 10^5 cfu/ ml ευνοεί την ανάπτυξη και τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των φυτών *A. thaliana*, ενώ η συγκέντρωση των βακτηρίων από 10^6 cfu/ ml και πάνω προκαλεί μη αναστρέψιμη ζημιά στο φυτό (Persello-Cartieaux et al., 2001).

Σύμφωνα και με τα αποτελέσματα της μελέτης, η εφαρμογή των PGPEB μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη του ριζικού συστήματος των φυτών με την αύξηση των πλευρικών ριζών, του αριθμού και του μήκους των ριζικών τριχιδίων, ευνοώντας έτσι την απορρόφηση των απαραίτητων για την ανάπτυξη τους θρεπτικών στοιχείων και ιχνοστοιχείων (Bákonvi et al., 2009; Lin et al., 2018). Ωστόσο, εξαιτίας του πλήθους των ασβεστούχων εδαφών και του αλκαλικού τους pH, η διαθεσιμότητα των θρεπτικών στοιχείων, όπως είναι ο P όσο και ο Fe, είναι πολύ χαμηλή για τα φυτά (Adnan et al., 2017; Hansen et al., 2006). Ο εμπλουτισμός των εδαφών με ωφέλιμα PGPB μπορεί να ευνοήσει την απορρόφηση τόσο του φωσφόρου όσο και του σιδήρου, μέσω των ισχυρών μηχανισμών δέσμευσης και διαλυτοποίησης των συμπλοκοποιημένων στοιχείων (Emami et al., 2019; Glick, 2012; Varga et al., 2020). Στην παρούσα μελέτη ένας μεγάλος αριθμός των ενδοφυτικών βακτηρίων, καθώς και το ριζοσφαιρικό στέλεχος X, βρέθηκαν θετικά στη διαλυτοποίηση των αδιάλυτων συμπλόκων φωσφόρου [$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$] και στην παραγωγή σιδηροφόρων ενώσεων για τη δέσμευση του Fe^{3+} , μετά από *in vitro* βιοχημικές δοκιμές.

Ένα ακόμη στοιχείο που είναι απαραίτητο για την ανάπτυξη των φυτών και είναι δύσκολη η αφομοίωσή του είναι το άζωτο. Το νιτρικό N (NO_3^-), το αμμωνιακό N (NH_4^+) και η ουρία [$\text{CO}(\text{NH}_2)_2$], αποτελούν τις κύριες πηγές N που εφαρμόζονται στις καλλιέργειες και είναι διαθέσιμες για τα φυτά. Ωστόσο η αφομοίωσή τους δεν πραγματοποιείται αποκλειστικά και μόνο από τα φυτά, μα και από τα μικρόβια του εδάφους. Από τα αποτελέσματα φάνηκε πως ένα πολύ μικρό ποσοστό των ενδοφυτικών βακτηρίων κάθε γένους είναι θετικά στην *in vitro* παραγωγή ουρεάσης, καθιστώντας τα λιγότερο ανταγωνιστικά στην αφομοίωση του απαραίτητου N από τα φυτά. Φυσικά χρήζει περαιτέρω μελέτης η άμεση συνεισφορά των ωφέλιμων βακτηρίων στην αφομοίωση των απαραίτητων θρεπτικών συστατικών των φυτών.

Τα ξηρικά και άνυδρα εδάφη δημιουργούν εξαιρετικά δυσμενείς συνθήκες για την ανάπτυξη και την αναπαραγωγή των φυτών. Ωστόσο, υπάρχει μια ποικιλία ανθεκτικών και καλά προσαρμοσμένων φυτών, τα οποία δημιουργούν ταυτόχρονα συμβιωτικές σχέσεις με ανθεκτικά στην αλατότητα βακτήρια τα οποία προάγουν ταυτόχρονα την ανάπτυξη των φυτών (Dimkpa et al., 2009). Στην παρούσα μελέτη, το φυτό *Calendula officinalis* απομονώθηκε από την περιοχή των Σπάτων, μια ξηρή περιοχή, με φυσικά αλατούχα εδάφη. Πιθανά αυτό επηρέασε και την ανθεκτικότητα των ενδοφυτικών βακτηρίων στις ακραίες τιμές αλατότητας, θερμοκρασίας και pH. Η εφαρμογή των βακτηρίων σε υπόστρωμα με συγκέντρωση αλατιού ως και 2 % (w/ v), δεν επηρέασε σημαντικά την ανάπτυξη του μεγαλύτερου αριθμού των στελεχών. Αξιοσημείωτο είναι πως η πλειοψηφία των βακτηρίων του γένους *Bacillus* (87,5 %) επιβιώνει σε θερμοκρασία 45 °C φτάνοντας σε βέλτιστες συγκεντρώσεις κυττάρων 10^5 - 10^7 cfu/ ml, ενώ η έκθεση σε χαμηλότερες θερμοκρασίες δεν έχει φέρει ανάλογα αποτελέσματα. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, τα βακτήρια του γένους *Bacillus* έχουν τη δυνατότητα σχηματισμού σπορίων, που τους προσδίδουν σημαντική ανθεκτικότητα σε ακραίες συνθήκες θερμοκρασίας και pH, σε σύγκριση με άλλα γένη βακτηρίων (Baril et al., 2012). Επομένως, τα βακτήρια του γένους *Bacillus* εμφανίζουν ανταγωνιστικό πλεονέκτημα έναντι υπολοίπων, καθώς μπορούν να επιβιώσουν σε υποστρώματα με πιο ακραίες συνθήκες ανάπτυξης, όπως θερμοκρασία, pH, υγρασία και αλατότητα. Ως εκ τούτου τα πιο ανθεκτικά στελέχη στην ανάπτυξη σε υπόστρωμα με 5 % NaCl (w/v) παρουσιάστηκαν τα βακτήρια των ειδών *B. velezensis*, *B. halotolerans* και *B. subtilis*.

Η γεωργική παραγωγή επηρεάζεται σημαντικά από την αλατότητα των εδαφών, η οποία επιδρά αρνητικά στα διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια, τη βλαστικότητα, την ανάπτυξη και τελικά την απόδοση των καλλιεργειών (Khan & Panda, 2008; Forni et al., 2017). Στα αρχικά στάδια της καταπόνησης, η υψηλή συγκέντρωση σε αλατότητα επηρεάζει το οσμωτικό δυναμικό των φυτών, δυσχεραίνοντας έτσι την απορρόφηση του νερού (Munns, 2005). Επομένως, η εφαρμογή PGPB ανθεκτικά σε υψηλή συγκέντρωση αλατιού φέρει διπλό πλεονέκτημα στις καλλιέργειες, προσδίδοντας στα φυτά την απαραίτητη αντοχή στην καταπόνηση, ενώ παράλληλα επάγεται η ανάπτυξή τους (Qin et al., 2014; Palacio-Rodríguez et al., 2017; Vaishnav et al., 2019).

Στην παρούσα μελέτη, η επίδραση των ανθεκτικών βακτηρίων στην ανάπτυξη των φυτών σε υπόστρωμα με αυξημένη συγκέντρωση σε αλατότητα, μελετήθηκε με την εφαρμογή τους σε φυτά *A. thaliana* in vitro. Τα ενδοφυτικά βακτήρια *B. halotolerans* Cal.1.30, *B.*

halotolerans Cal.f.4, *B. velezensis* Cal.r.29 και το ριζοσφαιρικό βακτήριο X, επηρέασαν σημαντικά το ποσοστό επιβίωσης και την ανάπτυξη των φυτών *A. thaliana* Col-0, μετά από την ανάπτυξή τους σε υποστρώματα με διαφορετικές συγκεντρώσεις σε NaCl (75 mM και 150 mM). Το ποσοστό επιβίωσης των φυτών σε 150 mM NaCl με την εφαρμογή των βακτηρίων Cal.f.4, Cal.l.30, X και Cal.r.29 ήταν σημαντικά υψηλότερο σε σύγκριση με τα φυτά μάρτυρες, ενώ από την προσθήκη 75 mM NaCl στο υπόστρωμα, μόνο η επιβίωση των φυτών του μάρτυρα μειώθηκε (ποσοστό επιβίωσης 83 %). Ταυτόχρονα, στο υπόστρωμα με συγκέντρωση 75 mM NaCl, παρατηρήσαμε φυτά με σημαντικά αυξημένο ολικό νωπό βάρος σε σύγκριση με τα φυτά μάρτυρες, με τις εφαρμογές των ενδοφυτικών στελεχών Cal.f.4, Cal.l.30 και Cal.r.29 να εμφανίζουν τις υψηλότερες τιμές.

Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με ένα σημαντικό αριθμό βιβλιογραφικών αναφορών που έχουν αναδείξει την επίδραση των βακτηρίων στην προστασία και την ανάπτυξη των φυτών (Han et al., 2014; Palacio-Rodríguez et al., 2017; Pinedo et al., 2015). Τα PGPB που είναι ανθεκτικά στην αλατότητα, μπορούν να προστατεύσουν τα φυτά από τις επιπτώσεις της αλατότητας και της ξηρασίας, ενεργοποιώντας ένα πλήθος μηχανισμών όπως, η παραγωγή IAA, ACC- απαμινάσης, κυτοκινίνης, πτητικών οργανικών ενώσεων και εξω-πολυσακχαριτών (EPS) (Forni et al., 2017; Kim et al., 2014). Σύμφωνα με τους Egamberdieva και συνεργάτες, η παραγωγή IAA από τα βακτήρια *Pseudomonas putida* R4 και *Pseudomonas chlororaphis* R5, αύξησε σημαντικά τη βλαστικότητα των σπόρων και την ανάπτυξη των φυταρίων *Gossypium hirsutum* (βαμβάκι) σε υπόστρωμα με 100 mM NaCl (Egamberdieva et al., 2015). Ταυτόχρονα οι Cappellari και Banchio, μετά την εφαρμογή του βακτηρίου *Bacillus amyloliquefaciens* GB03 σε φυτά *Mentha piperita* σε υπόστρωμα με υψηλή συγκέντρωση σε αλατότητα, βρέθηκε ότι η βακτηριακή πτητική ένωση ακετοΐνη παίζει καθοριστικό ρόλο στην επαγωγή της ανθεκτικότητας των φυτών στην αλατότητα (Cappellari & Banchio, 2019). Ανάλογα αποτελέσματα παρατηρήθηκαν από τους Vaishnav και συνεργάτες, όπου η παραγωγή ενός μίγματος οργανικών πτητικών ενώσεων του βακτηρίου *Pseudomonas simiae* AU, ενεργοποίησε την αντοχή των φυτών *Glycine max* στην αλατότητα (100 mM NaCl), ενώ βελτίωσε παράλληλα το φωτοσυνθετικό ρυθμό και τη συγκέντρωσή τους σε χλωροφύλλη, τόσο σε *in vitro* συνθήκες όσο και κατά την εφαρμογή τους στο έδαφος (Vaishnav et al., 2015).

Σύμφωνα με τα *in vitro* βιοχημικά τεστ και την *in silico* ανάλυση των Cal.l.30, Cal.f.4 και X, όλα τα στελέχη (Cal.f.4, Cal.l.30, Cal.r.29 και X) βρέθηκαν θετικά στην παραγωγή IAA, ενεργών πτητικών οργανικών ενώσεων *in vitro* και το σχηματισμό βιοϋμενίου. Επομένως, η

αυτοπροστασία των βακτηρίων σε συνδυασμό με την ενεργοποίηση των προαναφερθέντων μηχανισμών, πιθανά συνέβαλαν στην επαγωγή της αντοχής των φυτών *A. thaliana* στις υψηλές συγκεντρώσεις αλατιού. Αξίζει να αναφερθεί ότι οι EPS, που παράγονται κατά το σχηματισμό του βιοϋμενίου, προστατεύουν τα κύτταρα από την αφυδάτωση, ιδιαίτερα όταν εκτίθενται σε ακραίες συνθήκες αλατότητας, ενώ βοηθούν ταυτόχρονα την κινητικότητα των βακτηρίων και τον αποικισμό τους στους φυτικούς ιστούς (Liu et al., 2017; Qin et al., 2016; Ruppel et al., 2013). Το 40- 95 % του βάρους της κυτταρικής μεμβράνης των βακτηρίων αποτελείται από εξωκυτταρικούς πολυσακχαρίτες (EPS), οι οποίοι αποτελούνται κυρίως από νερό (~97 %). Ταυτόχρονα, οι εξωπολυσακχαρίτες ενισχύουν το σχηματισμό εδαφικών συσσωματωμάτων και βελτιώνουν την προσκολλητική τους ικανότητα στη ρίζα, σχηματίζοντας ένα προστατευτικό περίβλημα γύρω από το ριζικό σύστημα των φυτών, το οποίο αυξάνει τη διαθεσιμότητα του νερού και την απορρόφηση των θρεπτικών συστατικών (N, P, K και Fe), ενώ ρυθμίζει και την ανταλλαγή κατιόντων (Ashraf et al., 2004; Etesami & Beattie, 2018; Gupta et al., 2015). Όπως παρατηρήθηκε και στην παρούσα μελέτη, τα βακτήρια παρ' όλο που εφαρμόστηκαν από απόσταση στα φυτά *A. thaliana*, κινήθηκαν και κάλυψαν σε μεγάλο βαθμό τις ρίζες των φυτών, ενισχύοντας έτσι την προστασία τους από την αβιοτική καταπόνηση. Σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία, ένας μεγάλος αριθμός βακτηρίων κατά την εφαρμογή τους σε υποστρώματα με αυξημένη συγκέντρωση σε αλατότητα, προστατεύουν τα φυτά από την καταπόνηση και ευνοούν την ανάπτυξή τους, με την παραγωγή EPS και το σχηματισμό βιοϋμενίου γύρω από τη ρίζα (Ashraf et al., 2004; Kasim et al., 2016; Mahmood et al., 2016; Sun et al., 2020; Wang et al., 2019a; Xiong et al., 2020; Yang et al., 2016).

Ένα από τα σημαντικότερα στάδια του κύκλου ζωής των φυτών που καθορίζουν την παραγωγή και τελικά την απόδοση μιας καλλιέργειας, είναι η βλαστικότητα των σπόρων και η ανάπτυξη των φυταρίων (Gelmond, 1978). Ένας από τους πιο αποτελεσματικούς τρόπους εφαρμογής των βακτηρίων είναι η βιο-κάλυψη των σπόρων (seed bio-priming). Στην παρούσα μελέτη, από την *in vitro* εφαρμογή των ενδοφυτικών βακτηρίων και του ριζοσφαιρικού στελέχους X σε σπόρους τομάτας (*Solanum lycopersicum* var. Chondrokatsari Messinias), παρατηρήθηκε πρόωμη βλαστικότητα και αύξηση του συνολικού ποσοστού βλαστικότητας των σπόρων. Συγκεκριμένα, το βακτήριο *B. halotolerans* Cal.1.30 ξεχώρισε από τα υπόλοιπα στελέχη εμφανίζοντας το υψηλότερο ποσοστό βλαστικότητας. Η εφαρμογή των PGPB με βιο-κάλυψη (bio-priming) των σπόρων, ενεργοποιεί τις μεταβολικές διεργασίες βλαστικότητας, χωρίς να επάγεται η έκπτυξη της ρίζας πριν από τη σπορά, όπως συμβαίνει

και με τη μέθοδο priming (Ashraf & Foolad, 2005). Επομένως, τα PGPB που προσκολλώνται στους σπόρους με το σχηματισμό ισχυρού βιοϋμενίου, ενυδατώνουν κατάλληλα τους σπόρους συγχρονίζοντας έτσι τη βλαστικότητα τους. Παράλληλα, επάγουν την ανάπτυξη και προστασία των φυτών όταν εκτίθενται σε υποστρώματα με βιοτικές και αβιοτικές καταπονήσεις, μέσω του πλήθους των PGP μηχανισμών τους, όπως η παραγωγή φυτοορμονών (IAA), η αφομοίωση θρεπτικών συστατικών, η παραγωγή αντιμικροβιακών ενώσεων κ.α. (Brahim et al., 2019; Roslan et al., 2020; Sharma et al., 2003; Singh et al., 2020; Taylor & Harman, 1990).

Στην παρούσα μελέτη, οι περισσότερες από τις εφαρμογές των βακτηρίων βελτίωσαν σημαντικά τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των σπορόφυτων τομάτας, όπως είναι το ολικό νωπό βάρος, το μήκος του βλαστού και ο αριθμός των πλευρικών ριζών σε *in vitro* συνθήκες. Τα στελέχη των ενδοφυτικών βακτηρίων *B. velezensis* Cal.r.29, *B. halotolerans* Cal.l.30, *B. halotolerans* Cal.f.4, *B. halotolerans* Cal.l.11, *B. halotolerans* Cal.f.2.1, *B. megaterium* Cal.r.33 και *B. proteolyticus* Cal.f.5, ξεχώρισαν για την επίδρασή τους στα σπορόφυτα τομάτας, τα οποία εμφάνισαν τις υψηλότερες τιμές ολικού νωπού βάρους, μήκος βλαστού, καθώς και συνολικού αριθμού πλευρικών ριζών. Ανάλογα αποτελέσματα έχουν βρεθεί από ένα πλήθος πειραμάτων που έχουν πραγματοποιηθεί σε εργαστηριακές συνθήκες ανάπτυξης (Rozier et al., 2019; Bhatt et al., 2015). Συγκεκριμένα, οι Moeinzadeh και συνεργάτες, ανέδειξαν το ρόλο των βακτηρίων *Ps. fluorescens* UTPf76 και *Ps. fluorescens* UTPf86 στα αυξημένα ποσοστά βλαστικότητας των σπόρων του φυτού *Helianthus annuus* L., καθώς και την επίδρασή τους στα αναπτυξιακά χαρακτηριστικά των φυταρίων, όπως το μήκος της ρίζας, το ύψος του βλαστού, το νωπό και ξηρό βάρος των σπορόφυτων καθώς και τον αριθμό των πλευρικών ριζών (Moeinzadeh et al., 2010). Επιπλέον, σύμφωνα με Forti και συνεργάτες τους η εφαρμογή βακτηρίων του γένους *Bacillus* spp. σε σπόρους *Medicago truncatula*, βελτίωσε την ανάπτυξη των φυταρίων παρουσιάζοντας αυξημένη βιομάζα (Forti et al., 2020).

Αξιοσημείωτη είναι η επίδραση του ριζοσφαιρικού βακτηρίου X στην ανάπτυξη των σπορόφυτων τομάτας, η οποία παρουσιάζει σπορόφυτα τομάτας με ιδιαίτερα μικρό μήκος κεντρικής ρίζας, σε σύγκριση με τα φυτά μάρτυρες. Ωστόσο, παρά το μειωμένο μήκος κεντρικής ρίζας, παρουσίασε φυτά με σημαντικά αυξημένο ύψος βλαστού και μεγάλο αριθμό πλευρικών ριζών. Ο φαινότυπος αυτός πιθανά οφείλεται στη μεγάλη συγκέντρωση των βακτηρίων ($\sim 5 \times 10^5$ cfu/ σπορόφυτο) που κατάφεραν να αποικίσουν τα σπορόφυτα τομάτας *in vitro*, σε σύγκριση με τα υπόλοιπα στελέχη τα οποία κυμάνθηκαν σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις (10^3 - 10^4 cfu/ σπορόφυτο) (Persello-Cartieaux et al., 2001).

Η εφαρμογή των βακτηρίων με bio-priming παρέχει τις κατάλληλες συνθήκες προκειμένου τα βακτήρια να αποικίσουν την επιφάνεια των σπόρων (McQuilken et al., 1998). Τα PGPB αναπτύσσουν μια αμφίδρομη ωφέλιμη σχέση με τα φυτά που αποικίζουν, από τα οποία απορροφούν τις απαραίτητες οργανικές ενώσεις από τα εκκρίματα της ρίζας, ενώ αυξάνουν τη βιομάζα τους και τη λειτουργική τους δράση στην περιοχή της ριζόσφαιρας (Al-Ali et al., 2018; Ortíz-Castro et al., 2009; Yuan et al., 2015). Επομένως, τα βακτήρια που έχουν αποικίσει τους σπόρους των φυτών, μετά από την έκπτυξη της ρίζας κινούνται επιφανειακά σε αυτή μέχρι τον εκ νέου αποικισμό της, είτε ως μεμονωμένα κύτταρα και συστάδες κυττάρων, είτε όντας οργανωμένα σε βιοϋμένια.

Στη παρούσα μελέτη όλα τα παραπάνω στελέχη βρέθηκαν θετικά στην παραγωγή επιφανειοδραστικών ενώσεων, την πραγματοποίηση ομαδικής κινητικότητας καθώς και τον σχηματισμό βιοϋμενίου *in vitro*. Συγκεκριμένα, μετά από τη μεταβολομική και *in silico* ανάλυση των βακτηρίων *B. velezensis* Cal.r.29, *B. halotolerans* Cal.l.30 και *B. halotolerans* Cal.f.4, βρέθηκε ότι παράγουν τα λιποπεπτίδια iturin, fengycin και surfactin, ενώ το βακτήριο *P. carnis* X το κυκλικό λιποπεπτίδιο viscosinamide. Τα κυκλικά λιποπεπτίδια αποτελούν ισχυρές επιφανειοδραστικές ενώσεις, που μειώνουν την διεπιφανειακή τάση και συμβάλλουν άμεσα στην κίνηση των βακτηρίων και τον επιτυχημένο αποικισμό τους στις επιφάνειες των φυτών (Bais et al., 2004; De Bruijn et al., 2008; Dietel et al., 2013; Wang et al., 2019a). Συγκεκριμένα για τα βακτήρια του γένους *Bacillus* τον κυρίαρχο ρόλο μετά το χημειοτακτισμό τους, για την κίνηση, το σχηματισμό βιοϋμενίου και τον επιτυχημένο αποικισμό τους στις ρίζες των φυτάρων τομάτας, έχει το κυκλικό λιποπεπτίδιο surfactin, (Al-Ali et al., 2018; Gao et al., 2016). Επομένως, το παραγόμενο λιποπεπτίδιο surfactin πιθανά καθόρισε τον επιτυχημένο αποικισμό των στελεχών Cal.l.30, Cal.f.4, Cal.r.29 στις ρίζες των σπορόφυτων τομάτας. Αντίστοιχα, ο ρόλος του παραγόμενου κυκλικού λιποπεπτιδίου viscosinamide, καθορίζει τον ισχυρό αποικισμό του βακτηρίου *P. carnis* X, όπως έχει παρατηρηθεί από τους Thrane και συνεργάτες για το βακτήριο *Ps. fluorescens* DR54 στη ριζόσφαιρα των ζαχαρότευτλων (Thrane et al., 2000).

Ο επιτυχημένος αποικισμός των στελεχών Cal.l.30, Cal.f.4, Cal.r.29 και X, επιβεβαιώθηκε μετά από κατάλληλη μικροσκοπική παρατήρηση που πραγματοποιήθηκε στις ρίζες των φυτών *A. thaliana* Col-0 και των σπορόφυτων *Solanum lycopersicum* *in vitro*. Επιπλέον, με τη βοήθεια του τεχνητά φθορίζοντος βακτηριακού στελέχους X (X::gfp), παρατηρήσαμε ότι τα βακτήρια αποικίζουν όλη την έκταση της ρίζας των φυτών *A. thaliana* Col-0, είτε ως μεμονωμένα κύτταρα, είτε ως συστάδες κυττάρων.

Οι πιο αποτελεσματικές μέθοδοι εφαρμογής των ωφέλιμων βακτηρίων είναι η βιο- κάλυψη των σπόρων, η διαφυλλική εφαρμογή, καθώς και η απευθείας εφαρμογή των βακτηρίων στο έδαφος (Mahmood et al., 2016). Είναι σαφές ότι ο πληθυσμός των βακτηρίων που καταλήγει στο έδαφος μετά από την εφαρμογή τους με bio-priming, εξαρτάται από τον αρχικό πληθυσμό βακτηρίων που έχει καλύψει το σπόρο, ενώ η αποτελεσματικότητα του εμβολίου στο έδαφος εξαρτάται από τις συνθήκες του εδάφους που επικρατούν (Milus & Rothrock, 1993). Η επιβίωσή και ο αποικισμός των βακτηρίων στο έδαφος εξαρτάται από ένα πλήθος βιοτικών και αβιοτικών παραγόντων όπως είναι το pH, η θερμοκρασία, η υγρασία, τα θρεπτικά στοιχεία και η σύσταση του εδάφους, καθώς και το σύνολο των ανταγωνιστικών μικροβίων που συναντούν (Mahmood et al., 2016).

Στην παρούσα μελέτη τα επιλεγμένα βακτήρια *B. halotolerans* Cal.l.30, *B. velezensis* Cal.r.29, *B. halotolerans* Cal.f.4 και *P. carnis* X που εμβολιάστηκαν ταυτόχρονα με τη μέθοδο bio-priming όσο και με ριζοπότισμα, αποίκισαν αποτελεσματικά τα φυτά στην περιοχή της ριζόσφαιρας και επηρέασαν σημαντικά την ανάπτυξη των φυτών *Solanum lycopersicum* var. Chondrokatsari Messinias σε συνθήκες θερμοκηπίου. Σύμφωνα με τους Tan και συνεργάτες, ο ταυτόχρονος εμβολιασμός των βακτηρίων με εμβάπτιση των σπορόφυτων και με ριζοπότισμα στη γλάστρα του κάθε φυτού, παρουσιάζει καλύτερα αποτελέσματα στην ανάπτυξη των φυτών τομάτας, σε σύγκριση με τον εμβολιασμό των βακτηρίων με μία από τις δύο εφαρμογές (Tan et al., 2013).

Το βακτήριο *B. halotolerans* Cal.l.30 ξεχωρίζει μεταξύ των υπόλοιπων βακτηρίων, εμφανίζοντας τις υψηλότερες τιμές νωπού και ξηρού βάρους βλαστού και ρίζας, καθώς και το μεγαλύτερο ύψος βλαστού. Μάλιστα, ανάλογα είναι τα αποτελέσματα και κατά την *in vitro* ανάπτυξη των φυταρίων τομάτας μετά εφαρμογή του Cal.l.30 με bio-priming στους σπόρους του φυτού, με αποτέλεσμα η *in vitro* εφαρμογή να συνάδει με τα αποτελέσματα της εφαρμογής του στο θερμοκήπιο. Ακολουθούν τα βακτήρια *B. halotolerans* Cal.f.4 και *P. carnis* X, παρουσιάζοντας τις αμέσως επόμενες υψηλότερες τιμές νωπού και ξηρού βάρους βλαστού, χωρίς να επιδρούν σημαντικά στο ύψος του βλαστού. Τέλος, το βακτήριο *B. velezensis* Cal.r.29, δεν επηρέασε σημαντικά το σύνολο των μορφολογικών χαρακτηριστικών των φυτών, εκτός από το μήκος του βλαστού το οποίο μειώθηκε σημαντικά σε σχέση με όλες τις μεταχειρίσεις, ακόμη και τα φυτά μάρτυρες.

Η εφαρμογή των PGPB μπορούν να επάγουν την ανάπτυξη των φυτών μέσω του πλήθους των άμεσων και έμμεσων μηχανισμών δράσης τους, όπως είναι η παραγωγή φυτοορμονών

(IAA, CK), η διαλυτοποίηση του φωσφόρου, η δέσμευση του σιδήρου, η απορρόφηση θρεπτικών στοιχείων, η προστασία από αβιοτικές καταπονήσεις ή η καταστολή φυτοπαθογόνων οργανισμών. Η εφαρμογή των βακτηρίων σε φυτά που αναπτύσσονται σε συνθήκες θερμοκηπίου ή τον αγρό, δυσκολεύει την κατανόηση των PGP μηχανισμών που ενεργοποιούνται, εξαιτίας των πολυπαραγοντικών συνθηκών ανάπτυξης του. Σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία η εφαρμογή των PGPB που φέρουν ένα ευρύ φάσμα μηχανισμών δράσης, επηρεάζουν σημαντικά τα αναπτυξιακά χαρακτηριστικά και την παραγωγή των φυτών σε συνθήκες θερμοκηπίου (Ruzzi & Aroca 2015).

Η εφαρμογή ενός μεγάλου αριθμού βακτηρίων που ανήκουν στα είδη *Pseudomonas putida*, *P. fluorescens*, *Serratia marcescens*, *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis* και *Bacillus cereus* σε σπορόφυτα τομάτας σε συνθήκες θερμοκηπίου, παρουσίασε φυτά με αυξημένο ξηρό βάρος και ύψος βλαστού και υψηλό αριθμό καρπών ανά φυτό (Almaghrabi et al., 2013). Ανάλογα αποτελέσματα παρατήρησαν και οι Heidarzadeh και Baghaee-Ravari, με την εφαρμογή των βακτηρίων *Bacillus pumilus* ToIrMA και *B. pumilus* ToIrFT σε φυτά *Solanum lycopersicum*. Συγκεκριμένα, η εφαρμογή των βακτηρίων σε γλάστρες με φυτά τομάτας αύξησε σημαντικά το μήκος των βλαστών και των ριζών, όσο και τη ξηρή μάζα των φυτών, με την παραγωγή του IAA από τα ωφέλιμα βακτήρια να σχετίζεται άμεσα με ανάπτυξη του βλαστού (Heidarzadeh & Baghaee-Ravari, 2015). Σύμφωνα με τους Akram και τους συνεργάτες, από την εφαρμογή των βακτηρίων *Bacillus fortis* IAGS162 και *B. subtilis* IAGS174 σε φυτά *Solanum lycopersicum* σε συνθήκες θερμοκηπίου, παρατήρησαν τη σημαντική αύξηση του ύψους του βλαστού, του μήκους της ρίζας και της συνολικής βιομάζας, ενώ παράλληλα διαπίστωσαν σημαντική αύξηση της συγκέντρωσης σε χλωροφύλλη, καροτενοειδή και σάκχαρα (Akram et al., 2015).

4.2 Ανταγωνιστική δράση των ενδοφυτικών βακτηρίων του φυτού *Calendula officinalis* και του ριζοσφαιρικού βακτηρίου X του *Phaseolus vulgaris*

4.2.1 Εφαρμογή των ανταγωνιστικών βακτηρίων *in vitro*

Η υπερβολική χρήση χημικών φυτοπροστατευτικών σκευασμάτων έχει επιφέρει σημαντικές επιπτώσεις στο περιβάλλον ενώ παράλληλα έχει αυξήσει την ανθεκτικότητα των φυτοπαθογόνων μυκήτων στη δραστηριότητά τους, ενισχύοντας την ανάγκη για χρήση εναλλακτικών και παράλληλα αποτελεσματικών μεθόδων φυτοπροστασίας. Η εφαρμογή μικροοργανισμών και συγκεκριμένα βακτηρίων έχει αυξηθεί ιδιαίτερα τα τελευταία χρόνια, καθιστώντας αναγκαία την εύρεση ισχυρών και αποτελεσματικών BCAs. Τα ενδοφυτικά

βακτήρια φαρμακευτικών φυτών αποτελούν σημαντική πηγή υποψήφιων BCAs, εξαιτίας του πλήθους των ανταγωνιστικών μηχανισμών που έχουν αναπτύξει προκειμένου να επιβιώνουν ενδοφυτικά. Η ανταγωνιστική δράση επιλεγμένων ενδοφυτικών βακτηρίων του φυτού *Calendula officinalis* και του ριζοσφαιρικού βακτηρίου *P. carnis* X, εξετάστηκε εναντίον των φυτοπαθογόνων μυκήτων *B. cinerea*, *C. acutatum*, *R. solani* και *F. oxysporum* fsp. *lycopersici*, σε *in vitro*, *in vivo* ή/και *in planta* εφαρμογές.

Η μέθοδος της ταυτόχρονης διπλής καλλιέργειας *in vitro* (dual culture assay) αποτελεί την πιο συχνή, μαζική μέθοδο επιλογής ισχυρών BCAs (Raymaekers et al., 2020). Με αυτόν τον τύπο επιλογής, μεγάλος αριθμός υποψήφιων BCAs ανιχνεύονται άμεσα και γρήγορα για την καταστολή περισσότερων του ενός φυτοπαθογόνων μικροοργανισμών με την παραγωγή αντιμικροβιακών ενώσεων, παρουσιάζοντας σημαντικό πλεονέκτημα έναντι των μεθόδων επιλογής που εφαρμόζονται σε φυτά (Caulier et al., 2018; Chen et al., 2013; Nam et al., 2016; Pliego et al., 2011; Ramesh & Phadke, 2012).

Στην παρούσα μελέτη, τα 13 επιλεγμένα ενδοφυτικά βακτήρια εξετάστηκαν αρχικά εναντίον των φυτοπαθογόνων μυκήτων *R. solani* και *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* (FOL), σε στερεό και ημιστερεό υπόστρωμα *in vitro*. Από αυτόν τον τύπο επιλογής, την πιο ισχυρή ανταγωνιστικότητα παρουσίασαν τα βακτήρια της ομάδας A, τα οποία ανήκουν στο γένος *Bacillus* και συγκεκριμένα στα είδη *B. halotolerans* (Cal.l.30, Cal.l.11, Cal.f.4, Cal.f.2.1, Cal.r.11, Cal.l.21), *B. velezensis* (Cal.r.29) και *B. subtilis* (Cal.r.19). Τα ενδοφυτικά βακτήρια των ειδών *B. halotolerans*, *B. velezensis* και *B. subtilis*, καθώς και το ριζοσφαιρικό βακτήριο *P. carnis* X, παρουσιάζουν έντονη ομαδική κινητικότητα, ενώ ταυτόχρονα αποτελούν και τα πιο ισχυρά ανταγωνιστικά στελέχη *in vitro*. Η αναχαίτιση των φυτοπαθογόνων μυκήτων είχε ως αποτέλεσμα τη δημιουργία ισχυρής ζώνης παρεμπόδισης σε στερεό μέσο ανάπτυξης, καθώς και την πλήρη κάλυψη και καταστροφή των υφών του παθογόνου μύκητα σε ημιστερεό μέσο ανάπτυξης. Τα βακτήρια των γενών *Bacillus* και *Pseudomonas* ξεχωρίζουν για την *in vitro* ανταγωνιστικότητά τους, εξαιτίας των ισχυρών αντιμικροβιακών ενώσεων που παράγουν και του πλήθους των μηχανισμών δράσης τους, αναδεικνύοντας μάλιστα το ρόλο των λιποπεπτιδίων ως τον πιο καθοριστικό (Caulier et al., 2019; Raaijmakers et al., 2010; Raymaekers et al., 2020; Venieraki et al., 2016).

Η ζώνη παρεμπόδισης που δημιουργείται κατά την *in vitro* αλληλεπίδραση των μικροοργανισμών αποτελείται από τις συσσωρευμένες αντιμικροβιακές ενώσεις, κατά κύριο λόγο λιποπεπτίδια, που εκκρίνονται από τα ανταγωνιστικά βακτήρια και είναι υπεύθυνες για

την αναχαίτιση των φυτοπαθογόνων μυκήτων (Raaijmakers et.al., 2010; Torres et al., 2016). Τα λιποπεπτίδια λειτουργούν παράλληλα και ως ισχυρές επιφανειοδραστικές ενώσεις, οι οποίες προηγούνται των βακτηρίων, μειώνουν την επιφανειακή τάση του υποστρώματος και βοηθούν την κίνηση των βακτηρίων σε επιφάνειες και ιστούς (Kearns, 2010; Raaijmakers et.al., 2010). Τα βακτήρια του γένους *Bacillus* και ιδιαίτερα τα είδη *B. amyloliquefaciens*, *B. velezensis*, *B. subtilis*, *B. mojavensis* και *B. halotolerans* ξεχωρίζουν με την παραγωγή των ισχυρών κυκλικών λιποπεπτιδίων των οικογενειών iturin, surfactin και fengycin (Ambrico & Trupo, 2017; Caulier et al., 2018; Nam et al., 2016). Η PCR ανάλυση ενίσχυσε αυτήν την υπόθεση για τα στελέχη Cal.l.30, Cal.f.4, Cal.r.29, Cal.l.11, Cal.f.2.1, Cal.r.19 και Cal.r.11, τα οποία φέρουν γονίδια για την παραγωγή τουλάχιστον ενός κυκλικού λιποπεπτιδίου. Ωστόσο, η έκκριση των επιφανειοδραστικών ενώσεων πραγματοποιείται όχι μόνο σε στερεό και ημιστερεό υπόστρωμα, αλλά και σε υγρό μέσο ανάπτυξης, διατηρώντας την ισχυρή αντιμικροβιακή τους δράση (Torres et al., 2016). Όπως ήταν αναμενόμενο, μόνο τα ανταγωνιστικά βακτήρια της ομάδας A εκκρίνουν στο υπερκείμενο της υγρής καλλιέργειάς τους ισχυρές επιφανειοδραστικές ενώσεις με ισχυρή βιοδραστικότητα.

Μέσα από πολλές διαφορετικές εφαρμογές, συμπεριλαμβανομένης της μικροσκοπικής παρατήρησης, διαπιστώθηκε η άμεση επίδραση του στελέχους X εναντίον του φυτοπαθογόνου μύκητα *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*. Συγκεκριμένα, είναι εμφανής η άμεση μείωση της βλαστικότητας των σπορίων του, η εξωτερική κάλυψη των υφών του μύκητα από κινούμενα και ακινητοποιημένα κύτταρα (σχηματισμός βιοϋμενίου), η προσκόλληση του βακτηρίου κατά μήκος των υφών, είτε ως μεμονωμένα κύτταρα, είτε ως αλυσίδα κυττάρων, καθώς και η εισβολή του βακτηρίου εντός των υφών, με πλήρη καταστροφή των κάθετων διαφραγμάτων και του κυτταρικού περιεχομένου. Η αποτύπωση της παλινδρομικής κίνησης των βακτηρίων εντός της καταστραμμένης υφής του μύκητα *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*, δηλώνει έμπρακτα την ισχυρή λυτική δράση του βακτηρίου.

Όπως διαπιστώθηκε και μικροσκοπικά, οι παραγόμενες και διαχεόμενες αντιμικροβιακές ενώσεις τόσο των ενδοφυτικών βακτηρίων *B. velezensis* Cal.r.29, *B. halotolerans* Cal.l.30, *B. halotolerans* Cal.l.11, *B. halotolerans* Cal.f.4 και *B. subtilis* Cal.r.19, όσο και του ριζοσφαιρικού βακτηρίου X, επέδρασαν άμεσα στη μορφολογία των υφών του *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*. Συγκεκριμένα παρατηρήθηκε ο σχηματισμός έντονα καρουλιασμένων και διογκωμένων υφών, η εμφάνιση πρώιμων διακλαδώσεων, ο σχηματισμός κενотоπιών/κυστιδίων, η συρρίκνωση των απολήξεων των υφών, καθώς και η εμφάνιση αυξημένου αριθμού κάθετων διαφραγμάτων κατά το μήκος των υφών.

Είναι πιθανό, η παραγωγή των κυτταρολυτικών ενζύμων των βακτηρίων, όπως χιτινάσες, κυτταρινάσες και πρωτεάσες και παράλληλα οι ισχυρές αντιβιοτικές ενώσεις να επιδρούν άμεσα στη βλαστικότητα, τη ζωτικότητα και τη μορφολογία του μυκηλίου των φυτοπαθογόνων μυκήτων. Τα λυτικά ένζυμα διατρύπουν και τροποποιούν τη δομή του κυτταρικού τοιχώματος, αναστέλλουν τη βλαστικότητα και την επιμήκυνση των σπορίων, προκαλούν μερική διόγκωση των υφών και του άκρου των υφών, οδηγώντας στη συστροφή και τελικά τη διάλυσή τους (Akocak et al., 2015; Compant et al., 2005; Kim et al., 2003; Kim et al., 2008; Yen et al., 2006). Επιπλέον, τα παραγόμενα ισχυρά λιποπεπτίδια iturin, fengycin, surfactin και viscosinamide, επιδρούν επίσης στη φυσιολογία και μορφολογία των φυτοπαθογόνων μυκήτων με το σχηματισμό πόρων στην κυτταρική μεμβράνη, την δημιουργία διογκωμένων, τραυματισμένων και παραμορφωμένων υφών, την αύξηση των διακλαδώσεων των υφών και τη διάτρηση των σπορίων με αποτέλεσμα τη μείωσης της βλαστικότητάς τους (Carrillo et al., 2003; Deleu et al., 2008; Fukuda et al., 2021; Lin et al., 2010; Maget-Dana & Ptak, 1995; Raaijmakers et al., 2010; Wang et al., 2019b).

Σύμφωνα με όσα προαναφέρθηκαν, γίνεται κατανοητό ότι τα βακτήρια παρουσιάζουν ένα σύνολο ισχυρών ανταγωνιστικών μηχανισμών, οι οποίοι είναι εξειδικευμένοι για κάθε παθογόνο μικροοργανισμό και οι οποίοι μπορούν να λειτουργήσουν είτε ανεξάρτητα, είτε σε συνδυασμό για την καλύτερη αντιμετώπισή του.

4.2.2 Εφαρμογή των ανταγωνιστικών βακτηρίων *in vitro* και *in vivo*

Η εφαρμογή των βακτηρίων σε φυτικούς ιστούς με σκοπό την προστασία τους από παθογόνους μικροοργανισμούς, αποτελεί μία σημαντική μέθοδο επιλογής ανταγωνιστικών BCAs. Ο *in vivo* βιολογικός έλεγχος τοποθετεί τα υποψήφια BCAs και τους φυτοπαθογόνους μικροοργανισμούς σε πιο φυσικές περιβαλλοντικές συνθήκες, εξετάζει την αποτελεσματικότητα των βακτηρίων στο εκάστοτε φυτό- ξενιστή, ενώ μπορεί να αποτελέσει εναλλακτικό μηχανισμό αντιμετώπισης των μετασυλλεκτικών ασθενειών που προκαλούνται σε φρούτα/καρπούς και λαχανικά (Köhl et al., 2011; Lastochkina et al., 2019). Σημαντικός αριθμός βιβλιογραφικών αναφορών έχει επιλέξει τα πιο ανταγωνιστικά BCAs με την εφαρμογή τους σε αποκομμένους φυτικούς ιστούς, είτε ως αρχική μέθοδο επιλογής, είτε μετά τον έλεγχο της ανταγωνιστικότητάς τους με τη μέθοδο dual culture assay (Comby et al., 2017; Köhl et al., 2020; Perez et al., 2017; Zhang et al., 2017).

Ο φυτοπαθογόνος μύκητας *B. cinerea* αποτελεί ένα ισχυρό νεκροτροφικό παθογόνο στέλεχος, που μπορεί να προσβάλλει μεγάλο αριθμό φρούτων και καρπών, όπως φράουλα,

τομάτα, σταφύλι, ακτινίδιο, αγγούρι, μήλα ροδάκινα κτλ (Droby & Lichter, 2007). Στην παρούσα μελέτη όλα τα ανταγωνιστικά ενδοφυτικά στελέχη Cal.l.30, Cal.l.11, Cal.f.4, Cal.r.11, Cal.f.2.1, Cal.r.29, Cal.r.19 και το ριζοσφαιρικό βακτήριο X, αναχαίτισαν αποτελεσματικά το φυτοπαθογόνου μύκητα *B. cinerea*, τόσο σε *in vitro* συνθήκες (dual culture assay), όσο και σε καρπούς τομάτας *in vivo* (detached fruit assay). Ανάλογα αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και από τη μετασυλλεκτική εφαρμογή των επιλεγμένων στελεχών Cal.l.30, Cal.f.4, Cal.r.29 και X εναντίον του φυτοπαθογόνου μύκητα *B. cinerea* σε καρπούς σταφυλιού, καθώς και εναντίον του *C. acutatum* σε καρπούς ελιάς. Όλες οι εφαρμογές των βακτηρίων μείωσαν σημαντικά το δείκτη σοβαρότητας της κάθε ασθένειας καθώς και το συνολικό ποσοστό μολυσμένων καρπών, σε σύγκριση με το μάρτυρα.

Το βακτήριο *B. velezensis* Cal.r.29 ξεχωρίζει μεταξύ των άλλων εφαρμογών για την ανταγωνιστικότητά του, παρουσιάζοντας το υψηλότερο ποσοστό παρεμπόδισης των φυτοπαθογόνων μυκήτων *B. cinerea* και *C. acutatum* *in vitro*, ενώ μείωσε σημαντικά το συνολικό ποσοστό μολυσμένων καρπών (τομάτας, σταφυλιού και ελιάς), καθώς και το δείκτη σοβαρότητας της κάθε ασθένειας. Τα βακτήρια του είδους *B. velezensis* κατατάσσονται μεταξύ των πιο ανταγωνιστικών BCAs για την αποτελεσματική αντιμετώπιση σημαντικού αριθμού φυτοπαθογόνων μυκήτων *in vitro*, *in vivo* και *in planta*, εξαιτίας των ισχυρών αντιμικροβιακών ενώσεων που παράγουν (Lastochkina et al., 2019).

Απαραίτητο βήμα για την επιτυχημένη βιολογική αντιμετώπιση των φυτοπαθογόνων μικροοργανισμών, αποτελεί ο αποικισμός και η ανάπτυξη των υποψήφιων βακτηριακών BCAs στο σημείο εμβολιασμού τους και ο αποτελεσματικός ανταγωνισμός τους για θρεπτικά στοιχεία αλλά και χώρο (Köhl et al., 2019; Yu & Lee, 2015; Zhang et al., 2017). Όλα τα ενδοφυτικά στελέχη που εφαρμόστηκαν (Cal.l.30, Cal.f.4, Cal.l.11, Cal.r.11, Cal.f.2.1, Cal.r.19 και Cal.r.29), καθώς και το βακτήριο X, με αρχική συγκέντρωση εμβολιασμού $\sim 10^8$ cfu/ ml, αποίκισαν αποτελεσματικά τους καρπούς τομάτας, σταφυλιού και ελιάς. Η αυξημένη συγκέντρωση των εμβολιαζόμενων βακτηρίων καθόρισε τον επιτυχημένο αποικισμό των βακτηρίων στους μελετώμενους καρπούς (El Ghaouth et al., 2004).

Η βλαστικότητα και η ανάπτυξη των φυτοπαθογόνων μυκήτων εξαρτάται άμεσα από την απορρόφηση θρεπτικών στοιχείων στο σημείο της μόλυνσής τους, με τις πληγές των καρπών να αποτελούν βασική πηγή διαθέσιμων θρεπτικών συστατικών για τους φυτοπαθογόνους μύκητες *B. cinerea* και *C. acutatum*. Ο αποικισμός των βακτηρίων, μπορεί να περιορίσει την

πρόσβαση των φυτοπαθογόνων μυκήτων σε βασικά θρεπτικά στοιχεία όπως είναι τα N, P, Fe, είτε να τους ανταγωνιστεί με τη δέσμευσή τους.

Τα ανταγωνιστικά ενδοφυτικά στελέχη καθώς και το στέλεχος X που εφαρμόστηκαν στους καρπούς, έχουν την ικανότητα βιοσύνθεσης και έκκρισης σιδηροφόρων ενώσεων *in vitro*. Η μεταβολομική ανάλυση των στελεχών Cal.l.30 και Cal.r.29 αναγνώρισε την παραγωγή της σιδηροφόρου ένωσης bacillibactin ($C_{39}H_{42}N_6O_{18}$) και από τα δύο στελέχη. Η *in silico* ανάλυση του γονιδιώματος των στελεχών Cal.l.30, Cal.f.4, Cal.l.11 και X ενίσχυσε τα παραπάνω αποτελέσματα και ανέδειξε τη γονιδιακή κασέτα για βιοσύνθεση του σιδηροφόρου bacillibactin, για τα βακτήρια του γένους *Bacillus* και της pyoverdine για το στέλεχος X.

Ο σίδηρος αποτελεί ένα από τα βασικά συστατικά για το σχηματισμό του βιοϋμενίου των βακτηρίων καθώς σταθεροποιεί τη μήτρα των πολυσακχαριτών που εμπλέκονται στο σχηματισμό του (Weinberg, 2004). Επομένως η δέσμευση του διαθέσιμου σιδήρου αυξάνει σημαντικά το σχηματισμό βιοϋμενίου και κατ' επέκταση τον αποικισμό των βακτηρίων στο σημείο του εμβολιασμού τους. Η δέσμευση του διαθέσιμου σιδήρου πραγματοποιείται με την παραγωγή των βακτηριακών σιδηροφόρων ενώσεων, η οποία μειώνει σημαντικά τη διαθεσιμότητα του σιδήρου για τους φυτοπαθογόνους μύκητες, στοιχείο απαραίτητο για τη βλαστικότητα των σπορίων, την ανάπτυξη και τελικά τη μολυσματικότητά τους (de los Santos-Villalobos et al., 2012; Kannoja et al., 2019; Yu et al., 2011). Έτσι, η παραγωγή των βακτηριακών σιδηροφόρων ενώσεων λειτουργεί ως έμμεσος μηχανισμός αντιμετώπισης του εκάστοτε φυτοπαθογόνου μύκητα, όπου σε συνάρτηση με το σύνολο των παραγόμενων αντιμικροβιακών ενώσεων, τα βακτήρια ισχυροποιούν την ανταγωνιστικότητά τους (Santhanam et al., 2019).

Προκειμένου τα ενδοφυτικά βακτήρια να αποικίσουν αποτελεσματικά τους καρπούς καλούνται να ανταγωνισθούν επιτυχώς την υπάρχουσα μικροβιακή κοινότητα τόσο με τον ανταγωνισμό τους για θρεπτικά στοιχεία και χώρο και τον επιτυχημένο αποικισμό τους, όσο και με την παραγωγή κατάλληλων αντιμικροβιακών ενώσεων (Carmona-Hernandez et al., 2019). Η μεταβολομική ανάλυση των βακτηρίων *B. velezensis* Cal.r.29 και *B. halotolerans* Cal.l.30, ανέδειξε την *in vitro* παραγωγή ενός σημαντικού αριθμού δευτερογενών μεταβολιτών. Μεταξύ των ενώσεων που ταυτοποιήθηκαν μετά από UHPLC-ESI HRMS ανάλυση, είναι τα ανάλογα των ισχυρών κυκλικών λιποπεπτιδίων iturin (C_{14} iturin A1 και C_{16} iturin A6/A7), fengycin (C_{16} fengycin A) και surfactin (C_{13} surfactin A και C_{15} surfactin A), η πρόδρομη ένωση του αντιβιοτικού διπεπτιδίου bacilysin (L-dihydroantcapsin), τέσσερα

ανάλογα του αντιβιοτικού πολυκετιδίου bacillaene (bacillaene A1, bacillaene B1, bacillaene C2 και dihydrobacillaene), η αντιβακτηριακή ένωση oxydifficidin, η σιδηροφόρα ένωση bacillibactin και η δραστική ουσία azelaic acid. Αντίστοιχα η *in silico* ανάλυση του γονιδιώματος του βακτηρίου *P. carnis* X ανέδειξε τη γονιδιακή κατασκευή για τη βιοσύνθεση του ισχυρού κυκλικού λιποπεπτιδίου viscosinamide, τη σιδηροφόρα ένωση pyoverdine και το εκκριτικό σύστημα τύπου VI (T6SS), τα οποία έχουν αναφερθεί ως ισχυροί αντιμικροβιακοί και ανταγωνιστικοί μηχανισμοί για τον αποικισμό των βακτηρίων (Durán et al., 2016; Fukuda et al., 2021; Santhanam et al., 2019).

Το εκχύλισμα του μίγματος των παραγόμενων αντιμικροβιακών ενώσεων κάθε στελέχους, παρουσίασε ισχυρή ανασταλτική δράση εναντίον του *B. cinerea in vitro*. Ωστόσο, δεν είναι απόλυτα σαφής ο τρόπος με τον οποίον οι ενώσεις συνδυάζονται μεταξύ τους προκειμένου να δράσουν, καθώς και αν η ανταγωνιστικότητα των ενδοφυτικών βακτηρίων όσο και των αντιβιοτικών που παράγουν *in vitro*, λειτουργούν με τον ίδιο τρόπο *in vivo* ή *in planta* (Köhl et al., 2019).

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσίασε η απομόνωση και ταυτοποίηση του πολυκετιδίου bacillaene του βακτηρίου *B. halotolerans* Cal.1.30. Παρά το γεγονός ότι αποτελεί έναν χημικά ασταθή δευτερογενή μεταβολίτη, εξαιρετικά ευαίσθητο στο φως, το οξυγόνο, ακόμη και τη θερμοκρασία δωματίου, καταφέραμε να απομονώσαμε και να ταυτοποιήσαμε τέσσερα ανάλογα της ένωσης, τα bacillaene A, dihydrobacillaene A, bacillaene B, bacillaene C (Li et al., 2021). Εξαιτίας της ευαισθησίας του πολυκετιδίου, περιορισμένος αριθμός βιβλιογραφικών αναφορών κατάφερε να αναδείξει την άμεση αντιβακτηριακή δράση της ένωσης και των αναλόγων της, καθώς και την ανασταλτική του δράση κατά των μυκήτων *in vitro* (Chen et al., 2006; Patel et al., 1995; Um et al., 2013). Αξίζει να αναφερθεί ότι οι ενώσεις bacillaene εκτός της αντιμικροβιακής τους δράσης, επιταχύνουν παράλληλα την παραγωγή του βιοϋμενίου για την καλύτερη αυτοπροστασία του βακτηρίου (Li et al., 2021). Μάλιστα, ο επιταχυνόμενος σχηματισμός βιοϋμενίου πραγματοποιείται σε πολύ μικρότερη συγκέντρωση (1,0 και 0,1 µg/ ml) σε σχέση με τη MIC συγκέντρωσή της ένωσης (>10 µg/ml) (Li et al., 2021). Επομένως, η παραγωγή της ένωσης bacillaene πιθανά λειτούργησε αυτοπροστατευτικά για το βακτήριο, αυξάνοντας το σχηματισμό του βιοϋμενίου για τον επιτυχημένο αποικισμό του *in vivo* όσο και *in planta*, με ταυτόχρονη την καταπολέμηση των πιθανών ανταγωνιστικών μικροοργανισμών.

Μια σημαντική ένωση που ταυτοποιήθηκε είναι το πολυκετίδιο oxydifficidin, η οποία παράγεται από το βακτήριο *B. velezensis* Cal.r.29. Η oxydifficidin αποτελεί την οξειδωμένη μορφή της αντιβακτηριακής ένωσης difficidin, η οποία καταστέλλει σημαντικό αριθμό φυτοπαθογόνων βακτηρίων, τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* (Im et al., 2020). Μάλιστα ο γενετικός τόπος του βιοσυνθετικού μονοπατιού της ένωσης difficidin/oxydifficidin και κατ' επέκταση το παραγόμενο προϊόν, αποτελεί καλό φυλογενετικό δείκτη, καθώς εμφανίζεται μόνο σε βακτήρια του είδους *B. velezensis* και *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum*, το οποίο συμφωνεί με τα αποτελέσματά μας (Berezhnaya et al., 2019).

Επιπλέον, ταυτοποιήθηκε ο δευτερογενής μεταβολίτης L-dihydroanticapsin και για τα δύο βακτήρια *B. velezensis* Cal.r.29 και *B. halotolerans* Cal.l.30, που αποτελεί την πρόδρομη ένωση του ισχυρού αντιβιοτικού bacilysin (Parker & Walsh, 2013). Η bacilysin αποτελεί ένα σημαντικό διπεπτίδιο με ισχυρή αντιβακτηριακή και παράλληλα αντιμυκητιακή δράση (Wang et al., 2018). Από την *in silico* ανάλυση των Nannan και των συνεργατών, βρέθηκε ότι η συστάδα γονιδίων *ywfA-bacABCDE-ywfG-ywfH* για τη βιοσύνθεση του αντιβιοτικού bacilysin συναντάται μόνο στα βακτήρια των ειδών *B. amyloliquefaciens*, *B. velezensis*, *Bacillus pumilus* και *B. subtilis* (υποείδη *inaquosorum*, *spizizenii* και *subtilis*) (Nannan et al., 2021). Ωστόσο, στην παρούσα έρευνα, η μεταβολομική του *B. halotolerans* Cal.l.30 και *in silico* ανάλυση των γονιδιωμάτων των *B. halotolerans* Cal.l.30, *B. halotolerans* Cal.l.11 και *B. halotolerans* Cal.f.4, ανέδειξε το γονιδιακό μονοπάτι για τη βιοσύνθεση του ισχυρού αντιβιοτικού bacilysin από βακτήρια του είδους *B. halotolerans*. Την παρατήρηση αυτή ενίσχυσαν τα αποτελέσματα της έρευνας των Farzand και συνεργατών, παρουσιάζοντας στελέχη του είδους *B. halotolerans* να παράγουν την ένωση bacilysin (Farzand et al., 2019). Μάλιστα, ξεχώρισαν ένα σημαντικό αριθμό ανταγωνιστικών βακτηρίων του γένους *Bacillus* για την ανταγωνιστικότητά τους, συνδέοντας την με το πλήθος των ισχυρών δευτερογενών μεταβολιτών που παράγουν, συμπεριλαμβανομένων των iturin, fengycin, bacillomycin, surfactin, bacillaene και bacilysin (Farzand et al., 2019).

Στην παρούσα έρευνα, μεγαλύτερη βάση δόθηκε στη μελέτη των κυκλικών λιποπεπτιδίων iturin, fengycin και surfactin, η βιοδραστικότητα των οποίων συναντάται τόσο σε *in vitro* και σε *in vivo* εφαρμογές (Arrebola et al., 2010; Chen et al., 2019; Dlamini et al., 2020). Η βιοδραστικότητα των ενώσεων ελέγχθηκε *in situ* με τη μέθοδο TLC- bioautography, μετά το διαχωρισμό του εκχυλίσματος με TLC ανάλυση. Όλα τα στελέχη εμφανίζουν περισσότερες από μια κηλίδες βιοδραστικότητας, οι οποίες σύμφωνα με τη βιβλιογραφία αντιστοιχούν σε ανάλογα των κυκλικών λιποπεπτιδίων iturin και surfactin. Η TLC μέθοδος αποτελεί βασική

μέθοδο ταχείας αναγνώρισης βιοδραστικών ενώσεων, ωστόσο δεν μπορεί να αποτελέσει αξιόπιστη μέθοδο ταυτοποίησης. Παρά το γεγονός ότι σε όλες τις αναφερόμενες έρευνες, συμπεριλαμβανομένης και της δικής μας, έχει χρησιμοποιηθεί η ίδια αναλογία και σύσταση κινητικής φάσης [chloroform:methanol:water (65:25:4)], οι R_f τιμές που παρατηρούνται μεταξύ των ερευνών διαφέρουν σε πολλές περιπτώσεις (Calvo et al., 2019). Αυτό μπορεί να οφείλεται σε εξωγενείς παράγοντες, όπως είναι η διαφορά θερμοκρασίας και υγρασίας, καθώς και ο διαφορετικός χειρισμός και η απόκλιση των χαρακτηριστικών του οργάνου (Wong et al., 2014). Για το λόγο αυτό η αξιοπιστία των συμπερασμάτων μας βασίστηκε στο συνδυασμό των αποτελεσμάτων της TLC- bioautography, της μεταβολομικής ανάλυσης που πραγματοποιήθηκε στα στελέχη Cal.l.30, Cal.r.29 και της γονιδιωματικής των στελεχών Cal.l.30, Cal.f.4, Cal.l.11 and *P.carnis* X.

Είναι γνωστό ότι το κυκλικό λιποπεπτίδιο surfactin που παράγεται από τα βακτήρια του γένους *Bacillus*, εμπλέκεται κυρίως στην κίνηση, το σχηματισμό βιοϋμενίου και τον αποικισμό των βακτηρίων σε επιφάνειες, ενώ λειτουργεί λιγότερο ως αντιμικροβιακή ένωση (Fan et al., 2017b; Romero et al., 2007; Zeriouh et al., 2011). Μάλιστα, η αντιβιοτική του δράση, συναντάται κυρίως για την αντιμετώπιση ιών και βακτηρίων και λιγότερο των φυτοπαθογόνων μυκήτων (Bais et al., 2004; Fan et al., 2017b; Ongena & Jacques, 2008; Wang et al., 2019; Zeriouh et al., 2014). Όπως διαπιστώσαμε, όλα τα στελέχη που μελετήσαμε φέρουν τα γονίδια που κωδικοποιούν για τη βιοσύνθεση του λιποπεπτιδίου surfactin, ωστόσο η βιοδραστικότητά του δεν εντοπίστηκε σε όλα τα στελέχη με τη μέθοδο της TLC-bioautography. Συγκεκριμένα, κανένα στέλεχος του είδους *B. halotolerans* δεν εμφάνισε κηλίδα βιοδραστικότητας ανάλογη του κυκλικού λιποπεπτιδίου surfactin.

Ενώ τα αποτελέσματα της μεταβολομικής ανάλυσης του Cal.l.30 ανέδειξαν την παραγωγή των ισόμορφων ενώσεων C_{13} surfactin A και C_{15} surfactin A, δε δημιουργήθηκε βιοδραστική ζώνη με ανάλογο R_f εναντίον του *B. cinerea*. Αντιθέτως, μόνο τα βακτήρια *B. velezensis* Cal.r.29 ($R_{f(1)} = 0.48-0.49$) και *B. subtilis* Cal.r.19 ($R_{f(1)} = 0.48$ και $R_{f(0)} = 0.55$), αναχάιτισαν τη βλαστικότητα των σπορίων του μύκητα *B. cinerea*, με την πιθανή παραγωγή του αντιβιοτικού surfactin (Dlamini et al., 2020; Romero et al., 2007).

Αξίζει να αναφερθεί ότι ενώ τα βακτήρια *B. velezensis* Cal.r.29 και *B. halotolerans* Cal.l.30 βιοσυνθέτουν τα ίδια ανάλογα surfactin (C_{13} surfactin A και C_{15} surfactin A), μόνο το στέλεχος Cal.r.29 εμφανίζει κηλίδα βιοδραστικότητας ανάλογη της ένωσης και μάλιστα ιδιαίτερα ισχυρή. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι το στέλεχος Cal.r.29 ίσως

παράγει σε μεγαλύτερη συγκέντρωση το ενεργό- βιοδραστικό ανάλογο surfactin σε σύγκριση με το στέλεχος Cal.l.30. Διαπιστώνουμε ότι η βιοδραστικότητα των ενώσεων διαφέρει ανάλογα με το είδος, ακόμη και το στέλεχος του βακτηρίου, ενώ η ανταγωνιστικότητά του αυξάνεται με την αύξηση της συγκέντρωσης (Dimkić et al., 2017; Jia et al., 2015; Liu et al., 2015). Η ισόμορφη ένωση C₁₅ surfactin A, αποτελεί ένα ιδιαίτερα ισχυρό αντιβιοτικό εναντίον μεγάλου αριθμού φυτοπαθογόνων μυκήτων, συμπεριλαμβανομένων του φυτοπαθογόνου μύκητα *B. cinerea* (Alvarez et al., 2012; Snook et al., 2009; Tendulkar et al., 2007). Είναι επομένως πιθανό, να αποτελεί και το ενεργό ανάλογο surfactin που παράγει το στέλεχος Cal.r.29 και αναστέλλει τη βλαστικότητα των σπορίων του φυτοπαθογόνου μύκητα *B. cinerea*. Ωστόσο, παρ' όλο που η συγκέντρωση του παραγόμενου λιποπεπτιδίου surfactin μπορεί να είναι πολύ χαμηλότερη από την απαιτούμενη ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (MIC), ταυτόχρονα μπορεί να είναι ικανή για τον επιτυχημένο αποικισμό των βακτηρίων στο φυτικό ιστό (Bais et al., 2004; Zeriouh et al., 2014).

Σε αντίθεση με το λιποπεπτίδιο surfactin που εμπλέκεται κυρίως στο σχηματισμό βιοϋμενίου και τον αποικισμό των βακτηρίων, τα κυκλικά λιποπεπτίδια iturin (iturin A και bacillomycin) και fengycin (plipastatin) αποτελούν τις κύριες αντιμικροβιακές ενώσεις των βακτηρίων του γένους *Bacillus* (Arrebola et al., 2010; Luo et al., 2015; Romero et al., 2007; Zeriouh et al., 2011). Ωστόσο, δεν είναι ακόμη σαφές ποιο από τα δύο λιποπεπτίδια είναι πιο ισχυρό, με τα αποτελέσματα να διαφέρουν μεταξύ των διαφορετικών βακτηριακών στελεχών (Lastochkina et al., 2019).

Είναι αξιοσημείωτο, ότι στα περισσότερα ενδοφυτικά βακτήρια εντοπίσαμε τουλάχιστον μία κηλίδα βιοδραστικότητας η οποία αντιστοιχεί σε ένα τουλάχιστον ανάλογο του λιποπεπτιδίου iturin. Συγκεκριμένα, τα στελέχη του είδους *B. halotolerans* (Cal.l.30, Cal.f.4, Cal.1.11, Cal.r.11 και Cal.f.2.1), παρουσιάζουν περισσότερες από μία ευδιάκριτες κηλίδες βιοδραστικότητας με R_f μεταξύ 0.28- 0.40, καθώς και μια κηλίδα για το βακτήριο *B. velezensis* Cal.r.29 με $R_{f(3)} = 0.35- 0.36$, οι οποίες αντιστοιχούν σε διαφορετικά ανάλογα των λιποπεπτιδίων της οικογένειας iturin (iturin A, bacillomycin D) (Arrebola et al., 2010; Calvo et al., 2019; Dimkić et al., 2017; Romero et al., 2007). Η μεταβολομική ανάλυση του βακτηρίου *B. velezensis* Cal.r.29, επιβεβαίωσε τα αποτελέσματα της TLC- bioautography αναδεικνύοντας δύο ξεχωριστές κορυφές που αντιστοιχούν σε ανάλογα του λιποπεπτιδίου της οικογένειας iturin, τα C₁₄ iturin A2 και C₁₆ iturin A6/A7, με τιμές $m/z = 1042,5424$ και $m/z = 1070,57581$.

Παρ' όλο που βρέθηκαν αρκετές κηλίδες βιοδραστικότητας για την παραγωγή λιποπεπτιδίων της οικογένειας iturin για το *B. halotolerans* Cal.l.30, από τη μεταβολομική ανάλυση του βακτηρίου δεν ταυτοποιήθηκε κάποιο ανάλογο iturin. Τα αποτελέσματα της TLC- bioautography ενίσχυσαν τα αποτελέσματα της *in silico* ανάλυσης (antiSMASH) του βακτηρίου, όπου ανέδειξε την παρουσία μιας συστάδας γονιδίων (Biosynthetic Gene Cluter, BGC) για τη βιοσύνθεση του iturin- type λιποπεπτιδίου, mojavensin. Επομένως, είναι πιθανό τα παραγόμενα ανάλογα iturin να διαφέρουν σημαντικά από τις ήδη χαρακτηρισμένες ενώσεις που είναι καταχωρημένες στις βάσεις δεδομένων, με αποτέλεσμα να μην είναι δυνατή η ταυτοποίησή τους, όπως επεσήμαναν και οι Dimkić και συνεργάτες (Dimkić et al., 2017).

Η βιοδραστικότητα των ισόμορφων ενώσεων του λιποπεπτιδίου iturin A (A1, A2, A3, A4, A5, A6, A7, A8), διαφέρει σημαντικά μεταξύ των διαφορετικών αναλόγων και του εκάστοτε φυτοπαθογόνου μικροοργανισμού που εφαρμόζονται, ενώ εξαρτάται άμεσα από τη συγκέντρωση και τον τρόπο εφαρμογής τους (Ambrico & Trupo, 2017; Park et al., 2016; Wang et al., 2019b; Ye et al., 2012). Τα ανάλογα iturin A2 και iturin A6/A7 ξεχωρίζουν μεταξύ των άλλων ισόμορφων ενώσεων για την καταστολή σημαντικού αριθμού φυτοπαθογόνων μυκήτων *in vitro* (Park et al., 2016). Επομένως, είναι πιθανό μεταξύ των δύο ισόμορφων ενώσεων που παράγει το στέλεχος Cal.r.29, το ανάλογο C₁₆ iturin A6/A7 να αποτελεί τη βιοδραστική ένωση που αναχαιτίζει τη βλαστικότητα των σπορίων του φυτοπαθογόνου μύκητα *B. cinerea*, όπως επεσήμαναν οι Park et al., 2016. Ωστόσο, θα πρέπει να εξετασθεί περαιτέρω η υπόθεση αυτή.

Αξίζει να σημειωθεί ότι κανένα στέλεχος του γένους *Bacillus* δεν παρουσίασε κάποια βιοδραστική κηλίδα που να αντιστοιχεί στο αντιβιοτικό fengycin, παρ' όλο που τα αποτελέσματα της γονιδιωματικής (Cal.l.11, Cal.f.4 και Cal.l.30) και της μεταβολομικής ανάλυσης (Cal.l.30 και Cal.r.29) υποδεικνύουν το αντίθετο. Είναι πιθανό η συγκέντρωση της ένωσης fengycin που απομονώθηκε να ήταν σε πολύ χαμηλότερη συγκέντρωση από τη MIC τιμή της, η ένωση να μην εμφανίζει βιοδραστικότητα εναντίον του συγκεκριμένου παθογόνου μύκητα, ή να απαιτείται η αλληλεπίδραση με κάποια άλλη ένωση προκειμένου να δράσει. Η TLC αποτελεί μια μέθοδο που διαχωρίζει τις ενώσεις, με αποτέλεσμα να μελετάται η βιοδραστικότητα της κάθε ένωσης ξεχωριστά. Είναι επομένως πιθανό, η βιοδραστικότητα πολλών ενώσεων, συμπεριλαμβανομένης και της fengycin, να μην ήταν εμφανής με τη μέθοδο της TLC-autobiography.

Η βιοδραστικότητα των λιποπεπτιδίων iturin, fengycin και surfactin, τόσο σε *in vitro* όσο και *in vivo* εφαρμογές, οφείλεται είτε στη μεμονωμένη δράση των ενώσεων, είτε απαιτείται η συνδυαστική δράση των λιποπεπτιδίων μεταξύ τους (Ambrico & Trupo, 2017; Arrebola et al., 2010; Lastochkina et al., 2019; Zeriouh et al., 2014). Συγκεκριμένα, οι Luo και συνεργάτες, ανέδειξαν τη συνδυαστική δράση των παραγόμενων κυκλικών λιποπεπτιδίων surfactin και bacillomycin L, τόσο για το σχηματισμό βιοϋμενίου και τον αποικισμό του βακτηρίου *B. subtilis* 916, όσο και τη βιολογική αντιμετώπιση του φυτοπαθογόνου μύκητα *R. Solani* (Luo et al., 2015). Μάλιστα, σε πολλές περιπτώσεις η παραγωγή του λιποπεπτιδίου surfactin στο μέσο ανάπτυξης, είναι απαραίτητη προκειμένου να ενεργοποιηθεί η δραστηριότητα των άλλων λιποπεπτιδίων (Jia et al., 2015; Mulligan et al., 2014). Όπως αναφέραμε και προηγουμένως, τα αποτελέσματα της μεταβολομικής των Cal.l.30 και Cal.r.29 στελεχών, ανέδειξαν εκτός των ισχυρών κυκλικών λιποπεπτιδίων iturin, surfactin και fengycin, τη βιοσύνθεση και άλλων αντιμικροβιακών ενώσεων. Επομένως ο τρόπος με τον οποίον οι ενώσεις αλληλεπιδρούν μεταξύ τους προκειμένου να δράσουν αποτελεσματικά είναι πολυσύνθετος και μοναδικός για κάθε στέλεχος.

Μία από τις πιο σημαντικές ενώσεις που ανιχνεύθηκαν και ταυτοποιήθηκαν και στα δύο βακτήρια *B. halotolerans* Cal.l.30 και *B. velezensis* Cal.r.29, είναι η δραστική ουσία αζελαϊκό οξύ (azelaic acid, AzA). Έως τώρα, μόνο μια αναφορά έχει βρεθεί για την βιοσύνθεση AzA από βακτήρια και συγκεκριμένα από παθογόνα στελέχη του είδους *Pseudomonas syringae* (Javvadi et al., 2018). Επομένως, από όσο είμαστε σε θέση να γνωρίζουμε, η παρούσα μελέτη αποτελεί την πρώτη αναφορά για την παραγωγή AzA από ωφέλιμα ενδοφυτικά βακτήρια του γένους *Bacillus* και συγκεκριμένα του είδους *B. velezensis* και *B. halotolerans*. Το AzA είναι ένα δικαρβοξυλικό οξύ με εννιά άτομα άνθρακα, το οποίο έχει αναφερθεί κυρίως στα φυτά ως κινητό σηματοδοτικό μόριο που ενεργοποιεί τους αμυντικούς μηχανισμούς των φυτών (Jung et al., 2009). Συγκεκριμένα, το παραγόμενο αζελαϊκό οξύ πυροδοτεί τη συσσώρευση SA στα φυτά με την ενεργοποίηση της SAR, για την αντιμετώπιση των φυτοπαθογόνων μικροοργανισμών, είτε στον ιστό επαφής, είτε διασυστηματικά (Cecchini et al., 2019; Korenblum et al., 2020). Αξίζει να σημειωθεί ότι, σε μελέτες που έχει εφαρμοσθεί εξωτερικά AzA στις ρίζες των φυτών, εκτός από την ενεργοποίηση των αμυντικών μηχανισμών των φυτών (SAR), έχει αναδειχθεί η επίδραση του μορίου στα αναπτυξιακά και μορφολογικά χαρακτηριστικά του ριζικού συστήματος (Cecchini et al., 2019; Korenblum et al., 2020). Ωστόσο, δεν έχει αποσαφηνισθεί ακόμη ο ρόλος του AzA τόσο στη βιοχημεία του βακτηρίου, όσο και στην αλληλεπίδρασή του με το φυτό. Επομένως, χρήζει περαιτέρω μελέτης η

πιθανότητα του παραγόμενου AzA των στελεχών Cal.l.30 και Cal.r.29, να εμπλέκεται ως κινητό μόριο τόσο στην ενεργοποίηση του αμυντικού μηχανισμού των φυτών όσο στην ανάπτυξή τους.

Ενώ είναι ξεκάθαρη η επίδραση των δευτερογενών μεταβολιτών και των παραγόμενων λυτικών ενζύμων στην άμεση αντιμετώπιση των φυτοπαθογόνων μυκήτων *in vitro*, στις *in vivo* και *in planta* εφαρμογές αποκτούν πιο περίπλοκη δράση (Dukare et al., 2019; Lastochkina et al., 2019). Οι παραγόμενες αντιμικροβιακές ενώσεις *in vitro*, βρίσκονται σε πολύ μεγαλύτερη συγκέντρωση από ότι συναντώνται στη φύση, εξαιτίας των εξιδανικευμένων συνθηκών ανάπτυξης των βακτηρίων (Arseneault & Fillion, 2017). Επομένως, ο ρόλος τους δεν περιορίζεται στη λυτική τους δράση, αλλά εμπλέκεται και στην έμμεση προστασία των φυτών, διεγείροντας τους αμυντικούς τους μηχανισμούς (ISR), τόσο στον ιστό επαφής, όσο και διασυστηματικά (Dimopoulou et al., 2019; Tunsagool et al., 2019; Waewthongrak et al., 2014). Επιπλέον, η διασυστηματική αντοχή των φυτικών ιστών συχνά διεγείρεται από την παρουσία πολύ μικρότερης ή και ίσης συγκέντρωσης της ένωσης σε σχέση με τη MIC τιμή της, ακόμη και αν απουσιάζει η *in vitro* βιοδραστικότητά της εναντίον του φυτοπαθογόνου μικροοργανισμού (Parker et al., 2016, Pršic & Ongena, 2020).

Οι Waewthongrak και συνεργάτες, ανέδειξαν την προστασία των μανταρινιών από το παθογόνο μύκητα *Penicillium digitatum* με την ενεργοποίηση της ISR των καρπών, μετά από την εφαρμογή των ενδοσπορίων του βακτηρίου *B.subtilis* ABS-S14 και του βιοδραστικού υπερκείμενου της καλλιέργειας του (Waewthongrak et al., 2015). Μάλιστα, παρατήρησαν ότι η επαγωγή της ISR και των δύο μεταχειρίσεων πραγματοποιήθηκε από τη δεύτερη κιόλας μέρα της εφαρμογής τους, τονίζοντας το ρόλο του βακτηρίου και των ενεργών αντιμικροβιακών του ενώσεων ως ISR διεγέρτες (Waewthongrak et al., 2014,2015). Από την μετασυλλεκτική εφαρμογή των απομονωμένων κυκλικών λιποπεπτιδίων iturin A, fengycin και surfactin του *B.subtilis* ABS-S14 σε καρπούς λεμονιού και μανταρινιού, παρατήρησαν την ενεργοποίηση της ISR των καρπών, με την iturin A να παίζει κυρίαρχο ρόλο στους καρπούς μανταρινιού, σε αντίθεση με τους καρπούς πορτοκαλιού που ξεχώρισαν τα λιποπεπτίδια iturin και surfactin (Tunsagool et al., 2019; Waewthongrak et al., 2014).

Ένας σημαντικός αριθμός βιβλιογραφικών αναφορών έχει εστιάσει στην ανάδειξη των βακτηριακών λιποπεπτιδίων (LPs), πολυκετιδίων (PKs), λυτικών ενζύμων, φυτοορμονών, πτητικών ενώσεων, σιδηροφόρων ενώσεων και διαφόρων πρωτεϊνών (πχ. flagellin, flg22) ως ισχυρούς ISR διεγέρτες (elicitors), τόσο στον ιστό επαφής τους, όσο και διασυστηματικά

(Lastochkina et al., 2019; Meziane et al., 2015; Pršić & Ongena, 2020; Tran et al., 2007; Wu et al., 2018).

Επομένως, τόσο για τα ενδοφυτικά στελέχη Cal.l.30, Cal.r.29, Cal.l.11 και Cal.f.4, όσο και το ριζοσφαιρικό βακτήριο X, όλες οι παραγόμενες αντιμικροβιακές ενώσεις και οι δευτερογενείς μεταβολίτες που ταυτοποιήθηκαν μετά από μεταβολομική ή/και *in silico* ανάλυση, πιθανά συνέβαλαν στην ενεργοποίηση της ISR των καρπών που εφαρμόστηκαν. Ως εκ τούτου, η βιολογική αντιμετώπιση των φυτοπαθογόνων μυκήτων *B. cinerea* και *C. acutatum* στους καρπούς τομάτας, σταφυλιού και ελιάς αντίστοιχα, επιτεύχθηκε με το συνδυασμό πολλών διαφορετικών μηχανισμών δράσης, οι οποίοι χρήζουν περαιτέρω μελέτης.

4.2.3 Εφαρμογή των ανταγωνιστικών βακτηρίων *in planta* και ενεργοποίηση της ISR των φυτών

Η ικανότητα των *B. halotolerans* Cal.l.30, *B. halotolerans* Cal.f.4 και *B. velezensis* Cal.r.29 και το ριζοσφαιρικό βακτήριο X να επάγουν τη διασυστηματική αντοχή των φυτών με σκοπό την προστασία τους από παθογόνους μικροοργανισμούς, μελετήθηκε σε φυτά *Solanum lycopersicum* var. Chondrokatsari Messinias, σε συνθήκες θερμοκηπίου. Συγκεκριμένα, τα βακτήρια είτε ως μεμονωμένα στελέχη, είτε ως μίγματα βακτηρίων (Cal.l.30-Cal.r.29, Cal.l.30- Cal.f.4 και Cal.r.29-X), μειώνουν σημαντικά την σοβαρότητα της ασθένειας, παρουσιάζοντας μειωμένη νεκρωτική κηλίδα στο σημείο εμβολιασμού του *B. cinerea*, σε σύγκριση με τα φυτά μάρτυρες. Οι εφαρμογές που ξεχώρισαν ήταν εκείνες των στελεχών Cal.r.29 και X, παρουσιάζοντας το μικρότερο εμβαδόν νεκρωτικής κηλίδας. Σε κάθε περίπτωση, το ποσοστό βιολογικού ελέγχου του νεκροτροφικού φυτοπαθογόνου μύκητα *B. cinerea* ήταν εξίσου υψηλό για όλες τις μεταχειρίσεις.

Η εφαρμογή των βακτηρίων πραγματοποιήθηκε με δύο τρόπους, αρχικά με βιο-κάλυψη των σπόρων τομάτας (seed bio-priming) και σε επόμενο χρόνο με επιπρόσθετο εμβολιασμό του βακτηρίου στις ρίζες των αναπτυγμένων φυτών. Η μόλυνση του φυτοπαθογόνου μύκητα *B. cinerea* πραγματοποιήθηκε στα φύλλα, όταν τα φυτά ήταν πλέον στο στάδιο των 5- 6 πραγματικών φύλλων. Από τον τρόπο εφαρμογής των ανταγωνιστικών βακτηρίων, γίνεται κατανοητό ότι η αντιμετώπιση του φυτοπαθογόνου μύκητα πραγματοποιήθηκε με τη διέγερση των αμυντικών μηχανισμών των φυτών και την επαγωγή της διασυστηματικής αντοχής των φυτών (ISR).

Ο αρχικός εμβολιασμός των ανταγωνιστικών βακτηρίων με βιο-κάλυψη των σπόρων, οδήγησε στον επιτυχημένο αποικισμό των βακτηρίων στο έδαφος και τελικά στην περιοχή της ριζόσφαιρας του φυτού. Ο αποικισμός των βακτηρίων συνέβαλε παράλληλα και στην ενεργοποίηση της επαγόμενης διασυστηματικής αντοχής τους. Έτσι, περίπου στις 15 ημέρες ανάπτυξης των φυτών τομάτας (δύο πραγματικά φύλλα), εκτός από την επιβίωση των εμβολιασμένων βακτηρίων στην περιοχή της ριζόσφαιρας, παρατηρούμε σημαντικά αυξημένα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων ενεργοποίησης της ISR. Η εφαρμογή των βακτηριακών BCAs δεν έχει σκοπό την άμεση ενεργοποίηση των αμυντικών μηχανισμών των φυτών ή την παραγωγή των φυτοορμονών, αντιθέτως στοχεύει στην ενίσχυση της ευαισθησίας των φυτών, ώστε σε ενδεχόμενη επίθεση από κάποιο φυτοπαθογόνο μικροοργανισμό (priming) να γίνει η άμεση καταπολέμησή του (Beckers & Conrath, 2007; Wang et al., 2015). Οι παρατηρήσεις αυτές έχουν ως συνέπεια όχι μόνο τον επιτυχημένο αποικισμό των βακτηρίων στο έδαφος, αλλά και την ταυτόχρονη προστασία των φυτών, μετά από την εφαρμογή τους με βιο- κάλυψη του σπόρου (Tran et al., 2007).

Η εφαρμογή των ανταγωνιστικών στελεχών Cal.l.30, Cal.r.29, Cal.f.4 και X, ενεργοποιούν την ISR των φυτών τομάτας, με την ταυτόχρονη ενεργοποίηση των μονοπατιών για την παραγωγή του SA και του JA/ET, όπως έχει παρατηρηθεί και σε αρκετές έρευνες (Dimopoulou et al., 2019; Fatouros et al., 2018; Wu et al., 2018). Τα βακτήρια *B. velezensis* Cal.r.29, *B. halotolerans* Cal.l.30 και *P. carnis* X αποτελούν τα πιο ισχυρά στελέχη, παρουσιάζοντας αυξημένο επίπεδο έκφρασης του γονιδίου *PR3*, που εμπλέκεται στο μονοπάτι του SA, όσο και αυξημένα αντίγραφα των γονιδίων *ERF1* και *ACO1* του JA/ET. Συγκεκριμένα, το *ACO1* γονίδιο κωδικοποιεί για μια ACC οξειδάση (ACO), η οποία εμπλέκεται στο τελικό βήμα για την βιοσύνθεση του αιθυλενίου (ET) (Stearns and Glick, 2003). Επομένως, τα αυξημένα επίπεδα έκφρασης του *ACO1*, δηλώνουν την ενεργοποίηση του μονοπατιού βιοσύνθεσης του ET, το οποίο σε συνεργασία με το JA λειτουργεί ως σηματοδοτικό μόριο για την ενεργοποίηση της ISR κατά τον αποικισμό των βακτηρίων (Adie et al., 2007). Ωστόσο η ρύθμιση του ET όσο και του JA, εξαρτάται άμεσα από τον παράγοντα απόκρισης του αιθυλενίου (ethylene- responsive factor 1, ERF1), έναν μεταγραφικό παράγοντα για τη ρύθμιση των γονιδίων που ανταποκρίνονται σε βιοτικές και αβιοτικές καταπονήσεις (Adie et al., 2007). Ως συνέπεια της εφαρμογής των στελεχών Cal.r.29, Cal.l.30 και X, παρατηρείται η συνέργεια μεταξύ του μονοπατιού του ET και του JA, όπως φάνηκε από τα αυξημένα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *ERF1* και του γονιδίου *ACO1*. Τα αποτελέσματα αυτά, ταυτίζονται με εκείνα των Dimopoulou και συνεργατών, σύμφωνα με

τους οποίους η εφαρμογή του υπερκείμενου της καλλιέργειας του ανταγωνιστικού βακτηρίου *B. amyloliquefaciens* MBI600, εξισορροπεί τα αυξημένα επίπεδα έκφρασης του *aco1* για την παραγωγή του ET, μέσω του JA και την αυξημένη έκφραση του γονιδίου *erf1* (Dimoroulou et al., 2019).

Τα βακτήρια του γένους *Bacillus* παράγουν έναν σημαντικό αριθμό ISR διεγερτών που μπορούν να ρυθμίσουν τα μονοπάτια του JA και ET, συμπεριλαμβανομένων των κυκλικών λιποπεπτιδίων iturin A, fengycin και surfactin (Tunsagool et al., 2019). Αξίζει να αναφερθεί ότι η παραγωγή των δευτερογενών μεταβολιτών macrolactin, difficidin και bacilysin, έχουν βρεθεί να επάγουν τη διασυστηματική αντοχή των φυτών *A. thaliana*, παρουσιάζοντας αυξημένα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *ERF1* (Wu et al., 2018). Ως εκ τούτου, εκτός των ισχυρών κυκλικών λιποπεπτιδίων iturin A, fengycin και surfactin που παράγει το βακτήριο *B. velezensis* Cal.r.29, πιθανά να συνέβαλλαν στα αυξημένα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *ERF1* του φυτού τομάτας και οι παραγόμενοι δευτερογενείς μεταβολίτες oxydifficidin και L-L-dihydroanticapsin (πρόδρομη ένωση του bacilysin).

Επιπλέον, από την εφαρμογή των στελεχών Cal.r.29, Cal.l.30, Cal.f.4 και X, τα φυτά τομάτας παρουσίασαν αυξημένες τιμές έκφρασης του γονιδίου *PR3*, που κωδικοποιεί για τη βιοσύνθεση της χιτινάσης, ενώ μόνο το στέλεχος Cal.r.29 αύξησε τα αντίγραφα του γονιδίου *PR2*. Η χιτινάση και η β- 1,3 γλουκανάση που κωδικοποιούν τα γονίδια *PR3* και *PR2* αντίστοιχα, είναι PR πρωτεΐνες οι οποίες εμπλέκονται στο μονοπάτι του SA και παρουσιάζουν μια συνεργική αντιμικροβιακή δραστηριότητα για την καταστολή των παθογόνων μυκήτων (Silva et al., 2004). Την ίδια στιγμή, η παραγωγή αυτών των ενζύμων προκαλεί την απελευθέρωση φυτοαλεξινών και φαινολικών ενώσεων, για την ισχυροποίηση της άμυνας των φυτών (Silva et al., 2004).

Τα παραγόμενα κυκλικά λιποπεπτίδια των οικογενειών surfactin, iturin, fengycin και viscosin, για τα βακτήρια του γένους *Bacillus* και *Pseudomonas* αντίστοιχα, καθώς και οι VOCs 2,3- βουτανεδιόνη και ακετοΐνη, λειτουργούν ως ισχυροί ISR- διεγέρτες για την ενεργοποίηση της ISR των φυτών μέσω του μονοπατιού του SA και JA/ET (Farace et al., 2015; Ongena et al., 2007; Ryu et al., 2004; Tran et al., 2007; Yi et al., 2017). Συγκεκριμένα, καθορίζουν άμεσα τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *PR2* και *PR3*, για την παραγωγή των β-1,3 γλουκανάση και χιτινάση, αντίστοιχα (Kim et al., 2015; Li et al., 2019; Park et al., 2016). Τα αποτελέσματα της μεταβολομικής και *in silico* ανάλυσης των βακτηρίων *B. velezensis* Cal.r.29, *B. halotolerans* Cal.f.4, *B. halotolerans* Cal.l.30 και *P. carnis* X,

ενισχύουν την πιθανότητα αυτές οι ενώσεις να ενεργοποιήσαν το μονοπάτι του SA των φυτών τομάτας.

Σε μελέτη των Wu και των συνεργατών, η παραγωγή των ενώσεων surfactin, fengycin και 2,3- βουτανεδιόνη από το ανταγωνιστικό βακτήριο *B. amyloliquefaciens* SQR9, αυξάνει σημαντικά τα επίπεδα έκφρασης των *PR3* και *PR2* γονιδίων, τα οποία ενεργοποιούν το μονοπάτι του SA (Wu et al., 2018). Ταυτόχρονα, οι ερευνητές επισήμαναν τη σημαντική επίδραση των πολυκετιδίων bacillaene και macrolactin, καθώς και των παραγόμενων εξωπολυσακχαριτών του βακτηρίου στην ενεργοποίηση της ISR, αυξάνοντας το επίπεδο έκφρασης των γονιδίων *PR3* και *PR2*, αντίστοιχα. Ως εκ τούτου, η παραγωγή των επιπλέον τεσσάρων αναλόγων του πολυκετιδίου bacillaene, πιθανά ευθύνεται για το πολύ αυξημένο επίπεδο έκφρασης του *PR3* γονιδίου που παρατηρήθηκε από την εφαρμογή του ενδοφυτικού βακτηρίου Cal.l.30.

Σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα, γίνεται κατανοητό ότι το πλήθος των πρωτεϊνών και δευτερογενών μεταβολιτών που παράγουν τα βακτήρια Cal.r.29, Cal.l.30, Cal.f.4 και X, επηρέασαν τόσο τον αποικισμό των βακτηρίων και την άμεση ανταγωνιστική τους δράση, καθώς και τη διέγερση των αμυντικών μηχανισμών των φυτών τόσο στον ιστό επαφής, όσο και διασυστηματικά. Η επιπρόσθετη εφαρμογή των βακτηρίων με ριζοπότισμα, είχε σκοπό να ενισχύσει τον ήδη υπάρχοντα βακτηριακό πληθυσμό και ταυτόχρονα να ισχυροποιήσει τη δράση του. Το εμπλουτισμένο εμβόλιο συνέβαλε άμεσα στην διέγερση των αμυντικών μηχανισμών των φυτών τομάτας. Έτσι, μέσα σε 24 h από την εφαρμογή του, το νέο εμβόλιο ενεργοποίησε την έκφραση των γονιδίων που εμπλέκονται στα μονοπάτια του SA και του JA/ET.

Τα βακτήρια που ξεχώρισαν μεταξύ των υπολοίπων ήταν τα στελέχη Cal.r.29 και X, με την υπερέκφραση των γονιδίων *ERF1*, *PR1*, *PR2* και *PR3* που εμπλέκονται στα μονοπάτια του JA /ET και του SA. Επιπλέον, τα δύο στελέχη ενεργοποίησαν την έκφραση του *ACO1* γονιδίου, με το στέλεχος Cal.r.29 κοντά στις φυσιολογικές τιμές του φυτού μάρτυρα, υποδηλώνοντας την άμεση επίδραση του παράγοντα ERF1 στο μεταβολικό μονοπάτι του ET. Το πλήθος και η συγκέντρωση των δευτερογενών μεταβολιτών που παράγει το στέλεχος Cal.r.29 (iturin A, fengycin, surfactin, oxydifficidin και L-dihydroanticapsin) σε σύγκριση με τα υπόλοιπα στελέχη του γένους *Bacillus*, πιθανά να ευθύνεται για την άμεση και ισχυρή ενεργοποίηση της ISR των φυτών τομάτας, καθώς και το μειωμένο εμβαδό νεκρωτικής

κηλίδας που δημιουργήθηκε στα φύλλα μετά τη μόλυνση με το φυτοπαθογόνο μύκητα *B. cinerea* (Cawoy et al., 2014; Dimopoulou et al., 2019).

Σημαντική είναι και η επίδραση των βακτηρίων του είδους *B. halotolerans* Cal.l.30 και Cal.f.4, στην άμεση ενεργοποίηση της ISR των φυτών. Συγκεκριμένα, η εφαρμογή του στελέχους Cal.f.4 διεγείρει την έκφραση των σημαντικών αμυντικών γονιδίων *PR2* και *PR3* για την παραγωγή β-1,3 γλουκανάση και χιτινάση, αντίστοιχα. Παράλληλα, η σχετικά αυξημένη έκφραση των γονιδίων *ERF1* και *ACO1*, επισημαίνεται ως ρόλος του παράγοντα *ERF1* στην μείωση του ET μέσω της ενεργοποίησης του JA.

Το στέλεχος Cal.l.30 ενεργοποίησε επίσης το μονοπάτι του JA/ET, εμφανίζοντας αυξημένα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *ERF1*, *ACO1* και *TomLoxA*. Οι λιποξυγενάσες της τομάτας (Tomato Lipoxygenases, *TomLox*), είναι ένζυμα που καταβολίζουν το λινολεϊκό οξύ (18:2) και λινολενικό οξύ (18:3) σε ενώσεις του υπεροξειδίου του υδρογόνου, οι οποίες αποτελούν πρόδρομες ενώσεις για την παραγωγή του JA (Baysal et al., 2007). Το γεγονός ότι το επίπεδο έκφρασης του γονιδίου *ERF1* ρυθμίζεται αρνητικά από το ET και θετικά από το JA, υποδεικνύει ότι η εφαρμογή του βακτηρίου Cal.l.30 ενεργοποιεί το JA προκειμένου να καταστείλει το παραγόμενο ET (Dimopoulou et al., 2019). Αυτό επιβεβαιώνεται από τα αυξημένα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *TomLoxA* μέσα σε 24 h από την εφαρμογή του βακτηρίου Cal.l.30. Μάλιστα, είναι πιθανό τα παραγόμενα λιποπεπτίδια surfactin και iturin A του βακτηρίου, να λειτούργησαν μεταξύ των άλλων ως ISR- διεγέρτες για την επαγωγή του γονιδίου *TomLoxA* (Tunsagool et al., 2019; Waewthongrak et al., 2014).

Σύμφωνα με όσα προαναφέρθηκαν, είναι κατανοητό ότι τα αποτελέσματα μπορούν να διαφοροποιηθούν ανάλογα από το είδος ακόμη και το στέλεχος του βακτηρίου, το σύνολο των διαφορετικών αντιμικροβιακών ενώσεων που παράγουν, τον τρόπο που αλληλεπιδρούν μεταξύ τους, τη συγκέντρωση των παραγόμενων ενώσεων, τον αρχικό πληθυσμό του βακτηρίου ή τη συγκέντρωση των αντιμικροβιακών ενώσεων που εμβολιάζεται, τον παθογόνο μικροοργανισμό που αντιμετωπίζουν, το φυτό ξενιστή στο οποίο εφαρμόζονται, καθώς και τον ακριβή ιστό (Cawoy et al., 2015; Chandler et al., 2015; Comby et al., 2017; Fatouros et al., 2018; Luo et al., 2015; Ongena & Jacques, 2008; Park et al., 2016; Zeriyoh et al., 2014).

4.3 Επίδραση των μιγμάτων βακτηρίων στην ανάπτυξη και προστασία των φυτών *Solanum lycopersicum* var. *Chondrokatsari* Messinias

Ο συνδυασμός των βακτηρίων που χαρακτηρίζονται από ισχυρούς μηχανισμούς δράσης, έχει σκοπό τη δημιουργία ενός μίγματος βακτηρίων τα οποία είτε συμπληρώνουν το ένα το άλλο, είτε συνδυάζουν τους διαφορετικούς μηχανισμούς δράσης τους προκειμένου να ενισχύσουν την ανάπτυξη των φυτών και προστασία τους από φυτοπαθογόνους οργανισμούς. Τα μίγματα μπορεί να περιλαμβάνουν βακτήρια που παρουσιάζουν τους ίδιους μηχανισμούς δράσης, αλλά ανταπεξέρχονται σε διαφορετικές περιβαλλοντικές συνθήκες, ενεργούν αποτελεσματικά εναντίον συγκεκριμένων παθογόνων και παρουσιάζουν εκλεκτικότητα στο φυτό ξενιστή (Compant et al., 2019).

Η δημιουργία των μιγμάτων *B. velezensis* Cal.r.29- *B. halotolerans* Cal.l.30, *B. halotolerans* Cal.l.30- *B. halotolerans* Cal.f.4 και *B. velezensis* Cal.r.29- *P. carnis* X, ανέδειξε τρεις ισχυρούς συνδυασμούς βακτηρίων τόσο σε *vitro* και *in vivo*, όσο και *in planta* εφαρμογές. Τα μίγματα δημιουργήθηκαν με σκοπό να συνδυαστούν διαφορετικά γένη, είδη και στελέχη βακτηρίων μεταξύ τους, προκειμένου να ερευνηθεί η αλληλεπίδραση τους σε *in vitro* δοκιμές και η συνδυαστική επίδρασή τους στην ανάπτυξη και προστασία των φυτών. Το κάθε στέλεχος μεμονωμένα, χαρακτηρίζεται από ένα μοναδικό συνδυασμό ισχυρών μηχανισμών που επιδρούν, άμεσα ή έμμεσα, στην ανάπτυξη και την προστασία των φυτών. Ο συνδυασμός των κατάλληλων βακτηρίων μεταξύ τους οδηγεί στη δημιουργία ενός ισχυρού μίγματος όπου ενισχύει αθροιστικά την αποτελεσματικότητά του στην ανάπτυξη και προστασία των φυτών, σε σύγκριση με τα μεμονωμένα στελέχη (Thomloundi et al., 2019). Ωστόσο, για τη δημιουργία ενός αποτελεσματικού και ισχυρού μίγματος βακτηρίων, είναι απαραίτητος ο έλεγχος της *in vitro* συμβατότητάς τους, προκειμένου να πετύχουμε τα βέλτιστα θετικά αποτελέσματα κατά την εφαρμογή τους *in planta*. Από την εφαρμογή των τριών μιγμάτων βακτηρίων (Cal.l.30- Cal.f.4, Cal.l.30- Cal.r.29 και Cal.r.29- X) σε φυτά *A. thaliana* Col-0 *in vitro* και σε φυτά *Solanum lycopersicum* σε συνθήκες θερμοκηπίου, προκύπτουν διαφορετικά αποτελέσματα ανάλογα με το συνδυασμό των βακτηρίων.

Το πρώτο μίγμα δημιουργήθηκε μεταξύ των στελεχών Cal.l.30 και Cal.f.4 του είδους *B. halotolerans*. Παρ' όλο που τα δύο στελέχη ανήκουν στο ίδιο είδος και η ταξινόμηση των στελεχών μέσω του ANI (average nucleotide identity) και του dDDH (DNA-DNA hybridization) τα κατέστησε φυλογενετικά ως συγγενικά στελέχη, το γεγονός της δημιουργίας ζώνης διαχωρισμού μεταξύ τους κατά την ταυτόχρονη ομαδική κινητικότητα μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για διαφορετικά στελέχη (Wall, 2016). Τα στελέχη πιθανά φέρουν

ένα συνδυασμό μηχανισμών διαφοροποίησης από τα μη συγγενικά στελέχη, ο οποίος περιλαμβάνει την έκκριση πρωτεϊνών/τοξινών για τον περιορισμό των κυττάρων με επαφή (contact dependent inhibition, CDI), ένα πλήθος εκκρινόμενων αντιμικροβιακών ενώσεων, διαμεμβρανικούς υποδοχείς και κινητά στοιχεία όπως είναι οι φάγοι (Lyons et al., 2016). Για παράδειγμα, η *in silico* συγκριτική ανάλυση των πιθανών πρωτεϊνών των στελεχών Cal.l.30 και Cal.f.4 έδειξε ότι οι DNA- μεθυλοτρανσφεράσες οι οποίες αποτελούν μέρος του τύπου I συστήματος περιορισμού- τροποποίησης του DNA (Type I restriction-modification DNA-methyltransferases, hsdMSR) βρέθηκε στα στελέχη Cal.l.30 και Cal.f.4, ενώ οι Mrr πρωτεΐνες που αποτελούν περιοριστικές ενδονουκλεάσες κρυπτικού τύπου IV με εξειδίκευση στη μεθυλίωση του DNA, ταυτοποιήθηκε μόνο στο στέλεχος Cal.l.30. Παράλληλα, σημαντικές διαφορές παρουσίασε στο σύστημα τοξίνης/ αντιτοξίνης, WapA/ WapI. Ωστόσο, στο σύνολο των *in vitro* πειραμάτων συμβατότητας που πραγματοποιήθηκαν, τα δύο στελέχη παρουσίασαν μια φιλική συμπεριφορά μεταξύ τους συνυπάρχοντας εξίσου σε κάθε εφαρμογή.

Η εφαρμογή των βακτηρίων Cal.l.30 και Cal.f.4 ως μίγμα σε φυτά *A. thaliana*, παρουσίασε φυτά με καλύτερα μορφολογικά και αναπτυξιακά χαρακτηριστικά, σε σύγκριση με την εφαρμογή τους ως μεμονωμένα στελέχη. Το γεγονός αυτό αποδεικνύει τη συνδυαστική δράση των βακτηρίων στην ανάπτυξη των φυτών *A. thaliana in vitro*, καθώς και τη μη ανταγωνιστική συμπεριφορά μεταξύ τους. Επιπλέον, τα αποτελέσματα της *in vitro* αλληλεπίδρασης των βακτηρίων με τη μέθοδο της μικτής μακροαποικίας σε στερεή επιφάνεια ενίσχυσαν αυτήν την παρατήρηση καθώς τα στελέχη εξακολουθούν να αναπτύσσονται ταυτόχρονα παρουσιάζοντας ανάλογο αριθμό κυττάρων.

Η αποτελεσματική συνύπαρξη των στελεχών Cal.l.30 και Cal.f.4 παρατηρήθηκε επίσης με τον ταυτόχρονο αποικισμό των βακτηρίων του μίγματος στις ρίζες των φυτών *A. thaliana* και με τη δημιουργία ισχυρού βιοϋμενίου *in vitro*. Συγκεκριμένα, από την εφαρμογή των βακτηρίων ως μίγμα παρατηρήθηκε μεγαλύτερη προσκόλληση των κυττάρων τους στις ρίζες των φυτών *A. thaliana*, σε σύγκριση με την εφαρμογή τους ως μεμονωμένα στελέχη. Με αυτόν τον τρόπο εφαρμογής, το κάθε στέλεχος ωφελήθηκε από την παρουσία του άλλου, ενώ η επιφάνεια των ριζών πιθανά ευνόησε τον αποικισμό των βακτηρίων είτε στον ίδιο, είτε σε διαφορετικό οικότοπο (πιο πιθανό), αυξάνοντας τελικά τον πληθυσμό τους (Pliego et al., 2008; Stefanic et al., 2015). Το σύνολο των *in vitro* πειραμάτων για την συμβατότητα των στελεχών Cal.l.30 και Cal.f.4, ανέδειξε δύο συμβατά στελέχη με αθροιστικά ωφέλιμη επίδραση τόσο στη συνύπαρξή τους όσο και στην ανάπτυξη των φυτών.

Το μίγμα μεταξύ των βακτηρίων *B. halotolerans* Cal.l.30 και *B. halotolerans* Cal.f.4 αποτελεί ένα ισχυρό, επιτυχημένο και συμβατό μίγμα καθώς επιδρά θετικά στην ανάπτυξη των φυτών όχι μόνο σε ελεγχόμενες συνθήκες *in vitro*, αλλά και σε συνθήκες θερμοκηπίου. Από την εφαρμογή των βακτηρίων Cal.l.30- Cal.f.4 ως μίγμα σε φυτά τομάτας σε συνθήκες θερμοκηπίου, προέκυψαν φυτά με βελτιωμένα αναπτυξιακά χαρακτηριστικά, σε σύγκριση με τα φυτά μάρτυρες. Επιπλέον, ο εμβολιασμός των φυτών με το μίγμα βακτηρίων αύξησε σημαντικά το ριζικό σύστημα των φυτών, καθώς και τα υπέργεια μορφολογικά τους χαρακτηριστικά σε σύγκριση με την εφαρμογή τους ως μεμονωμένα στελέχη. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με ένα σύνολο ερευνών που υποστηρίζουν ότι η δημιουργία ενός συμβατού μίγματος ισχυρών βακτηρίων, μπορεί να λειτουργήσει συνεργικά στην ανάπτυξη και προστασία των φυτών (Fira et al., 2018; Thomloui et al., 2019).

Τα δύο βακτήρια, κατάφεραν να αποικίσουν εξίσου αποτελεσματικά την περιοχή της ριζόσφαιρας, γεγονός που αποτυπώθηκε τόσο στα μορφολογικά χαρακτηριστικά των φυτών τομάτας, όσο και την ενεργοποίηση των αμυντικών τους μηχανισμών. Το μίγμα των βακτηρίων Cal.l.30 και Cal.f.4 ενεργοποίησε την ISR των φυτών τομάτας, από την αρχική τους κιόλας εφαρμογή με τη βιο-κάλυψη των σπόρων. Συγκεκριμένα, περίπου δύο εβδομάδες (στάδιο δύο πραγματικών φύλλων) μετά τον εμβολιασμό του μίγματος με βιο-κάλυψη των σπόρων, παρατηρήθηκε υψηλή έκφραση των γονιδίων *PR2* και *PR3*, τα οποία εμπλέκονται στο μονοπάτι του SA για την παραγωγή των β-1,3 γλουκανάση και χιτινάση, αντίστοιχα. Η επιπρόσθετη εφαρμογή του μίγματος των βακτηρίων με ριζοπότισμα διατήρησε αυξημένα τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *PR2* και *PR3*, ενώ ενεργοποιήθηκε άμεσα το μονοπάτι του JA/ ET με την αυξημένη έκφραση των γονιδίων *ACO1* και *ERF1*. Συγκρίνοντας από τα επίπεδα έκφρασης των φυτών με την εφαρμογή των βακτηρίων ως μεμονωμένα στελέχη, είναι πιθανό το μονοπάτι του SA να ενεργοποιήθηκε κυρίως από την παρουσία του στελέχους Cal.f.4, ενώ του JA/ET από το συνδυασμό και των δύο βακτηρίων. Ως εκ τούτου, ο συνδυασμός των ισχυρών ανταγωνιστικών στελεχών Cal.l.30 και Cal.f.4 ενεργοποίησε αθροιστικά την ISR των φυτών, παρουσιάζοντας μάλιστα ιδιαίτερα μειωμένη νεκρωτική κηλίδα μετά την εφαρμογή του φυτοπαθογόνου μύκητα *B. cinerea* στα φύλλα των φυτών τομάτας. Ανάλογα αποτελέσματα παρατηρήθηκαν από τους Kloepper και συνεργάτες, σύμφωνα με τους οποίους ο συνδυασμός των βακτηρίων *B. amyloliquefaciens* IN937a και του *B. subtilis* GB03 ως μίγμα, επέδειξε σημαντικότερη επίδραση στην ανάπτυξη των φυτών και στην προστασία τους από φυτοπαθογόνους μικροοργανισμούς με την ενεργοποίηση της

διασυστηματικής αντοχής τους, σε σύγκριση με τις μεμονωμένες εφαρμογές των βακτηρίων (Kloepper et al., 2004).

Η συνδυαστική δράση των βακτηρίων παρατηρήθηκε και στην *in vivo* αντιμετώπιση του φυτοπαθογόνου μύκητα *B. cinerea* σε καρπούς σταφυλιού. Το μίγμα των βακτηρίων Cal.l.30-Cal.f.4 μείωσε σημαντικά τη συχνότητα και τη σοβαρότητα της μετασυλλεκτικής ασθένειας, με τις τιμές να κυμαίνονται εξίσου χαμηλά όσο και του στελέχους Cal.l.30. Μεταξύ των βακτηρίων Cal.l.30 και Cal.f.4, το βακτήριο Cal.l.30 εμφανίζει πιο ανταγωνιστική συμπεριφορά εναντίον του *B. cinerea* τόσο *in vitro*, όσο και *in vivo* σε καρπούς σταφυλιού αλλά και τομάτας. Επομένως, είναι πιθανό μεταξύ των δύο βακτηρίων του μίγματος, το στέλεχος Cal.l.30 να παίζει τον κυρίαρχο ρόλο στην άμεση αντιμετώπιση του παθογόνου μύκητα *B. cinerea*.

Το επόμενο μίγμα που δημιουργήθηκε μεταξύ των βακτηρίων *B. velezensis* Cal.r.29 και *B. halotolerans* Cal.l.30, παρουσίασε πιο περίπλοκα αποτελέσματα. Από την αλληλεπίδραση μεταξύ των βακτηρίων *B. velezensis* Cal.r.29 και *B. halotolerans* Cal.l.30 δημιουργήθηκε ισχυρή διαχωριστική ζώνη μεταξύ των ομαδικά κινούμενων στελεχών, όπως ήταν αναμενόμενο από τη θεωρία της διαφοροποίησης των μη συγγενικών ατόμων (Stefanic et al., 2015). Ανάλογα αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και από τους Kolter και συνεργάτες, οι οποίοι παρατήρησαν το σχηματισμό διαχωριστικής ζώνης μεταξύ βακτηρίων που ανήκουν στα διαφορετικά είδη *B. subtilis* και *B. licheniformis* (Kolter et al., 2017). Σε αντίθεση με τα βακτήρια *B. halotolerans* Cal.l.30 και *B. halotolerans* Cal.f.4 που εμφάνισαν μια φιλική συμπεριφορά μεταξύ τους στο σύνολο των εφαρμογών τους, τα βακτήρια *B. halotolerans* Cal.l.30 και *B. velezensis* Cal.r.29 παρουσίασαν διαφορετική συμπεριφορά ανάλογα με την εφαρμογή.

Η *in vitro* εφαρμογή των στελεχών Cal.l.30 και Cal.r.29 ως μίγμα σε φυτά *A. thaliana*, βελτίωσε σημαντικά το σύνολο των μορφολογικών και αναπτυξιακών χαρακτηριστικών των φυτών, σε σύγκριση με την εφαρμογή των μεμονωμένων βακτηρίων. Ο φαινότυπος αυτός υποδεικνύει μια ομαλή συνύπαρξη μεταξύ των δύο βακτηρίων στο σημείο εμβολιασμού τους και ταυτόχρονα τη συνδυαστική δράση μεταξύ των βακτηρίων. Η υπόθεση αυτή επιβεβαιώθηκε από τα αποτελέσματα της *in vitro* αλληλεπίδρασής των βακτηρίων Cal.l.30 και Cal.r.29 με τη μέθοδο της μικτής μακροαποικίας, όπου και τα δύο στελέχη αναπτύχθηκαν εξίσου στο σημείο του εμβολιασμού τους, παρουσιάζοντας αυξημένο εμβαδόν μακροαποικίας ανάλογο του στελέχους Cal.r.29. Είναι πιθανόν μάλιστα, η αυξημένη

παραγωγή ισχυρών επιφανειοδραστικών ενώσεων και κυρίως της surfactin του βακτηρίου Cal.r.29, να συμπαρέσυρε τα κύτταρα του Cal.l.30 δημιουργώντας μια ενιαία εξάπλωση του μίγματος.

Η ισορροπία διαταράχθηκε όταν το μίγμα των βακτηρίων Cal.r.29 και Cal.l.30 εφαρμόστηκε στις ρίζες των φυτών *A. thaliana*, για τη μελέτη της ικανότητας αποικισμού τους. Ενώ τα μεμονωμένα στελέχη αποίκισαν εξίσου αποτελεσματικά τις ρίζες των φυτών, από την εφαρμογή τους ως μίγμα κυριάρχησε το στέλεχος Cal.r.29 έναντι του Cal.l.30. Είναι πιθανό εξαιτίας της κυριαρχίας του Cal.r.29, τα βακτήρια να κινήθηκαν σε διαφορετικούς οικότοπους της ρίζας προκειμένου να επιβιώσουν και τα δύο στελέχη (Stefanic et al., 2015). Τα αποτελέσματα αυτά συνάδουν με τη θεωρία των μη συγγενικών ατόμων, που έχει ως συνέπεια την κυριαρχία του ενός από τα δύο μη συγγενικά στελέχη και τον εκτοπισμό του πιο αδύναμου σε διαφορετικό οικότοπο (Stefanic et al., 2015).

Σε αντίθεση με την *in vitro* κυριαρχία του *B. velezensis* Cal.r.29, η εφαρμογή του μίγματος με βιο-κάλυψη στους σπόρους τομάτας και η ανάπτυξή τους σε συνθήκες θερμοκηπίου, έφερε διαφορετικά αποτελέσματα. Συγκεκριμένα, το βακτήριο *B. halotolerans* Cal.l.30 αποίκισε αποτελεσματικότερα την περιοχή της ριζόσφαιρας των φυταρίων τομάτας σε σύγκριση με το βακτήριο *B. velezensis* Cal.r.29. Ως εκ τούτου, το στέλεχος Cal.l.30 κυριάρχησε μεταξύ των δύο στελεχών κατά την εφαρμογή τους ως μίγμα, παρά τη χαμηλότερη συγκέντρωση κυττάρων σε σύγκριση με τη μεμονωμένη του εφαρμογή. Η κυριαρχία του βακτηρίου *B. halotolerans* Cal.l.30 επηρέασε ταυτόχρονα τα μορφολογικά και αναπτυξιακά χαρακτηριστικά των φυτών τομάτας, τα οποία είναι ανάλογα των φυτών που εμβολιάστηκαν μόνο με το στέλεχος Cal.l.30. Ενδεχομένως, η εφαρμογή του βακτηρίου Cal.l.30 με βιο-κάλυψη των σπόρων παρουσίασε πιο ανταγωνιστική συμπεριφορά έναντι του Cal.r.29 στον αποικισμό και την ανάπτυξη των κυττάρων του. Η ανταγωνιστική συμπεριφορά μεταξύ των στελεχών και ο μειωμένος αποικισμός τους στην περιοχή της ριζόσφαιρας, πιθανά ευθύνονται για τα χαμηλά επίπεδα έκφρασης των γονιδίων που ενεργοποιούν τους αμυντικούς μηχανισμούς των φυτών τομάτας. Ωστόσο, σε μεταγενέστερο στάδιο μετά από παραπάνω εφαρμογές εμβολίων, η παρουσία των βακτηρίων κατάφερε να ενεργοποιήσει τους αμυντικούς μηχανισμούς των φυτών και να μειώσουν τελικά τη σοβαρότητα της ασθένειας, γεγονός που υποδεικνύει είτε την επικράτηση ενός εκ των δύο στελεχών είτε την επίτευξη ισορροπίας μεταξύ των πληθυσμών τους.

Η κυριαρχία του βακτηρίου Cal.l.30 παρατηρήθηκε επίσης κατά την εφαρμογή του μίγματος Cal.l.30- Cal.r.29 σε καρπούς σταφυλιού για την αντιμετώπιση του φυτοπαθογόνου μύκητα *B. cinerea*, *in vivo*. Ενώ το ποσοστό μολυσμένων καρπών και ο δείκτης σοβαρότητας της ασθένειας μειώνεται εξαιρετικά από τη μεμονωμένη εφαρμογή του στελέχους Cal.r.29, κατά την εφαρμογή του ως μίγμα με το στέλεχος Cal.l.30 οι τιμές είναι αυξημένες και πλησιάζουν εκείνες του Cal.l.30.

Το μίγμα των βακτηρίων *B. halotolerans* Cal.l.30 και *B. velezensis* Cal.r.29 εμφάνισε μια ασυνεπή και εχθρική συμπεριφορά μεταξύ των στελεχών του, καθιστώντας το τελικά μη επιτυχημένο. Ενώ ο συνδυασμός συμβατών βακτηρίων με διαφορετικούς μηχανισμούς δράσης μπορεί να λειτουργήσει συμπληρωματικά και να ωφελήσει αποδοτικότερα τις καλλιέργειες των φυτών, η εφαρμογή ενός μη συμβατού και παράλληλα ανταγωνιστικού μίγματος μεταξύ των στελεχών που το αποτελούν, μπορεί να μειώσει την αποτελεσματικότητά του (Thomloundi et al., 2019).

Το τελευταίο μίγμα δημιουργήθηκε μεταξύ δύο ισχυρών PGP βακτηρίων, τα οποία έχουν ξεχωρίσει για το σύνολο των άμεσων και έμμεσων μηχανισμών δράσης τους και ανήκουν σε διαφορετικά γένη βακτηρίων, τα *B. velezensis* Cal.r.29 και *P. carnis* X. Ενώ τα δύο στελέχη είναι απομακρυσμένα φυλογενετικά, εμφανίζουν μια φιλική συμπεριφορά μεταξύ τους και συνυπάρχουν αρμονικά στο σύνολο των εφαρμογών τους. Σημαντικός αριθμός βιβλιογραφικών αναφορών έχει ξεχωρίσει την αποτελεσματικότητα των μιγμάτων όταν πραγματοποιείται μεταξύ των βακτηρίων του γένους *Bacillus* και *Pseudomonas* (Thomloundi et al., 2019). Αξίζει να αναφερθεί ότι και σε παλαιότερη εφαρμογή του βακτηρίου *P. carnis* X ως μίγμα με το βακτήριο *Pseudomonas corrugata* R117 σε φυτά αγγουριού, παρατηρήθηκε η ισχυρή βιολογική αντιμετώπιση του φυτοπαθογόνου ωομύκητα *Pythium ultimum* σε συνθήκες θερμοκηπίου, παρ' όλο που τα δύο στελέχη δεν ήταν συμβατά *in vitro* (Georgakopoulos et al., 2002).

Η *in vitro* εφαρμογή του μίγματος των Cal.r.29 και X στα φυτά *A. thaliana*, βελτίωσε σημαντικά τα μορφολογικά και αναπτυξιακά χαρακτηριστικά των φυτών, παρουσιάζοντας ανάλογες τιμές με εκείνες από την εφαρμογή του στελέχους X. Γίνεται κατανοητό ότι τον κυρίαρχο ρόλο στην ανάπτυξη των φυτών έχει το βακτήριο *P. carnis* X, παρ' όλο που και τα δύο στελέχη αναπτύσσονται στο κοινό σημείο εμβολιασμού.

Όπως αποδείχθηκε με τη μέθοδο της μικτής μακροαποικίας σε στερεή επιφάνεια, ενώ το εμβαδόν της μακροαποικίας του μίγματος είναι κοντά στις βέλτιστες τιμές του ισχυρά

κινούμενου στελέχους Cal.r.29, το βακτήριο *P. carnis* X βρέθηκε σε μεγαλύτερη συγκέντρωση κυττάρων. Ανάλογα αποτελέσματα έχουν βρεθεί και για το στέλεχος *Ps. fluorescens* C5-10, όπου σύμφωνα με τους Abriat και συνεργάτες οφείλεται στην ταχύτερη ανάπτυξη του βακτηρίου κατά το σχηματισμό βιοϋμενίου σε σύγκριση με το βακτήριο (Abriat et al., 2019). Ωστόσο, η συγκέντρωση των κυττάρων του μίγματος βρέθηκε σημαντικά υψηλή και για τα δύο στελέχη, κινούμενα χαμηλότερα κατά μια τάξη μεγέθους σε σχέση με τον μεμονωμένο εμβολιασμό τους. Επομένως, παρατηρήθηκε η δημιουργία ενός ισχυρού βιοϋμενίου μακροαποικίας στο στερεό θρεπτικό μέσο ανάπτυξης το οποίο περιβάλλει και τα δύο στελέχη, Cal.r.29 και X.

Σημαντικός αριθμός βιβλιογραφικών αναφορών έχει αναλύσει το παραγόμενο κυκλικό λιποπεπτιδίου surfactin των βακτηρίων του γένους *Bacillus* ως ισχυρή επιφανειοδραστική και παράλληλα αντιβακτηριακή ένωση (Fan et al., 2017b; Romero et al., 2007). Ωστόσο, έχει αναφερθεί παράλληλα ο σημαντικός του ρόλος στην δημιουργία συμβατών μιγμάτων μεταξύ βακτηρίων του γένους *Bacillus* και *Pseudomonas* (Molina-Santiago et al., 2019; Santhanam et al., 2019). Το βακτήριο *B. velezensis* Cal.r.29 παράγει δύο ανάλογα surfactin, τα οποία ευθύνονται για τη σημαντική εξάπλωση και τον αποικισμό του βακτηρίου, ενώ παράλληλα πιθανά ενισχύουν την εξάπλωση του βακτηρίου *P. carnis* X, χωρίς κάποια αντιμικροβιακή δράση απέναντί του (Molina-Santiago et al., 2019).

Επιπλέον, η *in vitro* συμβατότητα των δύο βακτηρίων μελετήθηκε με το σχηματισμό ισχυρού βιοϋμενίου του μίγματος, τόσο σε πλαστική επιφάνεια (96 well-plate) όσο και στις ρίζες των φυτών *A. thaliana*. Τα δύο PGP στελέχη Cal.r.29 και X ενώ δημιούργησαν ισχυρό βιοϋμένιο ως μεμονωμένα στελέχη στην πλαστική επιφάνεια εμβολιασμού, από την εφαρμογή τους ως μίγμα σχηματίστηκε το πιο ισχυρό βιοϋμένιο. Η αυξημένη παραγωγή των λιποπεπτιδίων surfactin και iturin καθώς και της σιδηροφόρου ένωσης bacillibactin του βακτηρίου *B. velezensis* Cal.r.29, σε συνδυασμό με την παραγωγή του κυκλικού λιποπεπτιδίου viscosinamide και της ισχυρής σιδηροφόρου ένωσης pyoverdine του βακτηρίου *P. carnis* X, πιθανά οφείλονται για τον σημαντικά αυξημένο βιοϋμένιο από την εφαρμογή τους ως μίγμα (Santhanam et al., 2019).

Από τον εμβολιασμό των στελεχών Cal.r.29 και X στις ρίζες των φυτών *A. thaliana* παρατηρήσαμε ότι το μίγμα των βακτηρίων αποίκισε ταυτόχρονα την επιφάνεια των ριζών. Αξίζει να σημειωθεί ότι ενώ η συγκέντρωση των κυττάρων του στελέχους X παρέμεινε σταθερή σε σύγκριση με την εφαρμογή του ως μεμονωμένο στέλεχος, η συγκέντρωση των

κυττάρων του Cal.r.29 μειώθηκε αισθητά. Οι παρατηρήσεις μας συμφωνούν με την υπόθεση ότι τα βακτήρια του γένους *Pseudomonas* συμβάλλουν καλύτερα στο σχηματισμό ισχυρού βιοϋμενίου κατά την εφαρμογή τους με βακτήρια άλλων γενών (Abriat et al., 2019). Ωστόσο, παρά την κυριαρχία του βακτηρίου του γένους *Pseudomonas* και τα δύο στελέχη του μίγματος συνυπάρχουν φιλικά μεταξύ τους και αποικίζουν τη ρίζα των φυτών *A. thaliana* είτε σε ξεχωριστούς οικότοπους είτε και σε ενιαίο σχηματισμό (Abriat et al., 2019; Ansari & Ahmad, 2019; Santhanam et al., 2019).

Η συμβατότητα μεταξύ των βακτηρίων *B. velezensis* Cal.r.29 και *P. carnis* X και η ωφέλιμη δράση του μίγματός τους παρατηρήθηκε όχι μόνο *in vitro* αλλά και κατά την εφαρμογή σε φυτά τομάτας σε συνθήκες θερμοκηπίου. Η εφαρμογή των βακτηρίων ως μίγμα σε σπόρους τομάτας με bio-priming, αύξησε σημαντικά τον αποικισμό και των δύο στελεχών στην περιοχή της ριζόσφαιρας, σε σύγκριση με τη μεμονωμένη τους εφαρμογή. Επομένως, ο ταυτόχρονος εμβολιασμός των βακτηρίων όχι μόνο δεν επηρέασε την ανάπτυξη του κάθε στελέχους, αλλά λειτούργησε ωφελμιστικά για τον αποικισμό και την ανάπτυξη και των δύο στελεχών. Το μίγμα των βακτηρίων Cal.r.29- X, με το σύνολο των ανταγωνιστικών μηχανισμών που διαθέτουν κατάφεραν να αποικίσουν αποτελεσματικότερα από κάθε άλλο μίγμα που εφαρμόστηκε (Cal.l.30- Cal.f.4, Cal.l.30- Cal.r.29), την περιοχή της ριζόσφαιρας. Τα φυτά τομάτας που εμβολιάστηκαν με το μίγμα Cal.r.29- X, παρουσίασαν βελτιωμένα αναπτυξιακά χαρακτηριστικά, ξεχωρίζοντας μάλιστα για το ιδιαίτερα αυξημένο νωπό και ξηρό βάρος της ρίζας των φυτών σε σύγκριση με τις εφαρμογές των μεμονωμένων βακτηρίων. Ο αυξημένος αποικισμός των βακτηρίων στην περιοχή της ριζόσφαιρας, σε συνδυασμό με τους πολύ ισχυρούς μηχανισμούς δράσεις τους συνέβαλλαν αθροιστικά στα βελτιωμένα αναπτυξιακά και μορφολογικά χαρακτηριστικά των φυτών τομάτας, το οποίο συμφωνεί με ένα σύνολο διαθέσιμων βιβλιογραφικών αναφορών (Ansari & Ahmad, 2019).

Την ίδια στιγμή η εφαρμογή του μίγματος Cal.r.29- X ενεργοποίησε τους αμυντικούς μηχανισμούς των φυτών τομάτας προστατεύοντάς τα τελικά από το φυτοπαθογόνο μύκητα *B. cinerea* που εμβολιάστηκε στα φύλλα. Συγκεκριμένα, το μίγμα των βακτηρίων μόνο από την αρχική τους εφαρμογή με βιο-κάλυψη των σπόρων τομάτας και τον επιτυχημένο αποικισμό τους στην περιοχή της ριζόσφαιρας, είχαν ενεργοποιημένη την ISR των φυτών παρουσιάζοντας αυξημένη έκφραση του γονιδίου *ERF1* για την παραγωγή του JA και παράλληλα μειωμένη την έκφραση του γονιδίου *ACO1* για την παραγωγή του ET. Η επιπρόσθετη εφαρμογή του μίγματος βακτηρίων ενεργοποίησε μέσα σε 24 h το μονοπάτι του SA με την αυξημένη έκφραση του γονιδίου *PR3*. Το αποτέλεσμα της άμεσης διέγερσης της

ISR των φυτών τομάτας, ήταν η παρεμπόδιση του φυτοπαθογόνου μύκητα *B. cinerea* με τη δημιουργία σημαντικά μειωμένης νεκρωτικής κηλίδας. Το εμβαδόν της νεκρωτικής κηλίδας στα φυτά που εφαρμόστηκαν με το μίγμα βακτηρίων Cal.r.29- X, ήταν ανάλογο εκείνων από την εφαρμογή των μεμονωμένων στελεχών, επιβεβαιώνοντας για ακόμη μια φορά τη συνέργεια των συμβατών βακτηρίων.

Τέλος, η αποτελεσματικότητα του μίγματος μεταξύ των στελεχών Cal.r.29 και X επιβεβαιώθηκε και μετά την *in vivo* εφαρμογή τους σε καρπούς σταφυλιού για τη μετασυλλεκτική αντιμετώπιση του φυτοπαθογόνου μύκητα *B. cinerea*. Η συχνότητα όσο και ο δείκτης σοβαρότητας της ασθένειας μειώθηκε εξαιρετικά, φτάνοντας σε ανάλογες τιμές με εκείνες του Cal.r.29. Γίνεται κατανοητό ότι το ανταγωνιστικό βακτήριο *B. velezensis* Cal.r.29 με τον αυξημένο αριθμό των ισχυρών δευτερογενών μεταβολιτών που παράγει πιθανά επηρεάζει σε μεγαλύτερο βαθμό την ανταγωνιστικότητα του μίγματος σε σύγκριση με το στέλεχος X. Ωστόσο, με την εφαρμογή του στελέχους X και σε συνεργασία με το στέλεχος Cal.r.29, τα εμβολιασμένα φυτά είτε *in vitro* είτε σε συνθήκες θερμοκηπίου ξεχωρίζουν για τα αναπτυξιακά και μορφολογικά τους χαρακτηριστικά.

Συμπερασματικά, από το σύνολο των αποτελεσμάτων της παρούσας διδακτορικής μελέτης, τόσο τα ενδοφυτικά βακτήρια του φαρμακευτικού φυτού *Calendula officinalis* όσο και το ριζοσφαιρικό βακτήριο *P. carnis* X, ξεχώρισαν για το σύνολο των δυνατοτήτων τους τόσο σε *in vitro* και *in vivo* εφαρμογές, όσο και σε συνθήκες θερμοκηπίου. Ο ξεχωριστός συνδυασμός διαφορετικών μηχανισμών δράσης για το κάθε στέλεχος, μπορεί να αποφέρει θετικές συνέπειες στην ανάπτυξη των φυτών. Ειδικότερα, ο κατάλληλος συνδυασμός των μεμονωμένων βακτηριακών στελεχών μεταξύ τους με σκοπό τη δημιουργία ενός συμβατού μίγματος βακτηρίων, μπορεί να λειτουργήσει αποδοτικότερα σε ένα έυρος καλλιεργειών, με διαφορετικές συνθήκες ανάπτυξης και τρόπους εφαρμογής. Επομένως, έχει καταστεί σαφές ότι το σύνολο των ενδοφυτικών βακτηρίων του φυτού *Calendula officinalis* και ιδιαίτερα τα στελέχη Cal.l.30, Cal.r.29 και Cal.f.4, καθώς και το ριζοσφαιρικό βακτήριο *P. carnis* X, αποτελούν υποσχόμενους παράγοντες βιολογικού ελέγχου και ενίσχυσης της ανάπτυξης των φυτών, για μια αειφόρο και παράλληλα αποτελεσματική γεωργία.

Βιβλιογραφία



5. Βιβλιογραφία

- Abdul Malik, N. A., Kumar, I. S., & Nadarajah, K. (2020). Elicitor and Receptor Molecules: Orchestrators of Plant Defense and Immunity. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(3), 963.
- Abriat, C., Virgilio, N., Heuzey, M. C., & Daigle, F. (2019). Microbiological and real-time mechanical analysis of *Bacillus licheniformis* and *Pseudomonas fluorescens* dual-species biofilm. *Microbiology*, 165(7), 747-756.
- Adie, B., Chico, J. M., Rubio-Somoza, I., & Solano, R. (2007). Modulation of plant defenses by ethylene. *Journal of Plant Growth Regulation*, 26(2), 160-177.
- Adnan, M., Shah, Z., Fahad, S., Arif, M., Alam, M., Khan, I. A., ... & Nasim, W. (2017). Phosphate-solubilizing bacteria nullify the antagonistic effect of soil calcification on bioavailability of phosphorus in alkaline soils. *Scientific reports*, 7(1), 1-13.
- Ahemad, M., & Kibret, M. (2014). Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: current perspective. *Journal of King saud University-science*, 26(1), 1-20.
- Ahmad, F., Ahmad, I., & KHAN, M. S. (2005). Indole acetic acid production by the indigenous isolates of *Azotobacter* and fluorescent *Pseudomonas* in the presence and absence of tryptophan. *Turkish Journal of Biology*, 29(1), 29-34.
- Akocak, P. B., Churey, J. J., & Worobo, R. W. (2015). Antagonistic effect of chitinolytic *Pseudomonas* and *Bacillus* on growth of fungal hyphae and spores of aflatoxigenic *Aspergillus flavus*. *Food Bioscience*, 10, 48-58.
- Akram, W., Anjum, T., & Ali, B. (2015). Co-cultivation of tomato with two *Bacillus* strains: effects on growth and yield. *J Anim Plant Sci*, 25, 1644-1651.
- 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(30), 29910-29920.
- Aleti, G., Lehner, S., Bacher, M., Compant, S., Nikolic, B., Plesko, M., ... & Brader, G. (2016). Surfactin variants mediate species-specific biofilm formation and root colonization in *Bacillus*. *Environmental microbiology*, 18(8), 2634-2645.
- Alexander, D. B., & Zuberer, D. A. (1991). Use of chrome azurol S reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria. *Biology and Fertility of soils*, 12(1), 39-45.
- Almaghrabi, O. A., Massoud, S. I., & Abdelmoneim, T. S. (2013). Influence of inoculation with plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on tomato plant growth and nematode reproduction under greenhouse conditions. *Saudi journal of biological sciences*, 20(1), 57-61.
- 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(1), 159-174.
- 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.
- Ansari, F. A., & Ahmad, I. (2019). Fluorescent *Pseudomonas*-FAP2 and *Bacillus licheniformis* interact positively in biofilm mode enhancing plant growth and photosynthetic attributes. *Scientific reports*, 9(1), 1-12.
- Anyango, B., Wilson, K. J., Beynon, J. L., & Giller, K. E. (1995). Diversity of rhizobia nodulating *Phaseolus vulgaris* L. in two Kenyan soils with contrasting pHs. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(11), 4016-4021.

- Aranda, F. J., Teruel, J. A., & Ortiz, A. (2005). Further aspects on the hemolytic activity of the antibiotic lipopeptide iturin A. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1713(1), 51-56.
- Araújo, W. L., Lacava, P. T., Andreote, F. D., & Azevedo, J. L. (2008). Interaction between endophytes and plant host: biotechnological aspects. *Plant-microbe interactions*, 1, 1-21.
- Armbruster, C. E., & Mobley, H. L. (2012). Merging mythology and morphology: the multifaceted lifestyle of *Proteus mirabilis*. *Nature Reviews Microbiology*, 10(11), 743-754.
- Armbruster, C. R., & Parsek, M. R. (2018). New insight into the early stages of biofilm formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(17), 4317-4319.
- Aron, Z. D., Dorrestein, P. C., Blackhall, J. R., Kelleher, N. L., & Walsh, C. T. (2005). Characterization of a new tailoring domain in polyketide biogenesis: the amine transferase domain of MycA in the mycosubtilin gene cluster. *Journal of the American Chemical Society*, 127(43), 14986-14987.
- Arora, D., Rani, A., & Sharma, A. (2013). A review on phytochemistry and ethnopharmacological aspects of genus *Calendula*. *Pharmacognosy reviews*, 7(14), 179.
- Arrebola, E., Sivakumar, D., Bacigalupo, R., & Korsten, L. (2010). Combined application of antagonist *Bacillus amyloliquefaciens* and essential oils for the control of peach postharvest diseases. *Crop protection*, 29(4), 369-377.
- 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(3), 267-274.
- Arunachalam, C., & Gayathri, P. (2010). Studies on bioprospecting of endophytic bacteria from the medicinal plant of *Andrographis paniculata* for their antimicrobial activity and antibiotic susceptibility pattern. *Int J Curr Pharm Res*, 2(4), 63-68.
- Asari, S., Matzén, S., Petersen, M. A., Bejai, S., & Meijer, J. (2016). Multiple effects of *Bacillus amyloliquefaciens* volatile compounds: plant growth promotion and growth inhibition of phytopathogens. *FEMS Microbiology Ecology*, 92(6), fiw070.
- Ashraf, M., & Foolad, M. R. (2005). Pre-sowing seed treatment—A shotgun approach to improve germination, plant growth, and crop yield under saline and non-saline conditions. *Advances in agronomy*, 88, 223-271.
- Ashraf, M., Hasnain, S., Berge, O., & Mahmood, T. (2004). Inoculating wheat seedlings with exopolysaccharide-producing bacteria restricts sodium uptake and stimulates plant growth under salt stress. *Biology and Fertility of soils*, 40(3), 157-162.
- Atzorn, R., Crozier, A., Wheeler, C. T., & Sandberg, G. (1988). Production of gibberellins and indole-3-acetic acid by *Rhizobium phaseoli* in relation to nodulation of *Phaseolus vulgaris* roots. *Planta*, 175(4), 532-538.
- Audrain, B., Farag, M. A., Ryu, C. M., & Ghigo, J. M. (2015). Role of bacterial volatile compounds in bacterial biology. *FEMS Microbiology Reviews*, 39(2), 222-233.
- Aziz, M., Nadipalli, R. K., Xie, X., Sun, Y., Surowiec, K., Zhang, J. L., & Paré, P. W. (2016). Augmenting sulfur metabolism and herbivore defense in *Arabidopsis* by bacterial volatile signaling. *Frontiers in plant science*, 7, 458.
- Babu, A. N., Jogaiah, S., Ito, S. I., Nagaraj, A. K., & Tran, L. S. P. (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.
- Badri, D. V., Weir, T. L., van der Lelie, D., & Vivanco, J. M. (2009). Rhizosphere chemical dialogues: plant-microbe interactions. *Current opinion in biotechnology*, 20(6), 642-650.
- 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(5), 758-771.

- Bais, H. P., Broeckling, C. D., & Vivanco, J. M. (2008). Root exudates modulate plant—microbe interactions in the rhizosphere. In *Secondary metabolites in soil ecology* (pp. 241-252). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Bais, H. P., Fall, R., & Vivanco, J. M. (2004). Biocontrol of *Bacillus subtilis* against infection of *Arabidopsis* roots by *Pseudomonas syringae* is facilitated by biofilm formation and surfactin production. *Plant physiology*, 134(1), 307-319.
- Baker, K. F., & Cook, R. J. (1974). *Biological control of plant pathogens*. WH Freeman and Company..
- Beckers, G. J., & Conrath, U. (2007). Priming for stress resistance: from the lab to the field. *Current opinion in plant biology*, 10(4), 425-43.
- Bakker, P. A. H. M., Ran, L. X., Pieterse, C. M. J., & Van Loon, L. C. (2003). Understanding the involvement of rhizobacteria-mediated induction of systemic resistance in biocontrol of plant diseases. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 25(1), 5-9.
- Bákonyi, N., Gajdos, E., Lévai, L., Veres, S., Tóth, B., & Marozsán, M. (2009). Comparison of effects of different biofertilisers on early development of cucumber and wheat seedlings. *Zbornik Radova*, 44, 16-20.
- Baldan, E., Nigris, S., Romualdi, C., D'Alessandro, S., Clocchiatti, A., Zottini, M., ... & Baldan, B. (2015). Beneficial bacteria isolated from grapevine inner tissues shape *Arabidopsis thaliana* roots. *PLoS One*, 10(10), e0140252.
- Balibar, C. J., Vaillancourt, F. H., & Walsh, C. T. (2005). Generation of D amino acid residues in assembly of arthrofactin by dual condensation/epimerization domains. *Chemistry & biology*, 12(11), 1189-1200.
- Baltz, R. H. (2014). Combinatorial biosynthesis of cyclic lipopeptide antibiotics: a model for synthetic biology to accelerate the evolution of secondary metabolite biosynthetic pathways. *ACS synthetic biology*, 3(10), 748-758.
- Baril, E., Coroller, L., Couvert, O., El Jabri, M., Leguerinel, I., Postollec, F., ... & Mafart, P. (2012). Sporulation boundaries and spore formation kinetics of *Bacillus* spp. as a function of temperature, pH and aw. *Food microbiology*, 32(1), 79-86.
- Barratt, R. W., & Horsfall, J. G. (1945). An improved grading system for measuring plant disease. *Phytopathology*, 35, 655.
- Barriuso, J., Solano, B. R., Lucas, J. A., Lobo, A. P., García-Villaraco, A., & Mañero, F. J. G. (2008). Ecology, genetic diversity and screening strategies of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR). *Journal of Plant nutrition*, 4, 1-17.
- Bartoli, C. G., Casalengué, C. A., Simontacchi, M., Marquez-Garcia, B., & Foyer, C. H. (2013). Interactions between hormone and redox signalling pathways in the control of growth and cross tolerance to stress. *Environmental and Experimental Botany*, 94, 73-88.
- Bavaresco, L. G., Osco, L. P., Araujo, A. S. F., Mendes, L. W., Bonifacio, A., & Araújo, F. F. (2020). *Bacillus subtilis* can modulate the growth and root architecture in soybean through volatile organic compounds. *Theoretical and Experimental Plant Physiology*, 1-10.
- Baysal, T., & Demirdöven, A. (2007). Lipxygenase in fruits and vegetables: A review. *Enzyme and microbial technology*, 40(4), 491-496.
- Beattie, G. A. (2007). Plant-associated bacteria: survey, molecular phylogeny, genomics and recent advances. In *Plant-associated bacteria* (pp. 1-56). Springer, Dordrecht.
- Beauregard, P. B., Chai, Y., Vlamakis, H., Losick, R., & Kolter, R. (2013). *Bacillus subtilis* biofilm induction by plant polysaccharides. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(17), E1621-E1630.
- Begum, M. M., Sariah, M., Abidin, Z. M. A., Puteh, A. B., & Rahman, M. A. (2008). Antagonistic potential of selected fungal and bacterial biocontrol agents against *Colletotrichum truncatum* of soybean seeds. *Pertanica J. Trop. Agric. Sci*, 31, 45-53.

- Belimov, A. A., Dodd, I. C., Safronova, V. I., Hontzeas, N., & Davies, W. J. (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(6), 1485-1495.
- Beiranvand, M., Amin, M., Hashemi-Shahraki, A., Romani, B., Yaghoubi, S., & Sadeghi, P. (2017). Antimicrobial activity of endophytic bacterial populations isolated from medical plants of Iran. *Iranian journal of microbiology*, 9(1), 11.
- Berezhnaya, A. V., Evdokimova, O. V., Valentovich, L. N., Sverchkova, N. V., Titok, M. A., & Kolomiyets, E. I. (2019). Molecular Genetic and Functional Analysis of the Genome of Bacteria *Bacillus velezensis* BIM B-439D. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 55(4), 386-396.
- Bhatt, R. M., Selvakumar, G., Upreti, K. K., & Boregowda, P. C. (2015). Effect of biopriming with *Enterobacter* strains on seed germination and seedling growth of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) under osmotic stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*, 85(1), 63-69.
- Bhattacharyya, P. N., & Jha, D. K. (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(4), 1327-1350.
- Bhore, S. J., Preveena, J., & Kandasamy, K. I. (2013). Isolation and identification of bacterial endophytes from pharmaceutical agarwood-producing *Aquilaria* species. *Pharmacognosy research*, 5(2), 134.
- Bitas, V., Kim, H. S., Bennett, J. W., & Kang, S. (2013). Sniffing on microbes: diverse roles of microbial volatile organic compounds in plant health. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 26(8), 835-843.
- Bloemberg, G. V., & Lugtenberg, B. J. (2001). Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. *Current opinion in plant biology*, 4(4), 343-350.
- Bock, C. H., Gottwald, T. R., Parker, P. E., Cook, A. Z., Ferrandino, F., Parnell, S., & Van den Bosch, F. (2009). The Horsfall-Barratt scale and severity estimates of citrus canker. *European journal of plant pathology*, 125(1), 23-38.
- Bogino, P. C., Oliva, M. D. L. M., Sorroche, F. G., & Giordano, W. (2013). The role of bacterial biofilms and surface components in plant-bacterial associations. *International journal of molecular sciences*, 14(8), 15838-15859.
- Boller, T., & Felix, G. (2009). A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annual review of plant biology*, 60, 379-406.
- Bonmatin, J. M., Laprévote, O., & Peypoux, F. (2003). Diversity among microbial cyclic lipopeptides: iturins and surfactins. Activity-structure relationships to design new bioactive agents. *Combinatorial chemistry & high throughput screening*, 6(6), 541-556.
- Borriss, R. (2020). Phytostimulation and biocontrol by the plant-associated *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42: an update. In *Phyto-Microbiome in Stress Regulation* (pp. 1-20). Springer, Singapore.
- Bowman, S. M., & Free, S. J. (2006). The structure and synthesis of the fungal cell wall. *Bioessays*, 28(8), 799-808.
- Brader, G., Compant, S., Mitter, B., Trognitz, F., & Sessitsch, A. (2014). Metabolic potential of endophytic bacteria. *Current opinion in biotechnology*, 27, 30-37.
- Brahim, A. H., Jlidi, M., Daoud, L., Ben-Ali, M., Akremi, A., Hmani, H., ... & Ben-Ali, M. (2019). Seed-Biopriming of Durum Wheat with Diazotrophic Plant Growth Promoting Bacteria (PGPB) Enhanced Tolerance to *Fusarium* Head Blight (FHB) and Salinity Stress.

- Branda, S. S., González-Pastor, J. E., Ben-Yehuda, S., Losick, R., & Kolter, R. (2001). Fruiting body formation by *Bacillus subtilis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(20), 11621-11626
- Brink, S. C. (2016). Unlocking the secrets of the rhizosphere. *Trends in plant science*, 21(3), 169-170.
- Bryk, H., Sobiczewski, P., & Dyki, B. (1998). Antagonistic effect of *Erwinia herbicola* on in vitro spore germination and germ tube elongation of *Botrytis cinerea* and *Penicillium expansum*. *Biocontrol*, 43(1), 97-106.
- Budi, S. W., van Tuinen, D., Arnould, C., Dumas-Gaudot, E., Gianinazzi-Pearson, V., & Gianinazzi, S. (2000). Hydrolytic enzyme activity of *Paenibacillus* sp. strain B2 and effects of the antagonistic bacterium on cell integrity of two soil-borne pathogenic fungi. *Applied Soil Ecology*, 15(2), 191-199.
- Calvo, H., Mendiara, I., Arias, E., Blanco, D., & Venturini, M. E. (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.
- Cappellari, L. D. R., & Banchio, E. (2019). Microbial volatile organic compounds produced by *Bacillus amyloliquefaciens* GB03 ameliorate the effects of salt stress in *mentha piperita* principally through acetoin emission.
- Carmona-Hernandez, S., Reyes-Pérez, J. J., Chiquito-Contreras, R. G., Rincon-Enriquez, G., Cerdan-Cabrera, C. R., & Hernandez-Montiel, L. G. (2019). Biocontrol of postharvest fruit fungal diseases by bacterial antagonists: A review. *Agronomy*, 9(3), 121.
- Carrillo, C., Teruel, J. A., Aranda, F. J., & Ortiz, A. (2003). Molecular mechanism of membrane permeabilization by the peptide antibiotic surfactin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1611(1-2), 91-97.
- Castulo-Rubio, D. Y., Alejandre-Ramírez, N. A., del Carmen Orozco-Mosqueda, M., Santoyo, G., Macías-Rodríguez, L. I., & Valencia-Cantero, E. (2015). Volatile organic compounds produced by the rhizobacterium *Arthrobacter agilis* UMCV2 modulate *Sorghum bicolor* (strategy II plant) morphogenesis and SbFRO1 transcription in vitro. *Journal of plant growth regulation*, 34(3), 611-623.
- Caulier, S., Gillis, A., Colau, G., Licciardi, F., Liépin, M., Desoignies, N., ... & Bragard, C. (2018). Versatile antagonistic activities of soil-borne *Bacillus* spp. and *Pseudomonas* spp. against *Phytophthora infestans* and other potato pathogens. *Frontiers in microbiology*, 9, 143.
- Caulier, S., Nannan, C., Gillis, A., Licciardi, F., Bragard, C., & Mahillon, J. (2019). Overview of the antimicrobial compounds produced by members of the *Bacillus subtilis* group. *Frontiers in microbiology*, 10, 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 *B. subtilis*/*amyloliquefaciens*. *Microbial biotechnology*, 8(2), 281-295.
- Cawoy, H., Mariutto, M., Henry, G., Fisher, C., Vasilyeva, N., Thonart, P., ... & Ongena, M. (2014). Plant defense stimulation by natural isolates of *Bacillus* depends on efficient surfactin production. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 27(2), 87-100.
- Cecchini, N. M., Roychoudhry, S., Speed, D. J., Steffes, K., Tambe, A., Zodrow, K., ... & Greenberg, J. T. (2019). Underground Azelaic Acid-Conferred Resistance to *Pseudomonas syringae* in *Arabidopsis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 32(1), 86-94.
- Chakraborty, U., Chakraborty, B., & Basnet, M. (2006). Plant growth promotion and induction of resistance in *Camellia sinensis* by *Bacillus megaterium*. *Journal of basic microbiology*, 46(3), 186-195.
- Chandler, S., Van Hese, N., Coutte, F., Jacques, P., Monica, H., & 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.
- Charlang, G., Ng, B., Horowitz, N. H., & Horowitz, R. M. (1981). Cellular and extracellular siderophores of *Aspergillus nidulans* and *Penicillium chrysogenum*. *Molecular and cellular biology*, 1(2), 94-100.
- Chattopadhyay, P., Banerjee, G., & Mukherjee, S. (2017). Recent trends of modern bacterial insecticides for pest control practice in integrated crop management system. 3 *Biotech*, 7(1), 60.
- Chen, X. H., Vater, J., Piel, J., Franke, P., Scholz, R., Schneider, K., ... & Borriss, R. (2006). Structural and functional characterization of three polyketide synthase gene clusters in *Bacillus amyloliquefaciens* FZB 42. *Journal of bacteriology*, 188(11), 4024-4036.
- 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(5), 425.
- Chen, Y., Yan, F., Chai, Y., Liu, H., Kolter, R., Losick, R., & Guo, J. H. (2013). Biocontrol of tomato wilt disease by *Bacillus subtilis* isolates from natural environments depends on conserved genes mediating biofilm formation. *Environmental microbiology*, 15(3), 848-864.
- Cheon, H. I., Yeo, M. S., Kim, K. M., Kang, J. S., & Pyo, J. (2019). Determination of Siderophore from *Bacillus Mojavensis* Using Liquid Chromatography quadrupole Time-of-flight Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Life Science*, 29(2), 198-201.
- Chhabra, S., Brazil, D., Morrissey, J., Burke, J. I., O'Gara, F., & N. Dowling, D. (2013). Characterization of mineral phosphate solubilization traits from a barley rhizosphere soil functional metagenome. *Microbiologyopen*, 2(5), 717-724.
- Chihaoui, S. A., Trabelsi, D., Jdey, A., Mhadhbi, H., & Mhamdi, R. (2015). Inoculation of *Phaseolus vulgaris* with the nodule-endophyte *Agrobacterium* sp. 10C2 affects richness and structure of rhizosphere bacterial communities and enhances nodulation and growth. *Archives of microbiology*, 197(6), 805-813.
- Chinnaswamy, A., Coba de la Peña, T., Stoll, A., de la Peña Rojo, D., Bravo, J., Rincón, A., ... & Pueyo, J. J. (2018). A nodule endophytic *Bacillus megaterium* strain isolated from *Medicago polymorpha* enhances growth, promotes nodulation by *Ensifer medicae* and alleviates salt stress in alfalfa plants. *Annals of Applied Biology*, 172(3), 295-308.
- Chitarra, G. S., Breeuwer, P., Nout, M. J. R., Van Aelst, A. C., Rombouts, F. M., & Abee, T. (2003). An antifungal compound produced by *Bacillus subtilis* YM 10-20 inhibits germination of *Penicillium roqueforti* conidiospores. *Journal of Applied Microbiology*, 94(2), 159-166.
- Cho, S. M., Kang, B. R., Han, S. H., Anderson, A. J., Park, J. Y., Lee, Y. H., ... & Kim, Y. C. (2008). 2R, 3R-butanediol, a bacterial volatile produced by *Pseudomonas chlororaphis* O6, is involved in induction of systemic tolerance to drought in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular plant-microbe interactions*, 21(8), 1067-1075.
- Cho, S. J., Lee, S. K., Cha, B. J., Kim, Y. H., & Shin, K. S. (2003). Detection and characterization of the *Gloeosporium gloeosporioides* growth inhibitory compound iturin A from *Bacillus subtilis* strain KS03. *FEMS Microbiology Letters*, 223(1), 47-51.
- Chowdhury, S. P., Uhl, J., Grosch, R., Alquéres, S., Pittroff, S., Dietel, K., ... & 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(9), 984-995.
- Chu, T. N., Bui, L. V., & Hoang, M. T. T. (2020). *Pseudomonas* PS01 Isolated from Maize Rhizosphere Alters Root System Architecture and Promotes Plant Growth. *Microorganisms*, 8(4), 471.

- Chun, J., Oren, A., Ventosa, A., Christensen, H., Arahal, D. R., da Costa, M. S., ... & Trujillo, M. E. (2018). Proposed minimal standards for the use of genome data for the taxonomy of prokaryotes. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 68(1), 461-466.
- Comby, M., Gacoin, M., Robineau, M., Rabenoelina, F., Ptas, S., Dupont, J., ... & Baillieul, F. (2017). Screening of wheat endophytes as biological control agents against Fusarium head blight using two different in vitro tests. *Microbiological research*, 202, 11-20.
- 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(5), 669-678.
- Compant, S., Reiter, B., Sessitsch, A., Nowak, J., Clément, C., & Barka, E. A. (2005). Endophytic colonization of *Vitis vinifera* L. by plant growth-promoting bacterium *Burkholderia* sp. strain PsJN. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(4), 1685-1693.
- 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.
- Conrath, U., Beckers, G. J., Langenbach, C. J., & Jaskiewicz, M. R. (2015). Priming for enhanced defense. *Annual review of phytopathology*, 53, 97-119.
- Costa, J. H., Wassano, C. I., Angolini, C. F. F., Scherlach, K., Hertweck, C., & Fill, T. P. (2019). Antifungal potential of secondary metabolites involved in the interaction between citrus pathogens. *Scientific reports*, 9(1), 1-11.
- Davies, P. J. (Ed.). (2004). *Plant hormones: biosynthesis, signal transduction, action!*. Springer Science & Business Media.
- De Bruijn, I., de Kock, M. J., Yang, M., de Waard, P., van Beek, T. A., & Raaijmakers, J. M. (2007). Genome-based discovery, structure prediction and functional analysis of cyclic lipopeptide antibiotics in *Pseudomonas* species. *Molecular microbiology*, 63(2), 417-428.
- De Bruijn, I., De Kock, M. J. D., De Waard, P., Van Beek, T. A., & Raaijmakers, J. M. (2008). Massetolide A biosynthesis in *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of bacteriology*, 190(8), 2777-2789.
- De Bruijn, I., & Raaijmakers, J. M. (2009). Regulation of cyclic lipopeptide biosynthesis in *Pseudomonas fluorescens* by the ClpP protease. *Journal of bacteriology*, 191(6), 1910-1923.
- de Garcia Salamone, I. E., Hynes, R. K., & Nelson, L. M. (2005). Role of cytokinins in plant growth promotion by rhizosphere bacteria. In *PGPR: biocontrol and biofertilization* (pp. 173-195). Springer, Dordrecht.
- de los Santos-Villalobos, S., Barrera-Galicia, G. C., Miranda-Salcedo, M. A., & Peña-Cabriales, J. J. (2012). *Burkholderiacepacia* XXVI siderophore with biocontrol capacity against *Colletotrichum gloeosporioides*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(8), 2615-2623.
- De Souza, R. S. C., Okura, V. K., Armanhi, J. S. L., Jorrín, B., Lozano, N., Da Silva, M. J., ... & Imperial, J. (2016). Unlocking the bacterial and fungal communities assemblages of sugarcane microbiome. *Scientific Reports*, 6, 28774.
- De Vleeschauwer, D., Djavaheri, M., Bakker, P. A., & Höfte, M. (2008). *Pseudomonas fluorescens* WCS374r-induced systemic resistance in rice against *Magnaporthe oryzae* is based on pseudobactin-mediated priming for a salicylic acid-repressible multifaceted defense response. *Plant physiology*, 148(4), 1996-2012.
- del Carmen Orozco-Mosqueda, M., & Santoyo, G. (2020). Plant-microbial endophytes interactions: scrutinizing their beneficial mechanisms from genomic explorations. *Current Plant Biology*, 100189.

- del Carmen Orozco-Mosqueda, M., del Carmen Rocha-Granados, M., Glick, B. R., & Santoyo, G. (2018). Microbiome engineering to improve biocontrol and plant growth-promoting mechanisms. *Microbiological research*, 208, 25-31.
- del Carmen Orozco-Mosqueda, M., Glick, B. R., & Santoyo, G. (2020). ACC deaminase in plant growth-promoting bacteria (PGPB): An efficient mechanism to counter salt stress in crops. *Microbiological Research*, 235, 126439.
- Deleu, M., Paquot, M., & Nylander, T. (2008). Effect of fengycin, a lipopeptide produced by *Bacillus subtilis*, on model biomembranes. *Biophysical journal*, 94(7), 2667-2679.
- Dhawi, F. (2016). Mycorrhiza, bacteria and plant an organized model of rhizosphere interaction. *International Journal of Scientific & Engineering Research*, 7, 61-77.
- Dienes, L. (1946). Reproductive processes in *Proteus* cultures. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 63(2), 265-270.
- 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(1), 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.
- Dimkpa, C., Weinand, T., & Asch, F. (2009). Plant–rhizobacteria interactions alleviate abiotic stress conditions. *Plant, cell & environment*, 32(12), 1682-1694.
- 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), 1-12.
- Dlamini, B., Rangarajan, V., & Clarke, K. G. (2020). A simple thin layer chromatography based method for the quantitative analysis of biosurfactant surfactin vis-a-vis the presence of lipid and protein impurities in the processing liquid. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 25, 101587.
- Dodds, P. N., & Rathjen, J. P. (2010). Plant immunity: towards an integrated view of plant–pathogen interactions. *Nature Reviews Genetics*, 11(8), 539-548.
- Droby, S., & Lichter, A. (2007). Post-harvest Botrytis infection: etiology, development and management. In *Botrytis: Biology, pathology and control* (pp. 349-367). Springer, Dordrecht.
- Droby, S., Wisniewski, M., Teixidó, N., Spadaro, D., & Jijakli, M. H. (2016). The science, development, and commercialization of postharvest biocontrol products. *Postharvest Biology and Technology*, 122, 22-29.
- Dubern, J. F., Coppoolse, E. R., Stiekema, W. J., & Bloemberg, G. V. (2008). Genetic and functional characterization of the gene cluster directing the biosynthesis of putisolvin I and II in *Pseudomonas putida* strain PCL1445. *Microbiology*, 154(7), 2070-2083.
- Duijff, B. J., De Kogel, W. J., Bakker, P. A. H. M., & Schippers, B. (1994). Influence of pseudobactin 358 on the iron nutrition of barley. *Soil Biology and Biochemistry*, 26(12), 1681-1688.
- Duitman, E. H., Hamoen, L. W., Rembold, M., Venema, G., Seitz, H., Saenger, W., ... & Vater, J. (1999). The mycosubtilin synthetase of *Bacillus subtilis* ATCC6633: a multifunctional hybrid between a peptide synthetase, an amino transferase, and a fatty acid synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(23), 13294-13299.
- Dukare, A. S., Paul, S., Nambi, V. E., Gupta, R. K., Singh, R., Sharma, K., & Vishwakarma, R. K. (2019). Exploitation of microbial antagonists for the control of postharvest diseases of fruits: a review. *Critical reviews in food science and nutrition*, 59(9), 1498-1513.

- Dunlap, C. A., Bowman, M. J., & Rooney, A. P. (2019). Iturinic lipopeptide diversity in the *Bacillus subtilis* species group—important antifungals for plant disease biocontrol applications. *Frontiers in microbiology*, 10, 1794.
- Durán, D., Bernal, P., Vazquez-Arias, D., Blanco-Romero, E., Garrido-Sanz, D., Redondo-Nieto, M., ... & Martín, M. (2021). *Pseudomonas fluorescens* F113 type VI secretion systems mediate bacterial killing and adaption to the rhizosphere microbiome. *Scientific Reports*, 11(1), 1-13.
- Egamberdieva, D., Jabborova, D., & Hashem, A. (2015). *Pseudomonas* induces salinity tolerance in cotton (*Gossypium hirsutum*) and resistance to *Fusarium* root rot through the modulation of indole-3-acetic acid. *Saudi journal of biological sciences*, 22(6), 773-779.
- El Ghaouth, A., Wilson, C., & Wisniewski, M. (2004). Biologically-based alternatives to synthetic fungicides for the control of postharvest diseases of fruit and vegetables. In *Diseases of Fruits and Vegetables: Volume II* (pp. 511-535). Springer, Dordrecht.
- Elad, Y., & Chet, I. (1987). Possible role of competition for nutrients in biocontrol of *Pythium* damping-off by bacteria. *Phytopathology*, 77(2), 190-195.
- Emami, S., Alikhani, H. A., Pourbabaei, A. A., Etesami, H., Sarmadian, F., & Motessharezadeh, B. (2019). Effect of rhizospheric and endophytic bacteria with multiple plant growth promoting traits on wheat growth. *Environmental Science and Pollution Research*, 26(19), 19804-19813.
- Eisendle, M., Oberegger, H., Zadra, I., & Haas, H. (2003). The siderophore system is essential for viability of *Aspergillus nidulans*: functional analysis of two genes encoding l-ornithine N 5-monooxygenase (*sidA*) and a non-ribosomal peptide synthetase (*sidC*). *Molecular microbiology*, 49(2), 359-375.
- Escobar, M. A., & Dandekar, A. M. (2003). *Agrobacterium tumefaciens* as an agent of disease. *Trends in plant science*, 8(8), 380-386.
- Etebarian, H. R., Sholberg, P. L., Eastwell, K. C., & Sayler, R. J. (2005). Biological control of apple blue mold with *Pseudomonas fluorescens*. *Canadian Journal of Microbiology*, 51(7), 591-598.
- Etesami, H., & Beattie, G. A. (2018). Mining halophytes for plant growth-promoting halotolerant bacteria to enhance the salinity tolerance of non-halophytic crops. *Frontiers in microbiology*, 9, 148.
- Fan, B., Blom, J., Klenk, H. P., & Borriss, R. (2017a). *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., 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., ... & Dorey, S. (2015). Cyclic lipopeptides from *Bacillus subtilis* activate distinct patterns of defence responses in grapevine. *Molecular plant pathology*, 16(2), 177-187.
- Farzand, A., Moosa, A., Zubair, M., Khan, A. R., Hanif, A., Tahir, H. A. S., & Gao, X. (2019). Marker assisted detection and LC-MS analysis of antimicrobial compounds in different *Bacillus* strains and their antifungal effect on *Sclerotinia sclerotiorum*. *Biological Control*, 133, 91-102.
- Fatouros, G., Gkizi, D., Fragkogeorgi, G. A., Paplomatas, E. J., & Tjamos, S. E. (2018). Biological control of *Pythium*, *Rhizoctonia* and *Sclerotinia* in lettuce: association of the plant protective activity of the bacterium *Paenibacillus alvei* K165 with the induction of systemic resistance. *Plant pathology*, 67(2), 418-425.

- Faustino, M. V., Pinto, D. C., Gonçalves, M. J., Salgueiro, L., Silveira, P., & Silva, A. M. (2018). Calendula L. species polyphenolic profile and in vitro antifungal activity. *Journal of Functional Foods*, 45, 254-267.
- Fernandes, P. A. V., Arruda, I. R. D., Santos, A. F. A. B. D., Araújo, A. A. D., Maior, A. M. S., & Ximenes, E. A. (2007). Antimicrobial activity of surfactants produced by *Bacillus subtilis* R14 against multidrug-resistant bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology*, 38(4), 704-709.
- Fgaier, H., & Eberl, H. J. (2011). Antagonistic control of microbial pathogens under iron limitations by siderophore producing bacteria in a chemostat setup. *Journal of theoretical biology*, 273(1), 103-114.
- 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.
- Flores-Vargas, R. D., & O'hara, G. W. (2006). Isolation and characterization of rhizosphere bacteria with potential for biological control of weeds in vineyards. *Journal of applied microbiology*, 100(5), 946-954.
- Forni, C., Duca, D., & Glick, B. R. (2017). Mechanisms of plant response to salt and drought stress and their alteration by rhizobacteria. *Plant and Soil*, 410(1-2), 335-356.
- Forti, C., Shankar, A., Singh, A., Balestrazzi, A., Prasad, V., & Macovei, A. (2020). Hydropriming and biopriming improve *Medicago truncatula* seed germination and upregulate DNA repair and antioxidant genes. *Genes*, 11(3), 242.
- Free, S. J. (2013). Fungal cell wall organization and biosynthesis. In *Advances in genetics* (Vol. 81, pp. 33-82). Academic Press.
- Fu, Z. Q., & Dong, X. (2013). Systemic acquired resistance: turning local infection into global defense. *Annual review of plant biology*, 64, 839-863.
- Fujita, M., Fujita, Y., Noutoshi, Y., Takahashi, F., Narusaka, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K., & Shinozaki, K. (2006). Crosstalk between abiotic and biotic stress responses: a current view from the points of convergence in the stress signaling networks. *Current opinion in plant biology*, 9(4), 436-442.
- Fukuda, T. T., Pereira, C. F., Melo, W. G., Menegatti, C., Andrade, P. H., Groppo, M., ... & Pupo, M. T. (2021). Insights Into the Ecological Role of *Pseudomonas* spp. in an Ant-plant Symbiosis. *Frontiers in microbiology*, 12, 74.
- 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., Zhang, B., Liu, H., Han, J., & Zhang, Y. (2017). Identification of endophytic *Bacillus velezensis* ZSY-1 strain and antifungal activity of its volatile compounds against *Alternaria solani* and *Botrytis cinerea*. *Biological control*, 105, 27-39.
- Geissler, M., Heravi, K. M., Henkel, M., & Hausmann, R. (2019). Lipopeptide biosurfactants from *Bacillus* species. In *Biobased surfactants* (pp. 205-240). AOCS Press.
- Gelmond, H. (1978). Problems in crop seed germination. *Crop physiology*, 1-78.
- Georgakopoulos, D. G., Fiddaman, P., Leifert, C., & Malathrakakis, N. E. (2002). Biological control of cucumber and sugar beet damping-off caused by *Pythium ultimum* with bacterial and fungal antagonists. *Journal of applied microbiology*, 92(6), 1078-1086.
- Gewolb, J. (2002). Working outside the protein-synthesis rules. *Science*, 295(5563), 2205-2207.
- Gibbs, K. A., & Greenberg, E. P. (2011). Territoriality in *Proteus*: advertisement and aggression. *Chemical reviews*, 111(1), 188-194.
- Gislason, A. S., & de Kievit, T. R. (2020). Friend or foe? Exploring the fine line between *Pseudomonas brassicacearum* and phytopathogens. *Journal of medical microbiology*, 69(3), 347-360.

- Glick, B. R. (2012). Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. *Scientifica*, 2012.
- Glick, B. R. (2014). Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. *Microbiological research*, 169(1), 30-39.
- Glick, B. R., Cheng, Z., Czarny, J., & Duan, J. (2007). Promotion of plant growth by ACC deaminase-producing soil bacteria. In *New perspectives and approaches in plant growth-promoting Rhizobacteria research* (pp. 329-339). Springer, Dordrecht.
- Glick, B. R., Penrose, D. M., & Li, J. (1998). A model for the lowering of plant ethylene concentrations by plant growth-promoting bacteria. *Journal of theoretical biology*, 190(1), 63-68.
- Gnanamanickam, S. S. (Ed.). (2006). *Plant-associated bacteria* (Vol. 1). Dordrecht: Springer.
- Gokturk, T., Tozlu, E., & Kotan, R. (2018). Prospects of Entomopathogenic Bacteria and Fungi for Biological Control of *Ricania simulans* (Walker 1851)(Hemiptera: Ricaniidae). *Pakistan Journal of Zoology*, 50(1).
- Gong, A. D., Li, H. P., Yuan, Q. S., Song, X. S., Yao, W., He, W. J., ... & Liao, Y. C. (2015). Antagonistic mechanism of iturin A and plipastatin A from *Bacillus amyloliquefaciens* S76-3 from wheat spikes against *Fusarium graminearum*. *PloS one*, 10(2), e0116871.
- Gopinath, S., Kumaran, K. S., & Sundararaman, M. (2015). A new initiative in micropropagation: airborne bacterial volatiles modulate organogenesis and antioxidant activity in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) callus. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 51(5), 514-523.
- Gravel, V., Antoun, H., & Tweddell, R. J. (2007). Growth stimulation and fruit yield improvement of greenhouse tomato plants by inoculation with *Pseudomonas putida* or *Trichoderma atroviride*: possible role of indole acetic acid (IAA). *Soil Biology and Biochemistry*, 39(8), 1968-1977.
- Greenshields, D. L., Liu, G., Feng, J. I. E., Selvaraj, G., & Wei, Y. (2007). The siderophore biosynthetic gene SID1, but not the ferroxidase gene FET3, is required for full *Fusarium graminearum* virulence. *Molecular plant pathology*, 8(4), 411-421.
- Gross, H., Stockwell, V. O., Henkels, M. D., Nowak-Thompson, B., Loper, J. E., & Gerwick, W. H. (2007). The genomisotopic approach: a systematic method to isolate products of orphan biosynthetic gene clusters. *Chemistry & biology*, 14(1), 53-63.
- Guenzi, E., Galli, G., Grgurina, I., Gross, D. C., & Grandi, G. (1998). Characterization of the syringomycin synthetase gene cluster: a link between prokaryotic and eukaryotic peptide synthetases. *Journal of Biological Chemistry*, 273(49), 32857-32863.
- Guerinot, M. L., & Yi, Y. (1994). Iron: nutritious, noxious, and not readily available. *Plant Physiology*, 104(3), 815.
- Guo, Q., Dong, W., Li, S., Lu, X., Wang, P., Zhang, X., ... & 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(7-8), 533-540.
- Gupta, G., Parihar, S. S., Ahirwar, N. K., Snehi, S. K., & Singh, V. (2015). Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): current and future prospects for development of sustainable agriculture. *J Microb Biochem Technol*, 7(2), 096-102.
- Gutiérrez-Mañero, F. J., Ramos-Solano, B., Probanza, A. N., Mehrouachi, J., R. Tadeo, F., & Talon, M. (2001). The plant-growth-promoting rhizobacteria *Bacillus pumilus* and *Bacillus licheniformis* produce high amounts of physiologically active gibberellins. *Physiologia Plantarum*, 111(2), 206-211.
- Haggag, W. M., & Timmusk, S. (2008). Colonization of peanut roots by biofilm-forming *Paenibacillus polymyxa* initiates biocontrol against crown rot disease. *Journal of applied microbiology*, 104(4), 961-969.

- Hallmann, J., & Berg, G. (2006). Spectrum and population dynamics of bacterial root endophytes. In *Microbial root endophytes* (pp. 15-31). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Han, Q. Q., Lü, X. P., Bai, J. P., Qiao, Y., Paré, P. W., Wang, S. M., ... & Wang, Z. L. (2014). Beneficial soil bacterium *Bacillus subtilis* (GB03) augments salt tolerance of white clover. *Frontiers in Plant Science*, 5, 525.
- Hanif, A., Zhang, F., Li, P., Li, C., Xu, Y., Zubair, M., ... & Gao, X. (2019). Fengycin produced by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 inhibits *Fusarium graminearum* growth and mycotoxins biosynthesis. *Toxins*, 11(5), 295.
- Hansen, D. B., Bumpus, S. B., Aron, Z. D., Kelleher, N. L., & Walsh, C. T. (2007). The loading module of mycosubtilin: an adenylation domain with fatty acid selectivity. *Journal of the American Chemical Society*, 129(20), 6366-6367.
- Hansen, N. C., Hopkins, B. G., Ellsworth, J. W., & Jolley, V. D. (2006). Iron nutrition in field crops. In *Iron nutrition in plants and rhizospheric microorganisms* (pp. 23-59). Springer, Dordrecht.
- Hao, H. T., Zhao, X., Shang, Q. H., Wang, Y., Guo, Z. H., Zhang, Y. B., ... & Wang, R. Y. (2016). Comparative digital gene expression analysis of the *Arabidopsis* response to volatiles emitted by *Bacillus amyloliquefaciens*. *PloS one*, 11(8), e0158621.
- Hardoim, P. R., Van Overbeek, L. S., Berg, G., Pirttilä, A. M., Compant, S., Campisano, A., ... & Sessitsch, A. (2015). The hidden world within plants: ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 79(3), 293-320.
- Hardoim, P. R. Van overbeek LS, Van elsas JD (2008). Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. *Trends Microbiol*, 16, 463-471.
- Hassani, M. A., Durán, P., & Hacquard, S. (2018). Microbial interactions within the plant holobiont. *Microbiome*, 6(1), 1-17.
- Hebert, T. T., & TT, H. (1982). The rational for the Horsfall-Barratt plant disease assessment scale.
- Heidarzadeh, N., & Baghaee-Ravari, S. (2015). Application of *Bacillus pumilus* as a potential biocontrol agent of *Fusarium* wilt of tomato. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 48(13-16), 841-849.
- Henry, G., Deleu, M., Jourdan, E., Thonart, P., & Ongena, M. (2011). The bacterial lipopeptide surfactin targets the lipid fraction of the plant plasma membrane to trigger immune-related defence responses. *Cellular microbiology*, 13(11), 1824-1837.
- Hepper, P. G. (1986). Kin recognition: functions and mechanisms a review. *Biological Reviews*, 61(1), 63-93.
- Hiradate, S., Yoshida, S., Sugie, H., Yada, H., & Fujii, Y. (2002). Mulberry anthracnose antagonists (iturins) produced by *Bacillus amyloliquefaciens* RC-2. *Phytochemistry*, 61(6), 693-698.
- Hider, R. C., & Kong, X. (2010). Chemistry and biology of siderophores. *Natural product reports*, 27(5), 637-657.
- Hiltner, L. (1904). Über nevere Erfahrungen und Probleme auf dem Gebiet der Boden Bakteriologie und unter besonderer Beurchsichtigung der Grundungung und Broche. *Arbeit. Deut. Landw. Ges. Berlin*, 98, 59-78.
- Horsfall, J. G. (1945). Fungicides and their action. *Fungicides and their action*.
- Horsfall, J. G., & Cowling, E. B. (1978). Pathometry: the measurement of plant disease. *Plant disease: an advanced treatise-how disease develops in populations*, 2.
- Hu, F., Liu, Y., & Li, S. (2019). Rational strain improvement for surfactin production: enhancing the yield and generating novel structures. *Microbial cell factories*, 18(1), 1-13.

- Hu, L. B., Shi, Z. Q., Zhang, T., & Yang, Z. M. (2007). Fengycin antibiotics isolated from B-FS01 culture inhibit the growth of *Fusarium moniliforme* Sheldon ATCC 38932. *FEMS microbiology letters*, 272(1), 91-98.
- Huang, C. J., Tsay, J. F., Chang, S. Y., Yang, H. P., Wu, W. S., & Chen, C. Y. (2012). Dimethyl disulfide is an induced systemic resistance elicitor produced by *Bacillus cereus* C1L. *Pest management science*, 68(9), 1306-1310.
- Idris, E. E., Iglesias, D. J., Talon, M., & Borriss, R. (2007). Tryptophan-dependent production of indole-3-acetic acid (IAA) affects level of plant growth promotion by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Molecular plant-microbe interactions*, 20(6), 619-626.
- Ikuma, K., Decho, A. W., & Lau, B. L. (2013). The extracellular bastions of bacteria—a biofilm way of life. *Nature Education Knowledge*, 4(2), 2-19.
- Im, S. M., Yu, N. H., Joen, H. W., Kim, S. O., Park, H. W., Park, A. R., & 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.
- Innerebner, G., Knief, C., & Vorholt, J. A. (2011). Protection of *Arabidopsis thaliana* against leaf-pathogenic *Pseudomonas syringae* by *Sphingomonas* strains in a controlled model system. *Applied and environmental microbiology*, 77(10), 3202-3210.
- Jadhav, H. P., Shaikh, S. S., & Sayyed, R. Z. (2017). Role of hydrolytic enzymes of rhizoflora in biocontrol of fungal phytopathogens: an overview. In *Rhizotrophs: Plant growth promotion to bioremediation* (pp. 183-203). Springer, Singapore.
- Jakob, K., Goss, E. M., Araki, H., Van, T., Kreitman, M., & Bergelson, J. (2002). *Pseudomonas viridiflava* and *P. syringae*—natural pathogens of *Arabidopsis thaliana*. *Molecular plant-microbe interactions*, 15(12), 1195-1203.
- James, E. K., Gyaneshwar, P., Mathan, N., Barraquio, W. L., Reddy, P. M., Iannetta, P. P., ... & Ladha, J. K. (2002). Infection and colonization of rice seedlings by the plant growth-promoting bacterium *Herbaspirillum seropedicae* Z67. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 15(9), 894-906.
- James, E. K., & Olivares, F. L. (1998). Infection and colonization of sugar cane and other graminaceous plants by endophytic diazotrophs. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 17(1), 77-119.
- Javvadi, S. G., Cescutti, P., Rizzo, R., Lonzarich, V., Navarini, L., Licastro, D., ... & Venturi, V. (2018). The spent culture supernatant of *Pseudomonas syringae* contains azelaic acid. *BMC microbiology*, 18(1), 1-11.
- 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(2), 637-650.
- Jia, K., Gao, Y. H., Huang, X. Q., Guo, R. J., & Li, S. D. (2015). Rhizosphere inhibition of cucumber fusarium wilt by different surfactin-excreting strains of *Bacillus subtilis*. *The plant pathology journal*, 31(2), 140.
- Jin, C. W., He, Y. F., Tang, C. X., Wu, P., & Zheng, S. J. (2006). Mechanisms of microbially enhanced Fe acquisition in red clover (*Trifolium pratense* L.). *Plant, cell & environment*, 29(5), 888-897.
- Joo, G. J., Kim, Y. M., Kim, J. T., Rhee, I. K., Kim, J. H., & Lee, I. J. (2005). Gibberellins-producing rhizobacteria increase endogenous gibberellins content and promote growth of red peppers. *Journal of Microbiology*, 43(6), 510-515.
- Jourdan, E., Henry, G., Duby, F., Dommès, J., Barthelemy, J. P., Thonart, P., & Ongena, M. A. R. C. (2009). Insights into the defense-related events occurring in plant cells following perception of surfactin-type lipopeptide from *Bacillus subtilis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 22(4), 456-468.

- Jung, H. W., Tschaplinski, T. J., Wang, L., Glazebrook, J., & Greenberg, J. T. (2009). Priming in systemic plant immunity. *Science*, 324(5923), 89-91.
- Kang, B. G., Kim, W. T., Yun, H. S., & Chang, S. C. (2010). Use of plant growth-promoting rhizobacteria to control stress responses of plant roots. *Plant Biotechnology Reports*, 4(3), 179-183.
- Kang, S. M., Joo, G. J., Hamayun, M., Na, C. I., Shin, D. H., Kim, H. Y., ... & Lee, I. J. (2009). Gibberellin production and phosphate solubilization by newly isolated strain of *Acinetobacter calcoaceticus* and its effect on plant growth. *Biotechnology letters*, 31(2), 277-281.
- Kannoja, P., Choudhary, K. K., Srivastava, A. K., & Singh, A. K. (2019). PGPR Bioelicitors: Induced Systemic Resistance (ISR) and Proteomic Perspective on Biocontrol. In *PGPR Amelioration in Sustainable Agriculture* (pp. 67-84). Woodhead Publishing.
- Karadeniz, A., Topcuoğlu, Ş. F., & Inan, S. (2006). Auxin, gibberellin, cytokinin and abscisic acid production in some bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22(10), 1061-1064.
- Karthikeyan, B., Joe, M. M., Islam, M. R., & Sa, T. (2012). ACC deaminase containing diazotrophic endophytic bacteria ameliorate salt stress in *Catharanthus roseus* through reduced ethylene levels and induction of antioxidative defense systems. *Symbiosis*, 56(2), 77-86.
- Kasim, W. A., Gaafar, R. M., Abou-Ali, R. M., Omar, M. N., & Hewait, H. M. (2016). Effect of biofilm forming plant growth promoting rhizobacteria on salinity tolerance in barley. *Annals of Agricultural Sciences*, 61(2), 217-227.
- Kearns, D. B. (2010). A field guide to bacterial swarming motility. *Nature Reviews Microbiology*, 8(9), 634-644.
- Kearns, D. B., & Losick, R. (2003). Swarming motility in undomesticated *Bacillus subtilis*. *Molecular microbiology*, 49(3), 581-590.
- Khalid, K. A., & Da Silva, J. T. (2012). Biology of *Calendula officinalis* Linn.: focus on pharmacology, biological activities and agronomic practices. *Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology*, 6(1), 12-27.
- Khan, M. H., & Panda, S. K. (2008). Alterations in root lipid peroxidation and antioxidative responses in two rice cultivars under NaCl-salinity stress. *Acta Physiologiae Plantarum*, 30(1), 81-89.
- Khan, M. S., Zaidi, A., & Wani, P. A. (2007). Role of phosphate-solubilizing microorganisms in sustainable agriculture—a review. *Agronomy for sustainable development*, 27(1), 29-43.
- Khan, A. L., Waqas, M., Kang, S. M., Al-Harrasi, A., Hussain, J., Al-Rawahi, A., ... & Lee, I. J. (2014). Bacterial endophyte *Sphingomonas* sp. LK11 produces gibberellins and IAA and promotes tomato plant growth. *Journal of Microbiology*, 52(8), 689-695.
- Khare, E., Mishra, J., & Arora, N. K. (2018). Multifaceted interactions between endophytes and plant: developments and prospects. *Frontiers in microbiology*, 9, 2732.
- Kim, J., & Rees, D. C. (1994). Nitrogenase and biological nitrogen fixation. *Biochemistry*, 33(2), 389-397.
- Kim, J. S., Lee, J., Lee, C. H., Woo, S. Y., Kang, H., Seo, S. G., & Kim, S. H. (2015). Activation of pathogenesis-related genes by the rhizobacterium, *Bacillus* sp. JS, which induces systemic resistance in tobacco plants. *The plant pathology journal*, 31(2), 195.
- Kim, K., Jang, Y. J., Lee, S. M., Oh, B. T., Chae, J. C., & Lee, K. J. (2014). Alleviation of salt stress by *Enterobacter* sp. EJ01 in tomato and *Arabidopsis* is accompanied by up-regulation of conserved salinity responsive factors in plants. *Molecules and cells*, 37(2), 109.
- Kim, K. S., Lee, S., & Ryu, C. M. (2013). Interspecific bacterial sensing through airborne signals modulates locomotion and drug resistance. *Nature communications*, 4(1), 1-12.

- Kim, K. J., Yang, Y. J., & Kim, J. G. (2003). Purification and characterization of chitinase from *Streptomyces* sp. M-20. *Journal of biochemistry and molecular biology*, 36(2), 185-189.
- Kim, Y. C., Jung, H., Kim, K. Y., & Park, S. K. (2008). An effective biocontrol bioformulation against *Phytophthora* blight of pepper using growth mixtures of combined chitinolytic bacteria under different field conditions. *European journal of plant pathology*, 120(4), 373-382.
- Kinosita, Y., Kikuchi, Y., Mikami, N., Nakane, D., & Nishizaka, T. (2018). Unforeseen swimming and gliding mode of an insect gut symbiont, *Burkholderia* sp. RPE64, with wrapping of the flagella around its cell body. *The ISME journal*, 12(3), 838-848.
- Kita, N., Ohya, T., Uekusa, H., Nomura, K., Manago, M., & Shoda, M. (2005). Biological control of damping-off of tomato seedlings and cucumber *Phomopsis* root rot by *Bacillus subtilis* RB14-C. *Japan Agricultural Research Quarterly: JARQ*, 39(2), 109-114.
- Koepfel, A., Perry, E. B., Sikorski, J., Krizanc, D., Warner, A., Ward, D. M., ... & Cohan, F. M. (2008). Identifying the fundamental units of bacterial diversity: a paradigm shift to incorporate ecology into bacterial systematics. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(7), 2504-2509.
- Kloepper, J. W., Reddy, M. S., Rodríguez-Kabana, R., Kenney, D. S., Kokalis-Burelle, N., Martínez-Ochoa, N., & Vavrina, C. S. (2004). Application for rhizobacteria in transplant production and yield enhancement. *Acta Horticulturae*, 217-230.
- Köhl, J., Kolnaar, R., & Ravensberg, W. J. (2019). Mode of action of microbial biological control agents against plant diseases: relevance beyond efficacy. *Frontiers in Plant Science*, 10, 845.
- Köhl, J., Medeiros, F. H., Lombaers-van der Plas, C., Groenenboom-de Haas, L., & van den Bosch, T. (2020). Efficacies of bacterial and fungal isolates in biocontrol of *Botrytis cinerea* and *Pseudomonas syringae* pv. tomato and growth promotion in tomato do not correlate. *Biological Control*, 150, 104375.
- 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), 1-12.
- Köhl, J., & Fokkema, N. J. (1998). Strategies for biological control of necrotrophic fungal foliar pathogens. *Plant microbe interactions and biological control*. Marcel Dekker, New York, 49-88.
- Konz, D., Doekel, S., & Marahiel, M. A. (1999). Molecular and biochemical characterization of the protein template controlling biosynthesis of the lipopeptide lichenysin. *Journal of Bacteriology*, 181(1), 133-140.
- Koo, H., & Yamada, K. M. (2016). Dynamic cell-matrix interactions modulate microbial biofilm and tissue 3D microenvironments. *Current opinion in cell biology*, 42, 102-112.
- Korenblum, E., Dong, Y., Szymanski, J., Panda, S., Jozwiak, A., Massalha, H., ... & Aharoni, A. (2020). Rhizosphere microbiome mediates systemic root metabolite exudation by root-to-root signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(7), 3874-3883.
- Koumoutsis, A., Chen, X. H., Henne, A., Liesegang, H., Hitzeroth, G., Franke, P., ... & Borriss, R. (2004). Structural and functional characterization of gene clusters directing nonribosomal synthesis of bioactive cyclic lipopeptides in *Bacillus amyloliquefaciens* strain FZB42. *Journal of bacteriology*, 186(4), 1084-1096.
- Kloepper, J. W., Leong, J., Teintze, M., & Schroth, M. N. (1980). Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria. *Nature*, 286(5776), 885-886.
- Kloepper, J. W., Tuzun, S., & Kuć, J. A. (1992). Proposed definitions related to induced disease resistance. *Biocontrol Science and Technology*, 2(4), 349-351.

- Kremmydas, G. F., Tampakaki, A. P., & Georgakopoulos, D. G. (2013). Characterization of the biocontrol activity of *Pseudomonas fluorescens* strain X reveals novel genes regulated by glucose. *PLoS One*, 8(4), e61808.
- Kröber, M., Verwaaijen, B., Wibberg, D., Winkler, A., Pühler, A., & Schlüter, A. (2016). Comparative transcriptome analysis of the biocontrol strain *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 as response to biofilm formation analyzed by RNA sequencing. *Journal of biotechnology*, 231, 212-223.
- Lastochkina, O., Seifikalhor, M., Aliniaiefard, S., Baymiev, A., Pusenkova, L., Garipova, S., ... & Maksimov, I. (2019). *Bacillus* spp.: efficient biotic strategy to control postharvest diseases of fruits and vegetables. *Plants*, 8(4), 97.
- Latgé, J. P. (2007). The cell wall: a carbohydrate armour for the fungal cell. *Molecular microbiology*, 66(2), 279-290.
- Le Mire, G., Siah, A., Brisset, M. N., Gaucher, M., Deleu, M., & Jijakli, M. H. (2018). Surfactin protects wheat against *Zymoseptoria tritici* and activates both salicylic acid-and jasmonic acid-dependent defense responses. *Agriculture*, 8(1), 11.
- Leclère, V., Marti, R., Béchet, M., Fickers, P., & Jacques, P. (2006). The lipopeptides mycosubtilin and surfactin enhance spreading of *Bacillus subtilis* strains by their surface-active properties. *Archives of microbiology*, 186(6), 475-483.
- Lee, B., Farag, M. A., Park, H. B., Kloepper, J. W., Lee, S. H., & Ryu, C. M. (2012). Induced resistance by a long-chain bacterial volatile: elicitation of plant systemic defense by a C13 volatile produced by *Paenibacillus polymyxa*. *PloS one*, 7(11), e48744.
- Levitz, S. M., & Diamond, R. D. (1985). A rapid colorimetric assay of fungal viability with the tetrazolium salt MTT. *Journal of Infectious Diseases*, 152(5), 938-945.
- 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, H., Han, X., Dong, Y., Xu, S., Chen, C., Feng, Y., ... & Li, W. (2021). Bacillaenes: Decomposition Trigger Point and Biofilm Enhancement in *Bacillus*. *ACS omega*, 6(2), 1093-1098.
- Li, Y., Zhao, M., Chen, W., Du, H., Xie, X., Wang, D., ... & Wang, G. (2020). Comparative transcriptomic analysis reveals that multiple hormone signal transduction and carbohydrate metabolic pathways are affected by *Bacillus cereus* in *Nicotiana tabacum*. *Genomics*, 112(6), 4254-4267.
- Lima, G., Arru, S., De Curtis, F., & Arras, G. (1999). Influence of antagonist, host fruit and pathogen on the biological control of postharvest fungal diseases by yeasts. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 23(3), 223-229.
- Lin, H. F., Chen, T. H., & Liu, S. D. (2010). Bioactivity of antifungal substance iturin A produced by *Bacillus subtilis* strain BS-99-H against *Pestalotiopsis eugeniae*, a causal pathogen of wax apple fruit rot. *Plant Pathology Bulletin*, 19(3), 225-233.
- Lin, Y., Watts, D. B., Kloepper, J. W., & Torbert, H. A. (2018). Influence of plant growth-promoting rhizobacteria on corn growth under different fertility sources. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 49(10), 1239-1255.
- Liu, H., Carvalhais, L. C., Crawford, M., Singh, E., Dennis, P. G., Pieterse, C. M., & Schenk, P. M. (2017). Inner plant values: diversity, colonization and benefits from endophytic bacteria. *Frontiers in microbiology*, 8, 2552.
- Liu, K., Newman, M., McInroy, J. A., Hu, C. H., & Kloepper, J. W. (2017). Selection and assessment of plant growth-promoting rhizobacteria for biological control of multiple plant diseases. *Phytopathology*, 107(8), 928-936.

- Liu, Q., Lin, J., Wang, W., Huang, H., & Li, S. (2015). Production of surfactin isoforms by *Bacillus subtilis* BS-37 and its applicability to enhanced oil recovery under laboratory conditions. *Biochemical engineering journal*, 93, 31-37.
- Liu, Y., Teng, K., Wang, T., Dong, E., Zhang, M., Tao, Y., & Zhong, J. (2020). Antimicrobial *Bacillus velezensis* HC6: production of three kinds of lipopeptides and biocontrol potential in maize. *Journal of Applied Microbiology*, 128(1), 242-254.
- Liu, X., Luo, Y., Li, Z., Wang, J., & Wei, G. (2017). Role of exopolysaccharide in salt stress resistance and cell motility of *Mesorhizobium alhagi* CCNWXJ12-2 T. *Applied microbiology and biotechnology*, 101(7), 2967-2978.
- Lugtenberg, B., & Kamilova, F. (2009). Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annual review of microbiology*, 63, 541-556.
- Luo, C., Zhou, H., Zou, J., Wang, X., Zhang, R., Xiang, Y., & Chen, Z. (2015). 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(4), 1897-1910.
- Lyons, N. A., & Kolter, R. (2017). *Bacillus subtilis* protects public goods by extending kin discrimination to closely related species. *MBio*, 8(4).
- Lyons, N. A., Kraigher, B., Stefanic, P., Mandic-Mulec, I., & Kolter, R. (2016). A combinatorial kin discrimination system in *Bacillus subtilis*. *Current Biology*, 26(6), 733-742.
- Loper, J. E., & Buyer, J. S. (1991). Siderophores in microbial interactions on plant surfaces. *Mol. Plant-Microbe Interact*, 4(1), 5-13.
- Loper, J. E., & Schroth, M. N. (1986). Influence of bacterial sources of indole-3-acetic acid on root elongation of sugar beet. *Phytopathology*, 76(4), 386-389.
- Lloyd, A. J., William Allwood, J., Winder, C. L., Dunn, W. B., Heald, J. K., Cristescu, S. M., ... & Mur, L. A. (2011). Metabolomic approaches reveal that cell wall modifications play a major role in ethylene-mediated resistance against *Botrytis cinerea*. *The Plant Journal*, 67(5), 852-868.
- Luo, C., Zhou, H., Zou, J., Wang, X., Zhang, R., Xiang, Y., & Chen, Z. (2015). 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(4), 1897-1910.
- Ma, J. F. (2005). Plant root responses to three abundant soil minerals: silicon, aluminum and iron. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 24(4), 267-281.
- Ma, Z., Hua, G. K. H., Ongena, M., & Höfte, M. (2016). Role of phenazines and cyclic lipopeptides produced by *Pseudomonas* sp. CMR12a in induced systemic resistance on rice and bean. *Environmental microbiology reports*, 8(5), 896-904.
- Ma, Z., Ongena, M., & Höfte, M. (2017). The cyclic lipopeptide orfamide induces systemic resistance in rice to *Cochliobolus miyabeanus* but not to *Magnaporthe oryzae*. *Plant cell reports*, 36(11), 1731-1746.
- Maget-Dana, R., & Ptak, M. (1995). Interactions of surfactin with membrane models. *Biophysical Journal*, 68(5), 1937-1943.
- Malek Mohammadi, A., Ebrahimi, A., Mahzonieh, M. R., & Lotfalian, S. (2016). Antibacterial Activities of Bacterial Endophytes Isolated From *Zataria multiflora*, *Achillea willhelmsii* and *Calendula officinalis* L. Against Some Human Nosocomial Pathogens. *Zahedan Journal of Research in Medical Sciences*, 18(9).
- Mahmood, S., Daur, I., Al-Solaimani, S. G., Ahmad, S., Madkour, M. H., Yasir, M., ... & Ali, Z. (2016). Plant growth promoting rhizobacteria and silicon synergistically enhance salinity tolerance of mung bean. *Frontiers in Plant Science*, 7, 876.

- Manoel da Silva, J., Carvalho dos Santos, T. M., Santos de Albuquerque, L., Coentro Montaldo, Y., Ubaldo Lima de Oliveira, J., Mesquita da Silva, S. G., ... & da Rocha Oliveira Teixeira, R. (2015). Potential of the endophytic bacteria ('Herbaspirillum'spp. and 'Bacillus' spp.) to promote sugarcane growth. *Australian Journal of Crop Science*, 9(8), 754.
- Marquez-Santacruz, H. A., Hernandez-Leon, R., Orozco-Mosqueda, M. D. C., Velazquez-Sepulveda, I., & Santoyo, G. (2010). Diversity of bacterial endophytes in roots of Mexican husk tomato plants (*Physalis ixocarpa*) and their detection in the rhizosphere. *Genetics and Molecular Research*, 9(4), 2372-2380.
- Massoni, J., Bortfeld-Miller, M., Jardillier, L., Salazar, G., Sunagawa, S., & Vorholt, J. A. (2020). Consistent host and organ occupancy of phyllosphere bacteria in a community of wild herbaceous plant species. *The ISME journal*, 14(1), 245-258.
- Matsui, K. (2016). A portion of plant airborne communication is endorsed by uptake and metabolism of volatile organic compounds. *Current opinion in plant biology*, 32, 24-30.
- McDevitt, S., 2009. Methyl Red and Voges-Proskauer Test Protocols. <http://www.asmscience.org/content/education/protocol/protocol.3204> (Accessed 18 September 2017).
- McQuilken, M. P., Halmer, P., & Rhodes, D. J. (1998). Application of microorganisms to seeds. In *Formulation of microbial biopesticides* (pp. 255-285). Springer, Dordrecht.
- Meier-Kolthoff, J. P., Auch, A. F., Klenk, H. P., & Göker, M. (2013). Genome sequence-based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions. *BMC bioinformatics*, 14(1), 1-14.
- Medeot, D. B., Fernandez, M., Morales, G. M., & 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.
- Meier, R., & Charvat, I. (1993). Reassessment of tetrazolium bromide as a viability stain for spores of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *American Journal of Botany*, 80(9), 1007-1015.
- Meldau, D. G., Meldau, S., Hoang, L. H., Underberg, S., Wünsche, H., & Baldwin, I. T. (2013). Dimethyl disulfide produced by the naturally associated bacterium *Bacillus* sp B55 promotes *Nicotiana attenuata* growth by enhancing sulfur nutrition. *The Plant Cell*, 25(7), 2731-2747.
- Mercier, J., & Wilson, C. L. (1995). Effect of wound moisture on the biocontrol by *Candida oleophila* of gray mold rot (*Botrytis cinerea*) of apple. *Postharvest Biology and Technology*, 6(1-2), 9-15.
- Merzaeva, O. V., & Shirokikh, I. G. (2010). The production of auxins by the endophytic bacteria of winter rye. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 46(1), 44-50.
- Meziane, H., Van Der Sluis, I., Van Loon, L. C., Höfte, M., & Bakker, P. A. (2005). Determinants of *Pseudomonas putida* WCS358 involved in inducing systemic resistance in plants. *Molecular Plant Pathology*, 6(2), 177-185.
- Mille-Lindblom, C., Fischer, H., & J. Tranvik, L. (2006). Antagonism between bacteria and fungi: substrate competition and a possible tradeoff between fungal growth and tolerance towards bacteria. *Oikos*, 113(2), 233-242.
- Milus, E. A., & Rothrock, C. S. (1993). Rhizosphere colonization of wheat by selected soil bacteria over diverse environments. *Canadian journal of microbiology*, 39(3), 335-341.
- Mishra, P. K., Bisht, S. C., Ruwari, P., Joshi, G. K., Singh, G., Bisht, J. K., & Bhatt, J. C. (2011). Bioassociative effect of cold tolerant *Pseudomonas* spp. and *Rhizobium leguminosarum*-PR1 on iron acquisition, nutrient uptake and growth of lentil (*Lens culinaris* L.). *European Journal of Soil Biology*, 47(1), 35-43.

- Mhlongo, M. I., Piater, L. A., Madala, N. E., Labuschagne, N., & Dubery, I. A. (2018). The chemistry of plant-microbe interactions in the rhizosphere and the potential for metabolomics to reveal signaling related to defense priming and induced systemic resistance. *Frontiers in plant science*, 9, 112.
- Moeinzadeh, A., Sharif-Zadeh, F., Ahmadzadeh, M., & Tajabadi, F. (2010). Biopriming of Sunflower ('*Helianthus annuus*' L.) Seed with '*Pseudomonas fluorescens*' for Improvement of Seed Invigoration and Seedling Growth. *Australian Journal of Crop Science*, 4(7), 564-570.
- Mohamad, O. A., Li, L., Ma, J. B., Hatab, S., Xu, L., Guo, J. W., ... & Li, W. J. (2018). Evaluation of the antimicrobial activity of endophytic bacterial populations from Chinese traditional medicinal plant licorice and characterization of the bioactive secondary metabolites produced by *Bacillus atrophaeus* against *Verticillium dahliae*. *Frontiers in microbiology*, 9, 924.
- Mohammadipour, M., Mousivand, M., Salehi Jouzani, G., & Abbasalizadeh, S. (2009). Molecular and biochemical characterization of Iranian surfactin-producing *Bacillus subtilis* isolates and evaluation of their biocontrol potential against *Aspergillus flavus* and *Colletotrichum gloeosporioides*. *Canadian Journal of Microbiology*, 55(4), 395-404.
- Mohite, B. (2013). Isolation and characterization of indole acetic acid (IAA) producing bacteria from rhizospheric soil and its effect on plant growth. *Journal of soil science and plant nutrition*, 13(3), 638-649.
- Moldenhauer, J., Götz, D. C., Albert, C. R., Bischof, S. K., Schneider, K., Süssmuth, R. D., ... & Piel, J. (2010). The final steps of bacillaene biosynthesis in *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42: direct evidence for β , γ dehydration by a trans-acyltransferase polyketide synthase. *Angewandte Chemie International Edition*, 49(8), 1465-1467.
- Molina-Santiago, C., Pearson, J. R., Navarro, Y., Berlanga-Clavero, M. V., Caraballo-Rodríguez, A. M., Petras, D., ... & Romero, D. (2019). The extracellular matrix protects *Bacillus subtilis* colonies from *Pseudomonas* invasion and modulates plant co-colonization. *Nature communications*, 10(1), 1-15.
- Monnier, N., Furlan, A., Botcazon, C., Dahi, A., Mongelard, G., Cordelier, S., ... & Rippa, S. (2018). Rhamnolipids from *Pseudomonas aeruginosa* are elicitors triggering *Brassica napus* protection against *Botrytis cinerea* without physiological disorders. *Frontiers in plant science*, 9, 1170.
- Moore, E. D. W. A. R. D., Arnscheidt, A. N. G. E. L. I. K. A., Krüger, A., Strömpl, C., & Mau, M. (1999). Simplified protocols for the preparation of genomic DNA from bacterial cultures. *Molecular microbial ecology manual*, 1(1), 1-15.
- 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(5), e0127738.
- Morales-Cedeño, L. R., del Carmen Orozco-Mosqueda, M., Loeza-Lara, P. D., Parra-Cota, F. I., de Los Santos-Villalobos, S., & Santoyo, G. (2020). Plant growth-promoting bacterial endophytes as biocontrol agents of pre-and post-harvest diseases: Fundamentals, methods of application and future perspectives. *Microbiological Research*, 126612.
- Morikawa, M. (2006). Beneficial biofilm formation by industrial bacteria *Bacillus subtilis* and related species. *Journal of bioscience and bioengineering*, 101(1), 1-8.
- Morikawa, M., Daido, H., Takao, T., Murata, S., Shimonishi, Y., & Imanaka, T. (1993). A new lipopeptide biosurfactant produced by *Arthrobacter* sp. strain MIS38. *Journal of bacteriology*, 175(20), 6459-6466.
- Mousa, W. K., Shearer, C. R., Limay-Rios, V., Zhou, T., & Raizada, M. N. (2015). Bacterial endophytes from wild maize suppress *Fusarium graminearum* in modern maize and inhibit mycotoxin accumulation. *Frontiers in plant science*, 6, 805.

- Moyne, A. L., Cleveland, T. E., & Tuzun, S. (2004). Molecular characterization and analysis of the operon encoding the antifungal lipopeptide bacillomycin D. *FEMS Microbiology Letters*, 234(1), 43-49.
- Mulligan, C. N., Sharma, S. K., & Mudhoo, A. (Eds.). (2014). *Biosurfactants: research trends and applications*. CRC press.
- Munns, R. (2005). Genes and salt tolerance: bringing them together. *New phytologist*, 167(3), 645-663.
- Mus, F., Crook, M. B., Garcia, K., Costas, A. G., Geddes, B. A., Kouri, E. D., ... & Peters, J. W. (2016). Symbiotic nitrogen fixation and the challenges to its extension to nonlegumes. *Applied and environmental microbiology*, 82(13), 3698-3710.
- Nadeem, S. M., Zahir, Z. A., Naveed, M., & Arshad, M. (2007). Preliminary investigations on inducing salt tolerance in maize through inoculation with rhizobacteria containing ACC deaminase activity. *Canadian Journal of Microbiology*, 53(10), 1141-1149.
- Nam, H. S., Yang, H. J., Oh, B. J., Anderson, A. J., & Kim, Y. C. (2016). Biological control potential of *Bacillus amyloliquefaciens* KB3 isolated from the feces of *Allomyrina dichotoma* larvae. *The plant pathology journal*, 32(3), 273.
- Nannan, C., Vu, H. Q., Gillis, A., Caulier, S., Nguyen, T. T. T., & Mahillon, J. (2020). Bacilysin within the *Bacillus subtilis* group: Gene prevalence versus antagonistic activity against gram-negative foodborne pathogens. *Journal of Biotechnology*.
- Nascimento, F. X., Rossi, M. J., & Glick, B. R. (2018). Ethylene and 1-Aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) in plant-bacterial interactions. *Frontiers in plant science*, 9, 114.
- Nasopoulou, C., Pohjanen, J., Koskimäki, J. J., Zabetakis, I., & Pirttilä, A. M. (2014). Localization of strawberry (*Fragaria x ananassa*) and *Methylobacterium extorquens* genes of strawberry flavor biosynthesis in strawberry tissue by in situ hybridization. *Journal of plant physiology*, 171(13), 1099-1105.
- Naveed, M., Qureshi, M. A., Zahir, Z. A., Hussain, M. B., Sessitsch, A., & Mitter, B. (2015). L-Tryptophan-dependent biosynthesis of indole-3-acetic acid (IAA) improves plant growth and colonization of maize by *Burkholderia phytofirmans* PsJN. *Annals of microbiology*, 65(3), 1381-1389.
- Neilands, J. B. (1981). Iron absorption and transport in microorganisms. *Annual review of nutrition*, 1(1), 27-46.
- Newman, M. A., Sundelin, T., Nielsen, J. T., & Erbs, G. (2013). MAMP (microbe-associated molecular pattern) triggered immunity in plants. *Frontiers in plant science*, 4, 139.
- Nie, P., Li, X., Wang, S., Guo, J., Zhao, H., & Niu, D. (2017). Induced systemic resistance against *Botrytis cinerea* by *Bacillus cereus* AR156 through a JA/ET-and NPR1-dependent signaling pathway and activates PAMP-triggered immunity in *Arabidopsis*. *Frontiers in plant science*, 8, 238.
- Nielsen, T. H., Nybroe, O., Koch, B., Hansen, M., & Sørensen, J. (2005). Genes involved in cyclic lipopeptide production are important for seed and straw colonization by *Pseudomonas* sp. strain DSS73. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(7), 4112-4116.
- Nizyński, B., Alsoufi, A. S. M., Pączkowski, C., Długosz, M., & Szakiel, A. (2015). The content of free and esterified triterpenoids of the native marigold (*Calendula officinalis*) plant and its modifications in in vitro cultures. *Phytochemistry Letters*, 11, 410-417.
- Nunes, C. A. (2012). Biological control of postharvest diseases of fruit. *European Journal of Plant Pathology*, 133(1), 181-196.
- Nutter, F. W., & Esker, P. D. (2006). The role of psychophysics in phytopathology: The Weber-Fechner law revisited. *European Journal of Plant Pathology*, 114(2), 199-213.
- Oide, S., Moeder, W., Krasnoff, S., Gibson, D., Haas, H., Yoshioka, K., & Turgeon, B. G. (2006). NPS6, encoding a nonribosomal peptide synthetase involved in siderophore-

- mediated iron metabolism, is a conserved virulence determinant of plant pathogenic ascomycetes. *The Plant Cell*, 18(10), 2836-2853.
- Ongena, M., & Jacques, P. (2008). Bacillus lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends in microbiology*, 16(3), 115-125.
- Ongena, M., Jourdan, E., Adam, A., Paquot, M., Brans, A., Joris, B., ... & Thonart, P. (2007). Surfactin and fengycin lipopeptides of Bacillus subtilis as elicitors of induced systemic resistance in plants. *Environmental microbiology*, 9(4), 1084-1090.
- Oni, F. E., Geudens, N., Adiobo, A., Omoboye, O. O., Enow, E. A., Onyeka, J. T., ... & Höfte, M. (2020). Biosynthesis and antimicrobial activity of pseudodesmin and viscosinamide cyclic lipopeptides produced by pseudomonads associated with the cocoyam rhizosphere. *Microorganisms*, 8(7), 1079.
- Ordentlich, A., Elad, Y., & Chet, I. (1988). The role of chitinase of Serratia marcescens in biocontrol of Sclerotium rolfsii. *Phytopathology*, 78(1), 84-88.
- Ortíz-Castro, R., Contreras-Cornejo, H. A., Macías-Rodríguez, L., & López-Bucio, J. (2009). The role of microbial signals in plant growth and development. *Plant signaling & behavior*, 4(8), 701-712.
- Otieno, N., Lally, R. D., Kiwanuka, S., Lloyd, A., Ryan, D., Germaine, K. J., & Dowling, D. N. (2015). Plant growth promotion induced by phosphate solubilizing endophytic Pseudomonas isolates. *Frontiers in microbiology*, 6, 745.
- O'Toole, G. A. (2011). Microtiter dish biofilm formation assay. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (47), e2437.
- Palacio-Rodríguez, R., Coria-Arellano, J. L., López-Bucio, J., Sánchez-Salas, J., Muro-Pérez, G., Castañeda-Gaytán, G., & Sáenz-Mata, J. (2017). Halophilic rhizobacteria from Distichlis spicata promote growth and improve salt tolerance in heterologous plant hosts. *Symbiosis*, 73(3), 179-189.
- Palmer, J., Flint, S., & Brooks, J. (2007). Bacterial cell attachment, the beginning of a biofilm. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 34(9), 577-588.
- Pandit, A., Adholeya, A., Cahill, D., Brau, L., & Kochar, M. (2020). Microbial biofilms in nature: unlocking their potential for agricultural applications. *Journal of applied microbiology*, 129(2), 199-211.
- 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.
- Park, K., Park, Y. S., Ahamed, J., Dutta, S., Ryu, H., Lee, S. H., ... & 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(4), 564-570.
- Parker, J. B., & Walsh, C. T. (2013). Action and timing of BacC and BacD in the late stages of biosynthesis of the dipeptide antibiotic bacilysin. *Biochemistry*, 52(5), 889-901.
- Patel, H., Tscheka, C., Edwards, K., Karlsson, G., & Heerklotz, H. (2011). All-or-none membrane permeabilization by fengycin-type lipopeptides from Bacillus subtilis QST713. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1808(8), 2000-2008.
- Patel, P. S., HuANG, S., Fisher, S., Pirnik, D., Aklonis, C., Dean, L., ... & Mayerl, F. (1995). Bacillaene, a novel inhibitor of procaryotic protein synthesis produced by Bacillus subtilis: production, taxonomy, isolation, physico-chemical characterization and biological activity. *The Journal of antibiotics*, 48(9), 997-1003.
- Patten, C. L., & Glick, B. R. (2002). Role of Pseudomonas putida indoleacetic acid in development of the host plant root system. *Applied and environmental microbiology*, 68(8), 3795-3801.

- Pérez-García, A., Romero, D., & De Vicente, A. (2011). Plant protection and growth stimulation by microorganisms: biotechnological applications of Bacilli in agriculture. *Current opinion in biotechnology*, 22(2), 187-193.
- Pérez-Montaño, F., Alías-Villegas, C., Bellogín, R. A., Del Cerro, P., Espuny, M. R., Jiménez-Guerrero, I., ... & Cubo, T. (2014). Plant growth promotion in cereal and leguminous agricultural important plants: from microorganism capacities to crop production. *Microbiological research*, 169(5-6), 325-336.
- Perez, M. F., Ibarreche, J. P., Isas, A. S., Sepulveda, M., Ramallo, J., & Dib, J. R. (2017). Antagonistic yeasts for the biological control of *Penicillium digitatum* on lemons stored under export conditions. *Biological Control*, 115, 135-140.
- Pereira, S. I. A., Monteiro, C., Vega, A. L., & Castro, P. M. (2016). Endophytic culturable bacteria colonizing *Lavandula dentata* L. plants: isolation, characterization and evaluation of their plant growth-promoting activities. *Ecological Engineering*, 87, 91-97.
- 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(2), 190-198.
- Persello-Cartieaux, F., Nussaume, L., & Robaglia, C. (2003). Tales from the underground: molecular plant-rhizobacteria interactions. *Plant, Cell & Environment*, 26(2), 189-199.
- Petrini, O. (1991). Microbial Ecology of Leaves, eds Andrews JH, Hirano SS.
- 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(2), 323-327.
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research*, 29(9), e45-e45.
- Pieterse, C. M., Zamioudis, C., Berendsen, R. L., Weller, D. M., Van Wees, S. C., & Bakker, P. A. (2014). Induced systemic resistance by beneficial microbes. *Annual review of phytopathology*, 52.
- Pikovskaya, R. I. (1948). Mobilization of phosphorus in soil in connection with vital activity of some microbial species. *Mikrobiologiya*, 17, 362-370.
- Pinedo, I., Ledger, T., Greve, M., & Poupin, M. J. (2015). Burkholderia phytofirmans PsJN induces long-term metabolic and transcriptional changes involved in *Arabidopsis thaliana* salt tolerance. *Frontiers in plant science*, 6, 466.
- Pliego, C., De Weert, S., Lamers, G., De Vicente, A., Bloemberg, G., Cazorla, F. M., & 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(12), 3295-3304.
- Pliego, C., Ramos, C., de Vicente, A., & Cazorla, F. M. (2011). Screening for candidate bacterial biocontrol agents against soilborne fungal plant pathogens. *Plant and soil*, 340(1), 505-520.
- Poole, P. (2017). Shining a light on the dark world of plant root-microbe interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(17), 4281-4283.
- Poppe, L., Vanhoutte, S., & Höfte, M. (2003). Modes of action of *Pantoea agglomerans* CPA-2, an antagonist of postharvest pathogens on fruits. *European Journal of Plant Pathology*, 109(9), 963-973.
- Porter, S. L., Wadhams, G. H., & Armitage, J. P. (2011). Signal processing in complex chemotaxis pathways. *Nature Reviews Microbiology*, 9(3), 153-165.
- Prabhu, N., Borkar, S., & Garg, S. (2019). Phosphate solubilization by microorganisms: overview, mechanisms, applications and advances. In *Advances in Biological Science Research* (pp. 161-176). Academic Press.

- Pršić, J., & Ongena, M. (2020). Elicitors of plant immunity triggered by beneficial bacteria. *Frontiers in Plant Science*, 11.
- Qin, S., Zhang, Y. J., Yuan, B., Xu, P. Y., Xing, K., Wang, J., & Jiang, J. H. (2014). Isolation of ACC deaminase-producing habitat-adapted symbiotic bacteria associated with halophyte *Limonium sinense* (Girard) Kuntze and evaluating their plant growth-promoting activity under salt stress. *Plant and soil*, 374(1), 753-766.
- Qin, Y., Druzhinina, I. S., Pan, X., & Yuan, Z. (2016). Microbially mediated plant salt tolerance and microbiome-based solutions for saline agriculture. *Biotechnology Advances*, 34(7), 1245-1259.
- Raaijmakers, J. M., & Mazzola, M. (2012). Diversity and natural functions of antibiotics produced by beneficial and plant pathogenic bacteria. *Annual review of phytopathology*, 50, 403-424.
- Raaijmakers, J. M., De Bruijn, I., & de Kock, M. J. (2006). Cyclic lipopeptide production by plant-associated *Pseudomonas* spp.: diversity, activity, biosynthesis, and regulation. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 19(7), 699-710.
- Raaijmakers, J. M., 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(6), 1037-1062.
- Ramakers, C., Ruijter, J. M., Deprez, R. H. L., & Moorman, A. F. (2003). Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neuroscience letters*, 339(1), 62-66.
- Ramesh, R., & Phadke, G. S. (2012). Rhizosphere and endophytic bacteria for the suppression of eggplant wilt caused by *Ralstonia solanacearum*. *Crop Protection*, 37, 35-41.
- Rath, M., Mitchell, T. R., & Gold, S. E. (2018). Volatiles produced by *Bacillus mojavensis* RRC101 act as plant growth modulators and are strongly culture-dependent. *Microbiological research*, 208, 76-84.
- Raymaekers, K., Ponet, L., Holtappels, D., Berckmans, B., & Cammue, B. P. (2020). Screening for novel biocontrol agents applicable in plant disease management—a review. *Biological Control*, 144, 104240.
- Raza, W., Ling, N., Yang, L., Huang, Q., & Shen, Q. (2016). Response of tomato wilt pathogen *Ralstonia solanacearum* to the volatile organic compounds produced by a biocontrol strain *Bacillus amyloliquefaciens* SQR-9. *Scientific reports*, 6(1), 1-13.
- Richter, M., & Rosselló-Móra, R. (2009). Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(45), 19126-19131.
- Rivardo, F., Turner, R. J., Allegrone, G., Ceri, H., & Martinotti, M. G. (2009). Anti-adhesion activity of two biosurfactants produced by *Bacillus* spp. prevents biofilm formation of human bacterial pathogens. *Applied microbiology and biotechnology*, 83(3), 541-553.
- Roberts, W. K., & Selitrennikoff, C. P. (1988). Plant and bacterial chitinases differ in antifungal activity. *Microbiology*, 134(1), 169-176.
- Rodriguez, H., Gonzalez, T., Goire, I., & Bashan, Y. (2004). Gluconic acid production and phosphate solubilization by the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* spp. *Naturwissenschaften*, 91(11), 552-555.
- Rodríguez, H., & Fraga, R. (1999). Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology advances*, 17(4-5), 319-339.
- Rodríguez, J., Tonelli, M. L., Figueredo, M. S., 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(3), 845-851.

- Rodriguez, P. A., Rothballer, M., Chowdhury, S. P., Nussbaumer, T., Gutjahr, C., & Falter-Braun, P. (2019). Systems biology of plant-microbiome interactions. *Molecular plant*, 12(6), 804-821.
- Rojas-Solís, D., Zetter-Salmón, E., Contreras-Pérez, M., del Carmen Rocha-Granados, M., Macías-Rodríguez, L., & Santoyo, G. (2018). *Pseudomonas stutzeri* E25 and *Stenotrophomonas maltophilia* CR71 endophytes produce antifungal volatile organic compounds and exhibit additive plant growth-promoting effects. *Biocatalysis and agricultural biotechnology*, 13, 46-52.
- Romero, D., de Vicente, A., Rakotoaly, R. H., Dufour, S. E., Veening, J. W., Arrebola, E., ... & Pérez-García, A. (2007). The iturin and fengycin families of lipopeptides are key factors in antagonism of *Bacillus subtilis* toward *Podospheera fusca*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 20(4), 430-440.
- Roongsawang, N., Hase, K. I., Haruki, M., Imanaka, T., Morikawa, M., & Kanaya, S. (2003). Cloning and characterization of the gene cluster encoding arthrofactin synthetase from *Pseudomonas* sp. MIS38. *Chemistry & biology*, 10(9), 869-880.
- Roongsawang, N., Lim, S. P., Washio, K., Takano, K., Kanaya, S., & Morikawa, M. (2005). Phylogenetic analysis of condensation domains in the nonribosomal peptide synthetases. *FEMS microbiology letters*, 252(1), 143-151.
- Roongsawang, N., Washio, K., & Morikawa, M. (2011). Diversity of nonribosomal peptide synthetases involved in the biosynthesis of lipopeptide biosurfactants. *International journal of molecular sciences*, 12(1), 141-172.
- Rosenblueth, M., & Martínez-Romero, E. (2006). Bacterial endophytes and their interactions with hosts. *Molecular plant-microbe interactions*, 19(8), 827-837.
- Roslan, M. A. M., Zulkifli, N. N., Sobri, Z. M., Zuan, A. T. K., Cheak, S. C., & Abdul Rahman, N. A. (2020). Seed biopriming with P-and K-solubilizing *Enterobacter hormaechei* sp. improves the early vegetative growth and the P and K uptake of okra (*Abelmoschus esculentus*) seedling. *PloS one*, 15(7), e0232860.
- Ross, A. F. (1961). Systemic acquired resistance induced by localized virus infections in plants. *Virology*, 14(3), 340-358.
- Rosselló-Móra, R., & Amann, R. (2015). Past and future species definitions for Bacteria and Archaea. *Systematic and applied microbiology*, 38(4), 209-216.
- Rottig, M.; Medema, M.H.; Blin, K.; Weber, T.; Rausch, C.; Kohlbacher, O. NRPSpredictor2-a web server for predicting NRPS adenylation domain specificity. *Nucleic Acids Res.* 2011, 39, W362–W367.
- Rovira, A. D. (1956). A study of the development of the root surface microflora during the initial stages of plant growth. *Journal of Applied Bacteriology*, 19(1), 72-79.
- Rozier, C., Gerin, F., Czarnes, S., & Legendre, L. (2019). Biopriming of maize germination by the plant growth-promoting rhizobacterium *Azospirillum lipoferum* CRT1. *Journal of plant physiology*, 237, 111-119.
- Rudrappa, T., Biedrzycki, M. L., Kunjeti, S. G., Donofrio, N. M., Czymmek, K. J., Paul W, P., & Bais, H. P. (2010). The rhizobacterial elicitor acetoin induces systemic resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Communicative & Integrative Biology*, 3(2), 130-138.
- Ruppel, S., Franken, P., & Witzel, K. (2013). Properties of the halophyte microbiome and their implications for plant salt tolerance. *Functional Plant Biology*, 40(9), 940-951.
- Rustamova, N., Wubulikasimu, A., Mukhamedov, N., Gao, Y., Egamberdieva, D., & Yili, A. (2020). Endophytic Bacteria Associated with Medicinal Plant *Vernonia anthelmintica*: Diversity and Characterization. *Current Microbiology*, 1-9.
- Ruzzi, M., & Aroca, R. (2015). Plant growth-promoting rhizobacteria act as biostimulants in horticulture. *Scientia Horticulturae*, 196, 124-134.

- Ryu, C. M., Farag, M. A., Hu, C. H., Reddy, M. S., Wei, H. X., Paré, P. W., & Kloepper, J. W. (2003). Bacterial volatiles promote growth in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(8), 4927-4932.
- Ryu, C. M., Farag, M. A., Hu, C. H., Reddy, M. S., Kloepper, J. W., & Paré, P. W. (2004). Bacterial volatiles induce systemic resistance in Arabidopsis. *Plant physiology*, 134(3), 1017-1026.
- Safdar, W., Majeed, H., Naveed, I., Kayani, W. K., Ahmed, H., Hussain, S., & Kamal, A. (2010). Pharmacognostical study of the medicinal plant *Calendula officinalis* L.(family Compositae). *Int J Cell Mol Biol*, 1(2), 108-116.
- Saha, M., Sarkar, S., Sarkar, B., Sharma, B. K., Bhattacharjee, S., & Tribedi, P. (2016). Microbial siderophores and their potential applications: a review. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(5), 3984-3999.
- Santhanam, R., Menezes, R. C., Grabe, V., Li, D., Baldwin, I. T., & Groten, K. (2019). A suite of complementary biocontrol traits allows a native consortium of root-associated bacteria to protect their host plant from a fungal sudden-wilt disease. *Molecular ecology*, 28(5), 1154-1169.
- Santoyo, G., Moreno-Hagelsieb, G., del Carmen Orozco-Mosqueda, M., & Glick, B. R. (2016). Plant growth-promoting bacterial endophytes. *Microbiological research*, 183, 92-99.
- Santoyo, G., Sánchez-Yáñez, J. M., & de los Santos-Villalobos, S. (2019). Methods for detecting biocontrol and plant growth-promoting traits in Rhizobacteria. In *Methods in Rhizosphere Biology Research* (pp. 133-149). Springer, Singapore.
- Sarwar, A., Hassan, M. N., Imran, M., Iqbal, M., Majeed, S., Brader, G., ... & Hafeez, F. Y. (2018). Biocontrol activity of surfactin A purified from *Bacillus* NH-100 and NH-217 against rice bakanae disease. *Microbiological research*, 209, 1-13.
- Sasaki, T., Suzaki, T., Soyano, T., Kojima, M., Sakakibara, H., & Kawaguchi, M. (2014). Shoot-derived cytokinins systemically regulate root nodulation. *Nature communications*, 5(1), 1-9.
- Sessitsch, A., Reiter, B., Pfeifer, U., & Wilhelm, E. (2002). Cultivation-independent population analysis of bacterial endophytes in three potato varieties based on eubacterial and Actinomycetes-specific PCR of 16S rRNA genes. *FEMS microbiology ecology*, 39(1), 23-32.
- Schirawski, J., & Perlin, M. H. (2018). Plant-microbe interaction 2017—the good, the bad and the diverse.
- Schneider, K. (2010). Strukturaufklärung der Proximicine, Furan-Analoga des Netropsins aus dem marinen Actinomyceten *Verrucospora* und Untersuchungen zur Sekundärmetabolitproduktion des pflanzenwachstumsfördernden *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42.
- Schoenborn, L., Yates, P. S., Grinton, B. E., Hugenholtz, P., & Janssen, P. H. (2004). Liquid serial dilution is inferior to solid media for isolation of cultures representative of the phylum-level diversity of soil bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(7), 4363-4366.
- Schrettl, M., Bignell, E., Kragl, C., Sabiha, Y., Loss, O., Eisendle, M., ... & Haas, H. (2007). Distinct roles for intra-and extracellular siderophores during *Aspergillus fumigatus* infection. *PLoS Pathog*, 3(9), e128.
- Schwarzer, D., Mootz, H. D., & Marahiel, M. A. (2001). Exploring the impact of different thioesterase domains for the design of hybrid peptide synthetases. *Chemistry & biology*, 8(10), 997-1010.
- Shah, J., & Zeier, J. (2013). Long-distance communication and signal amplification in systemic acquired resistance. *Frontiers in Plant Science*, 4, 30.

- Shaharoona, B., Naveed, M., Arshad, M., & Zahir, Z. A. (2008). Fertilizer-dependent efficiency of Pseudomonads for improving growth, yield, and nutrient use efficiency of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Applied microbiology and biotechnology*, 79(1), 147-155.
- Shaikh, S. S., & Sayyed, R. Z. (2015). Role of plant growth-promoting rhizobacteria and their formulation in biocontrol of plant diseases. In *Plant microbes symbiosis: applied facets* (pp. 337-351). Springer, New Delhi.
- Sharifi, R., & Ryu, C. M. (2016). Are bacterial volatile compounds poisonous odors to a fungal pathogen *Botrytis cinerea*, alarm signals to *Arabidopsis* seedlings for eliciting induced resistance, or both?. *Frontiers in microbiology*, 7, 196.
- Sharifi, R., & Ryu, C. M. (2018). Revisiting bacterial volatile-mediated plant growth promotion: lessons from the past and objectives for the future. *Annals of botany*, 122(3), 349-358.
- Sharma, A., Johri, B. N., Sharma, A. K., & Glick, B. R. (2003). Plant growth-promoting bacterium *Pseudomonas* sp. strain GRP3 influences iron acquisition in mung bean (*Vigna radiata* L. Wilzeck). *Soil Biology and Biochemistry*, 35(7), 887-894.
- Sharma, R. R., Singh, D., & Singh, R. (2009). Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: A review. *Biological control*, 50(3), 205-221.
- Shi, J. F., & Sun, C. Q. (2017). Isolation, identification, and biocontrol of antagonistic bacterium against *Botrytis cinerea* after tomato harvest. *brazilian journal of microbiology*, 48(4), 706-714.
- Shore, S. J., & Sathisha, G. (2010). Screening of endophytic colonizing bacteria for cytokinin-like compounds: crude cell-free broth of endophytic colonizing bacteria is unsuitable in cucumber cotyledon bioassay. *World Journal of Agricultural Sciences*, 6(4), 345-352.
- Shores, M., Harman, G. E., & Mastouri, F. (2010). Induced systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents. *Annual review of phytopathology*, 48, 21-43.
- Shurigin, V., Davranov, K., Wirth, S., Egamberdieva, D., & Bellingrath-Kimura, S. D. (2018). Medicinal plants with phytotoxic activity harbour endophytic bacteria with plant growth inhibitory properties. *Environmental Sustainability*, 1(2), 209-215.
- Siddikee, M. A., Chauhan, P. S., Anandham, R., Han, G. H., & Sa, T. (2010). Isolation, characterization, and use for plant growth promotion under salt stress, of ACC deaminase-producing halotolerant bacteria derived from coastal soil. *J Microbiol Biotechnol*, 20(11), 1577-1584.
- Siddikee, M. A., Glick, B. R., Chauhan, P. S., jong Yim, W., & Sa, T. (2011). Enhancement of growth and salt tolerance of red pepper seedlings (*Capsicum annuum* L.) by regulating stress ethylene synthesis with halotolerant bacteria containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase activity. *Plant Physiology and Biochemistry*, 49(4), 427-434.
- Siddikee, M. A., Sundaram, S., Chandrasekaran, M., Kim, K., Selvakumar, G., & Sa, T. (2015). Halotolerant bacteria with ACC deaminase activity alleviate salt stress effect in canola seed germination. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, 58(2), 237-241.
- Sieber, S. A., & Marahiel, M. A. (2005). Molecular mechanisms underlying nonribosomal peptide synthesis: approaches to new antibiotics. *Chemical reviews*, 105(2), 715-738.
- Silva, D., Ferreira, M. S., Sousa-Lobo, J. M., Cruz, M. T., & Almeida, I. F. (2021). Anti-Inflammatory Activity of *Calendula officinalis* L. Flower Extract. *Cosmetics*, 8(2), 31.
- Silva, H. S. A., da Silva Romeiro, R., Macagnan, D., de Almeida Halfeld-Vieira, B., Pereira, M. C. B., & Mounteer, A. (2004). Rhizobacterial induction of systemic resistance in tomato plants: non-specific protection and increase in enzyme activities. *Biological Control*, 29(2), 288-295.

- Sindhu, S. S., & Dadarwal, K. R. (2001). Chitinolytic and cellulolytic *Pseudomonas* sp. antagonistic to fungal pathogens enhances nodulation by *Mesorhizobium* sp. Cicer in chickpea. *Microbiological research*, 156(4), 353-358.
- Singh, M., Kumar, A., Singh, R., & Pandey, K. D. (2017). Endophytic bacteria: a new source of bioactive compounds. 3 *Biotech*, 7(5), 315.
- Singh, S., Singh, U. B., Trivedi, M., Sahu, P. K., Paul, S., Paul, D., & Saxena, A. K. (2020). Seed biopriming with salt-tolerant endophytic *Pseudomonas geniculata*-modulated biochemical responses provide ecological fitness in maize (*Zea mays* L.) grown in saline sodic soil. *International journal of environmental research and public health*, 17(1), 253.
- Slopek, S. W. (1989). An improved method of estimating percent leaf area diseased using a 1 to 5 disease assessment scale. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 11(4), 381-387.
- Smibert, R.M. and Krieg, N.R. (1994) Phenotypic characterization. In *Methods for General and Molecular Biology*. Gerhardt, P.R.G., Murray, E., Wood, W.A. and Krieg, N.R. pp. 607–654. Washington, DC: American Society for Microbiology.
- Smith, J. M. (1964). Group selection and kin selection. *Nature*, 201(4924), 1145-1147.
- Someya, N., Kataoka, N., Komagata, T., Hirayae, K., Hibi, T., & Akutsu, K. (2000). Biological control of cyclamen soilborne diseases by *Serratia marcescens* strain B2. *Plant Disease*, 84(3), 334-340.
- Snook, M. E., Mitchell, T., Hinton, D. M., & Bacon, C. W. (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(10), 4287-4292.
- Spadaro, D., & Droby, S. (2016). Development of biocontrol products for postharvest diseases of fruit: the importance of elucidating the mechanisms of action of yeast antagonists. *Trends in Food Science & Technology*, 47, 39-49.
- Spaepen, S., & Vanderleyden, J. (2011). Auxin and plant-microbe interactions. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 3(4), a001438.
- Spaepen, S., Vanderleyden, J., & Remans, R. (2007). Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS microbiology reviews*, 31(4), 425-448.
- Spoel, S. H., Koornneef, A., Claessens, S. M., Korzelijs, J. P., Van Pelt, J. A., Mueller, M. J., ... & Pieterse, C. M. (2003). NPR1 modulates cross-talk between salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways through a novel function in the cytosol. *The Plant Cell*, 15(3), 760-770.
- Stearns, J. C., & Glick, B. R. (2003). Transgenic plants with altered ethylene biosynthesis or perception. *Biotechnology Advances*, 21(3), 193-210.
- Stefanic, P., Kraigher, B., Lyons, N. A., Kolter, R., & Mandic-Mulec, I. (2015). Kin discrimination between sympatric *Bacillus subtilis* isolates. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(45), 14042-14047.
- Stringlis, I. A., Proietti, S., Hickman, R., Van Verk, M. C., Zamioudis, C., & Pieterse, C. M. (2018). Root transcriptional dynamics induced by beneficial rhizobacteria and microbial immune elicitors reveal signatures of adaptation to mutualists. *The Plant Journal*, 93(1), 166-180.
- Sun, L., Lei, P., Wang, Q., Ma, J., Zhan, Y., Jiang, K., ... & Xu, H. (2020). The endophyte *Pantoea alhagi* NX-11 alleviates salt stress damage to rice seedlings by secreting exopolysaccharides. *Frontiers in microbiology*, 10, 3112.
- Tan, S., Jiang, Y., Song, S., Huang, J., Ling, N., Xu, Y., & Shen, Q. (2013). Two *Bacillus amyloliquefaciens* strains isolated using the competitive tomato root enrichment method and their effects on suppressing *Ralstonia solanacearum* and promoting tomato plant growth. *Crop Protection*, 43, 134-140.

- Taylor, A. G., & Harman, G. E. (1990). Concepts and technologies of selected seed treatments. *Annual review of phytopathology*, 28(1), 321-339.
- Taylor, K. G., & Konhauser, K. O. (2011). Iron in Earth surface systems: A major player in chemical and biological processes. *Elements*, 7(2), 83-88.
- Tahir, H. A. S., Gu, Q., Wu, H., Raza, W., Hanif, A., Wu, L., ... & Gao, X. (2017). Plant growth promotion by volatile organic compounds produced by *Bacillus subtilis* SYST2. *Front Microbiol* 8: 171.
- Tapi, A., Chollet-Imbert, M., Scherens, B., & Jacques, P. (2010). New approach for the detection of non-ribosomal peptide synthetase genes in *Bacillus* strains by polymerase chain reaction. *Applied microbiology and biotechnology*, 85(5), 1521-1531.
- Tendulkar, S. R., Saikumari, Y. K., Patel, V., Raghotama, S., Munshi, T. K., Balaram, P., & Chattoo, B. B. (2007). Isolation, purification and characterization of an antifungal molecule produced by *Bacillus licheniformis* BC98, and its effect on phytopathogen *Magnaporthe grisea*. *Journal of applied microbiology*, 103(6), 2331-2339.
- Thomashow, L. S., & Weller, D. M. (1996). Current concepts in the use of introduced bacteria for biological disease control: mechanisms and antifungal metabolites. In *Plant-microbe interactions* (pp. 187-235). Springer, Boston, MA.
- Thomludi, E. E., Tsalgatidou, 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.
- Thrane, C., Nielsen, T. H., Nielsen, M. N., Sørensen, J., & Olsson, S. (2000). Viscosinamide-producing *Pseudomonas fluorescens* DR54 exerts a biocontrol effect on *Pythium ultimum* in sugar beet rhizosphere. *FEMS Microbiology Ecology*, 33(2), 139-146.
- Torres, M. J., Brandan, C. P., Petroselli, G., Erra-Balsells, R., & Audisio, M. C. (2016). Antagonistic effects of *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* and *B. amyloliquefaciens* against *Macrophomina phaseolina*: SEM study of fungal changes and UV-MALDI-TOF MS analysis of their bioactive compounds. *Microbiological research*, 182, 31-39.
- Touré, Y., Ongena, M. A. R. C., Jacques, P., Guirio, 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(5), 1151-1160.
- Tran, H., Ficke, A., Asimwe, T., Höfte, M., & Raaijmakers, J. M. (2007). Role of the cyclic lipopeptide massetolide A in biological control of *Phytophthora infestans* and in colonization of tomato plants by *Pseudomonas fluorescens*. *New Phytologist*, 175(4), 731-742.
- Tsavkelova, E. A., Klimova, S. Y., Cherdyntseva, T. A., & Netrusov, A. I. (2006). Microbial producers of plant growth stimulators and their practical use: a review. *Applied biochemistry and microbiology*, 42(2), 117-126.
- Tsuge, K., Akiyama, T., & Shoda, M. (2001). Cloning, sequencing, and characterization of the iturin A operon. *Journal of bacteriology*, 183(21), 6265-6273.
- Tyagi, S., Kim, K., Cho, M., & Lee, K. J. (2019). Volatile dimethyl disulfide affects root system architecture of *Arabidopsis* via modulation of canonical auxin signaling pathways. *Environmental Sustainability*, 2(2), 211-216.
- Tunsagool, P., Leelasuphakul, W., Jaresitthikunchai, J., Phaonakrop, N., Roytrakul, S., & Jutidamrongphan, W. (2019). 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(5), e0217202.
- Um, S., Fraimout, A., Sapountzis, P., Oh, D. C., & Poulsen, M. (2013). The fungus-growing termite *Macrotermes natalensis* harbors bacillaene-producing *Bacillus* sp. that inhibit potentially antagonistic fungi. *Scientific reports*, 3(1), 1-7.

- Vaikuntapu, P. R., Dutta, S., Samudrala, R. B., Rao, V. R., Kalam, S., & Podile, A. R. (2014). Preferential promotion of *Lycopersicon esculentum* (Tomato) growth by plant growth promoting bacteria associated with tomato. *Indian journal of microbiology*, 54(4), 403-412.
- Vaishnav, A., Kumari, S., Jain, S., Varma, A., & Choudhary, D. K. (2015). Putative bacterial volatile-mediated growth in soybean (*Glycine max* L. Merrill) and expression of induced proteins under salt stress. *Journal of Applied Microbiology*, 119(2), 539-551.
- Vaishnav, A., Shukla, A. K., Sharma, A., Kumar, R., & Choudhary, D. K. (2019). Endophytic bacteria in plant salt stress tolerance: current and future prospects. *Journal of Plant Growth Regulation*, 38(2), 650-668.
- Vansuyt, G., Robin, A., Briat, J. F., Curie, C., & Lemanceau, P. (2007). Iron acquisition from Fe-pyoverdine by *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 20(4), 441-447.
- van de Mortel, J. E., Tran, H., Govers, F., & Raaijmakers, J. M. (2009). Cellular responses of the late blight pathogen *Phytophthora infestans* to cyclic lipopeptide surfactants and their dependence on G proteins. *Applied and environmental microbiology*, 75(15), 4950-4957.
- Van Loon, L. C., Bakker, P. A. H. M., & Pieterse, C. M. J. (1998). Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annual review of phytopathology*, 36(1), 453-483.
- Van Loon, L. C., Rep, M., & Pieterse, C. M. (2006). Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 44, 135-162.
- Van Peer, R., Niemann, G. J., & Schippers, B. (1991). Induced resistance and phytoalexin accumulation in biological control of *Fusarium* wilt of carnation by *Pseudomonas* sp. strain WCS 417 r. *Phytopathology*, 81(7), 728-734.
- Van Overbeek, L. S., & Saikkonen, K. (2016). Impact of bacterial–fungal interactions on the colonization of the endosphere. *Trends in plant science*, 21(3), 230-242.
- Van Overbeek, L., & Van Elsas, J. D. (2008). Effects of plant genotype and growth stage on the structure of bacterial communities associated with potato (*Solanum tuberosum* L.). *FEMS microbiology ecology*, 64(2), 283-296.
- Varga, T., Hixson, K. K., Ahkami, A. H., Sher, A. W., Barnes, M. E., Chu, R. K., ... & Doty, S. L. (2020). Endophyte-Promoted Phosphorus Solubilization in *Populus*. *Frontiers in plant science*, 11, 1585.
- Verma, S. K., & White, J. F. (2018). Indigenous endophytic seed bacteria promote seedling development and defend against fungal disease in browntop millet (*Urochloa ramosa* L.). *Journal of applied microbiology*, 124(3), 764-778.
- Vega, K., & Kalkum, M. (2012). Chitin, chitinase responses, and invasive fungal infections. *International journal of microbiology*, 2012.
- Velázquez-Becerra, C., Macías-Rodríguez, L. I., López-Bucio, J., Altamirano-Hernández, J., Flores-Cortez, I., & Valencia-Cantero, E. (2011). A volatile organic compound analysis from *Arthrobacter agilis* identifies dimethylhexadecylamine, an amino-containing lipid modulating bacterial growth and *Medicago sativa* morphogenesis in vitro. *Plant and soil*, 339(1-2), 329-340.
- Venieraki, A., Tsalgatiidou, P. C., Georgakopoulos, D. G., Dimou, M., & Katinakis, P. (2016). Swarming motility in plant-associated bacteria. *Hellenic Plant Protection Journal*, 9(1), 16-27.
- Verma, V., Ravindran, P., & Kumar, P. P. (2016). Plant hormone-mediated regulation of stress responses. *BMC plant biology*, 16(1), 86.
- Vessey, J. K. (2003). Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and soil*, 255(2), 571-586.

- Vieira, R. F., Paula Júnior, T. J., Teixeira, H., & de S. Carneiro, J. E. (2010). White mold management in common bean by increasing within-row distance between plants. *Plant disease*, 94(3), 361-367.
- Villarreal-Delgado, M. F., Villa-Rodríguez, E. D., Cira-Chávez, L. A., Estrada-Alvarado, M. I., Parra-Cota, F. I., & de los Santos-Villalobos, S. (2018). The genus *Bacillus* as a biological control agent and its implications in the agricultural biosecurity. *Mex. J. Phytopathol*, 36, 95-130.
- Wadhams, G. H., & Armitage, J. P. (2004). Making sense of it all: bacterial chemotaxis. *Nature reviews Molecular cell biology*, 5(12), 1024-1037.
- 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(10), 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.
- Wang, D. C., Jiang, C. H., Zhang, L. N., Chen, L., Zhang, X. Y., & Guo, J. H. (2019a). Biofilms positively contribute to *Bacillus amyloliquefaciens* 54-induced drought tolerance in tomato plants. *International journal of molecular sciences*, 20(24), 6271.
- Wang, J., Zhang, Y., Li, Y., Wang, X., Nan, W., Hu, Y., ... & Bi, Y. (2015). Endophytic microbes *Bacillus* sp. LZR216-regulated root development is dependent on polar auxin transport in *Arabidopsis* seedlings. *Plant cell reports*, 34(6), 1075-1087.
- Wang, J., Zhou, C., Xiao, X., Xie, Y., Zhu, L., & Ma, Z. (2017). Enhanced iron and selenium uptake in plants by volatile emissions of *Bacillus amyloliquefaciens* (BF06). *Applied Sciences*, 7(1), 85.
- 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., 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(5), 385-396.
- Wang, Y., Zhang, C., Wu, L., Wang, L., Gao, W., Jiang, J., & Wu, Y. (2019b). Inhibitory effect of *Bacillus subtilis* WL-2 and its IturinA lipopeptides against *Phytophthora infestans*. *bioRxiv*, 751131.
- Wayne, L. G., Brenner, D. J., Colwell, R. R., Grimont, P. A. D., Kandler, O., Krichevsky, M. I., ... & Truper, H. G. (1987). Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 37(4), 463-464.
- Wei, G., Kloepper, J. W., & Tuzun, S. (1991). Induction of systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum orbiculare* by select strains of plant growth-promoting rhizobacteria. *Phytopathology*, 81(11), 1508-1512.
- Weinberg, E. D. (2004). Suppression of bacterial biofilm formation by iron limitation. *Medical hypotheses*, 63(5), 863-865.
- Weise, T., Kai, M., & Piechulla, B. (2013). Bacterial ammonia causes significant plant growth inhibition. *PloS one*, 8(5), e63538.
- Weller, D. M., Mavrodi, D. V., van Pelt, J. A., Pieterse, C. M., van Loon, L. C., & Bakker, P. A. (2012). Induced systemic resistance in *Arabidopsis thaliana* against *Pseudomonas syringae* pv. tomato by 2, 4-diacetylphloroglucinol-producing *Pseudomonas fluorescens*. *Phytopathology*, 102(4), 403-412.

- Win, K. T., Tanaka, F., Okazaki, K., & Ohwaki, Y. (2018). The ACC deaminase expressing endophyte *Pseudomonas* spp. Enhances NaCl stress tolerance by reducing stress-related ethylene production, resulting in improved growth, photosynthetic performance, and ionic balance in tomato plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 127, 599-607.
- Winarso, S., Sulistyanto, D., & Eko, H. (2011). Effects of humic compounds and phosphate-solubilizing bacteria on phosphorus availability in an acid soil. *Journal of Ecology and the Natural Environment*, 3(7), 232-240.
- Winkelmann, G. (2001). Siderophore transport in fungi. *Microbial transport systems*, 463-480.
- Wong, K. H., Razmovski-Naumovski, V., Li, K. M., Li, G. Q., & Chan, K. (2014). Differentiating *Puerariae Lobatae Radix* and *Puerariae Thomsonii Radix* using HPTLC coupled with multivariate classification analyses. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 95, 11-19.
- Wu, C. Y., Chen, C. L., Lee, Y. H., Cheng, Y. C., Wu, Y. C., Shu, H. Y., ... & Liu, S. T. (2007). Nonribosomal synthesis of fengycin on an enzyme complex formed by fengycin synthetases. *Journal of Biological Chemistry*, 282(8), 5608-5616.
- 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(5), 560-567.
- Xie, H., Pasternak, J. J., & Glick, B. R. (1996). Isolation and characterization of mutants of the plant growth-promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2 that overproduce indoleacetic acid. *Current Microbiology*, 32(2), 67-71.
- Xie, X., Zhang, H., & Pare, P. (2009). Sustained growth promotion in *Arabidopsis* with long-term exposure to the beneficial soil bacterium *Bacillus subtilis* (GB03). *Plant signaling & behavior*, 4(10), 948-953.
- Xiong, Y. W., Ju, X. Y., Li, X. W., Gong, Y., Xu, M. J., Zhang, C. M., ... & Qin, S. (2020). Fermentation conditions optimization, purification, and antioxidant activity of exopolysaccharides obtained from the plant growth-promoting endophytic actinobacterium *Glutamicibacter halophytocola* KLBMP 5180. *International journal of biological macromolecules*, 153, 1176-1185.
- Yáñez-Mendizábal, V., Zeriuoh, H., Viñas, I., Torres, R., Usall, J., de Vicente, 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(4), 609-619.
- Yang, A., Akhtar, S. S., Iqbal, S., Amjad, M., Naveed, M., Zahir, Z. A., & Jacobsen, S. E. (2016). Enhancing salt tolerance in quinoa by halotolerant bacterial inoculation. *Functional Plant Biology*, 43(7), 632-642.
- Ye, Y. F., Li, Q. Q., Gang, F. U., Yuan, G. Q., Miao, J. H., & Wei, L. I. N. (2012). Identification of antifungal substance (Iturin A2) produced by *Bacillus subtilis* B47 and its effect on southern corn leaf blight. *Journal of Integrative Agriculture*, 11(1), 90-99.
- Yen, Y. H., Li, P. L., Wang, C. L., & Wang, S. L. (2006). An antifungal protease produced by *Pseudomonas aeruginosa* M-1001 with shrimp and crab shell powder as a carbon source. *Enzyme and microbial technology*, 39(2), 311-317.
- Yi, H. S., Ahn, Y. R., Song, G. C., Ghim, S. Y., Lee, S., Lee, G., & Ryu, C. M. (2016). Impact of a bacterial volatile 2, 3-butanediol on *Bacillus subtilis* rhizosphere robustness. *Frontiers in microbiology*, 7, 993.
- Yi, Y., Huang, W., & Ge, Y. (2008). Exopolysaccharide: a novel important factor in the microbial dissolution of tricalcium phosphate. *World Journal of microbiology and biotechnology*, 24(7), 1059-1065.

- Yoon, S. H., Ha, S. M., Lim, J., Kwon, S., & Chun, J. (2017). A large-scale evaluation of algorithms to calculate average nucleotide identity. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 110(10), 1281-1286.
- Yu, G. Y., Sinclair, J. B., Hartman, G. L., & Bertagnolli, B. L. (2002). Production of iturin A by *Bacillus amyloliquefaciens* suppressing *Rhizoctonia solani*. *Soil Biology and Biochemistry*, 34(7), 955-963.
- Yu, S. M., & Lee, Y. H. (2013). Plant growth promoting rhizobacterium *Proteus vulgaris* JBS202 stimulates the seedling growth of Chinese cabbage through indole emission. *Plant and soil*, 370(1-2), 485-495.
- Yu, S. M., & Lee, Y. H. (2015). Genes involved in nutrient competition by *Pseudomonas putida* JBC17 to suppress green mold in postharvest satsuma mandarin. *Journal of basic microbiology*, 55(7), 898-906.
- Yu, X., Yang, J., Wang, E., Li, B., & Yuan, H. (2015). Effects of growth stage and fulvic acid on the diversity and dynamics of endophytic bacterial community in *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves. *Frontiers in microbiology*, 6, 867.
- Yu, X., Ai, C., Xin, L., & Zhou, G. (2011). The siderophore-producing bacterium, *Bacillus subtilis* CAS15, has a biocontrol effect on *Fusarium* wilt and promotes the growth of pepper. *European Journal of Soil Biology*, 47(2), 138-145.
- Yuan, J., Zhang, N., Huang, Q., Raza, W., Li, R., Vivanco, J. M., & Shen, Q. (2015). Organic acids from root exudates of banana help root colonization of PGPR strain *Bacillus amyloliquefaciens* NJN-6. *Scientific reports*, 5(1), 1-8.
- Zahir, Z. A., Ghani, U., Naveed, M., Nadeem, S. M., & Asghar, H. N. (2009). Comparative effectiveness of *Pseudomonas* and *Serratia* sp. containing ACC-deaminase for improving growth and yield of wheat (*Triticum aestivum* L.) under salt-stressed conditions. *Archives of microbiology*, 191(5), 415-424.
- Zahir, Z. A., Munir, A., Asghar, H. N., Shaharoona, B., & Arshad, M. (2008). Effectiveness of rhizobacteria containing ACC deaminase for growth promotion of peas (*Pisum sativum*) under drought conditions. *J Microbiol Biotechnol*, 18(5), 958-963.
- Zaidi, A., Khan, M., Ahemad, M., & Oves, M. (2009). Plant growth promotion by phosphate solubilizing bacteria. *Acta microbiologica et immunologica Hungarica*, 56(3), 263-284.
- Zamioudis, C., Mastranesti, P., Dhonukshe, P., Blilou, I., & Pieterse, C. M. (2013). Unraveling root developmental programs initiated by beneficial *Pseudomonas* spp. bacteria. *Plant Physiology*, 162(1), 304-318.
- Zerriouh, H., de Vicente, A., Pérez-García, A., & Romero, D. (2014). Surfactin triggers biofilm formation of *B. subtilis* in melon phylloplane and contributes to the biocontrol activity. *Environmental microbiology*, 16(7), 2196-2211.
- Zerriouh, H., Romero, D., García-Gutiérrez, L., Cazorla, F. M., 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(12), 1540-1552.
- Zhang, D., Spadaro, D., Garibaldi, A., & Gullino, M. L. (2010). Selection and evaluation of new antagonists for their efficacy against postharvest brown rot of peaches. *Postharvest Biology and Technology*, 55(3), 174-181.
- Zhang, H., Kim, M. S., Krishnamachari, V., Payton, P., Sun, Y., Grimson, M., ... & Paré, P. W. (2007). Rhizobacterial volatile emissions regulate auxin homeostasis and cell expansion in *Arabidopsis*. *Planta*, 226(4), 839.
- Zhang, X., Zhou, Y., Li, Y., Fu, X., & Wang, Q. (2017). Screening and characterization of endophytic *Bacillus* for biocontrol of grapevine downy mildew. *Crop Protection*, 96, 173-179.

- Zheng, M., Shi, J., Shi, J., Wang, Q., & Li, Y. (2013). Antimicrobial effects of volatiles produced by two antagonistic *Bacillus* strains on the anthracnose pathogen in postharvest mangos. *Biological Control*, 65(2), 200-206.
- Zhao, L., Xu, Y., Lai, X. H., Shan, C., Deng, Z., & Ji, Y. (2015). Screening and characterization of endophytic *Bacillus* and *Paenibacillus* strains from medicinal plant *Lonicera japonica* for use as potential plant growth promoters. *Brazilian Journal of Microbiology*, 46(4), 977-989.
- Zhou, J. Y., Li, X., Zheng, J. Y., & Dai, C. C. (2016). Volatiles released by endophytic *Pseudomonas fluorescens* promoting the growth and volatile oil accumulation in *Atractylodes lancea*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 101, 132-140.