



ΕΘΝΙΚΟ & ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΤΟΜΕΑΣ ΒΟΤΑΝΙΚΗΣ

**«Βιοέλεγχος Φυτοπαθογόνων Μυκήτων με
Ακτινοβακτήρια του Ελλαδικού Χώρου»**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Γραμματικής Σ. Κανινή

ΒΙΟΛΟΓΟΣ, Msc Μικροβιακή Βιοτεχνολογία

Αθήνα, 2014



NATIONAL & KAPODISTRIAN UNIVERSITY OF ATHENS

FACULTY OF BIOLOGY

DEPARTMENT OF BOTANY

**“Biocontrol of Phytopathogenic Fungi
via Actinobacteria of the Greek Territory”**

PhD THESIS

Grammatiki S. Kanini

BIOLOGIST, Msc Microbial Biotechnology

Athens, 2014

Συμβουλευτική Επιτροπή

Αμαλία Δ. Καραγκούνη, Καθηγήτρια

Γιώργος Διαλλινάς, Καθηγητής

Δημήτρης Χατζηνικολάου, Αναπληρωτής Καθηγητής

Εξεταστική Επιτροπή

Αμαλία Δ. Καραγκούνη, Καθηγήτρια

Γιώργος Διαλλινάς, Καθηγητής

Δημήτρης Χατζηνικολάου, Αναπληρωτής Καθηγητής

Χρήστος Κατσαρός, Καθηγητής

Αθηνά Οικονόμου-Αμίλλη, Καθηγήτρια

Βασίλειος Ρούσσης, Καθηγητής

Ευαγγελία Καψανάκη-Γκότση, Επίκουρη Καθηγήτρια

ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

της Γραμματικής Σ. Κανινή

Τίτλος: «Βιοέλεγχος Φυτοπαθογόνων Μυκήτων με Ακτινοβακτήρια του Ελλαδικού Χώρου»

Η εφαρμογή του βιοελέγχου προκύπτει από την αναγκαιότητα να αναδειχθούν εναλλακτικές λύσεις για την αντιμετώπιση των φυτικών ασθενειών. Μέχρι και σήμερα, για την αντιμετώπιση των φυτοπαθογόνων μικροοργανισμών που καταστρέφουν τις καλλιέργειες, χρησιμοποιούνται ειδικές καλλιεργητικές πρακτικές, ανθεκτικές ποικιλίες φυτών και συχνότερα χημικές ουσίες, κυρίως οργανικά συνθετικά χημικά μόρια, τα οποία από τη μια πλευρά είναι αποτελεσματικά στη μικροβιοκτόνο δράση τους, από την άλλη όμως επιφέρουν καταστροφές στο φυσικό περιβάλλον και είναι επιβλαβή για την υγεία του ανθρώπου.

Οι στρεπτομύκητες, γνωστοί ως παραγωγοί μεγάλης ποικιλίας βιοενεργών ενώσεων, αποτελούν σπουδαίο εργαλείο στα χέρια των επιστημόνων, που αναζητούν εναλλακτικές οικολογικές λύσεις στην καταπολέμηση φυτικών ασθενειών, οι οποίες προκαλούνται από μικροοργανισμούς. Διάφορα στελέχη του γένους των Στρεπτομυκήτων έχουν χρησιμοποιηθεί εναντίον φυτοπαθογόνων μυκήτων για την αποτελεσματική προστασία καλλιεργειών, όπως το βαμβάκι, το σπαράγγι, το φασόλι και η τομάτα, ως εναλλακτική λύση στη χρήση συνθετικών χημικών μυκητοκτόνων.

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η διερεύνηση της δυνατότητας βιοελέγχου των φυτοπαθογόνων μυκήτων *Rhizoctonia solani* και *Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici* από ενδημικά στελέχη στρεπτομυκήτων του Ελλαδικού χώρου.

Συνολικά εξετάστηκαν 606 στελέχη στρεπτομυκήτων, απομονωμένων από διαφορετικά ενδιαιτήματα της Ελλάδας, που ανήκουν στη συλλογή του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας, του Τμήματος Βιολογίας, του Πανεπιστημίου Αθηνών, ως προς την ικανότητά τους να ανταγωνίζονται *in vitro* τους φυτοπαθογόνους μύκητες *Rhizoctonia solani* και *Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici* σε στερεές καλλιέργειες και επιλέχθηκαν δώδεκα στελέχη με κριτήριο την έκταση της αναστολής της αύξησης των φυτοπαθογόνων μυκήτων.

Διερευνώντας το μηχανισμό με τον οποίο τα επιλεγμένα στελέχη στρεπτομυκήτων ανταγωνίζονται τους εξεταζόμενους παράγοντες βιοελέγχου, εκχυλίσματα καλλιεργειών τους συμπυκνώθηκαν και διαχωρίστηκαν τόσο με βάση το μοριακό τους βάρος όσο και με την πολικότητά τους. Τα κλάσματα που προέκυψαν εξετάστηκαν ως προς την αντιμυκητιακή τους δράση και δείχθηκε ότι οι βιοενεργοί μεταβολίτες είναι πολικές ενώσεις. Δείχθηκε, επίσης, ότι οι ίδιοι στρεπτομύκητες αναστέλλουν την ανάπτυξη καθενός από τους δύο φυτοπαθογόνους μύκητες με διαφορετικό τρόπο. Έτσι, η αντιμυκητιακή δράση τους εξειδικεύεται, αφού αφενός η ανάπτυξη του *Rhizoctonia solani* αναστέλλεται από τους μικρομοριακούς μεταβολίτες των επιλεγμένων στρεπτομυκήτων, αφετέρου η ανάπτυξη του *Fusarium oxysporum* από τον συνδυασμό μικρομοριακών και μεγαλομοριακών μεταβολιτών των ίδιων στρεπτομυκήτων.

Σε πειράματα ανταγωνισμού *in vivo*, διερευνήθηκε η αποτελεσματικότητα των επιλεγμένων στρεπτομυκήτων στον έλεγχο συμπτωμάτων παθογένειας που προκάλεσε ο μύκητας *Rhizoctonia solani* σε φυτά φασολιού και επεισοδίων μαρασμού που προκάλεσε ο μύκητας *Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici* σε φυτά τομάτας. Ελέγχθηκαν διάφοροι τρόποι εφαρμογής των εξεταζόμενων παραγόντων βιοελέγχου στο εκάστοτε προσβεβλημένο φυτό, με σκοπό να προταθεί η πλέον εύκολη αλλά και αποτελεσματική χρήση τους στο πεδίο. Με δοκιμασίες *in vivo*, επίσης, μελετήθηκε η ικανότητα των επιλεγμένων στρεπτομυκήτων να προστατεύουν τα εξεταζόμενα φυτά-στόχους από τους αντίστοιχους φυτοπαθογόνους μύκητες μέσω της προώθησης της αύξησης των φυτών. Από τη συνολική θεώρηση των αποτελεσμάτων των *in vivo* δοκιμασιών βιοελέγχου αποδείχθηκε ότι αποτελεσματικότερος παράγοντας βιοελέγχου του φυτοπαθογόνου μύκητα *Rhizoctonia solani* DSM843 ήταν το στέλεχος στρεπτομύκητα GRE 25, που ανήκει στο είδος *Streptomyces rochei*, ενώ του φυτοπαθογόνου μύκητα *Fusarium oxysporum* DSM62059 ήταν τα στελέχη GRE 25 (*Streptomyces rochei*) και OL 7 (*Streptomyces sp.*). Αποδοτικότερος τρόπος χρήσης των παραγόντων βιοελέγχου *in vivo* δείχθηκε ότι ήταν η εκ των προτέρων κάλυψη των φυτικών σπόρων με σπόρια των Στρεπτομυκήτων. Επιπλέον, προέκυψε ότι οι στρεπτομύκητες GRE 25 (*Streptomyces rochei*) και OL 7 (*Streptomyces sp.*) προωθούν τόσο τη φύτευση όσο και τις υπόλοιπες παραμέτρους ανάπτυξης των φυτών τομάτας και μπορούν να χαρακτηριστούν ως αυξητικοί παράγοντες για το φυτό αυτό. Ο στρεπτομύκητας GRE

25 (*Streptomyces rochei*), ήταν ο ιδανικότερος παράγοντας βιοελέγχου του *Rhizoctonia solani* σε όλες τις δοκιμασίες, χωρίς όμως να έχει τη δυνατότητα προώθησης της αύξησης των φυτών φασολιάς.

ABSTRACT OF PhD THESIS

GRAMMATIKI S. KANINI

Title: “Biocontrol of Phytopathogenes Fungi via Actinobacteria of the Greek Territory”

The application of biocontrol is truly required by the necessity of the emergence of alternative solutions to handling the plant diseases in general. Up to now in order to control the phytopathogenic microorganisms of the crops, special cultivation methods have been used, i.e. resistant plant varieties and more often chemical substances, mainly organic synthetic chemical molecules, which are effective regarding their germicidal activity, but it is also well known that they induce damage to the environment and, therefore, to man.

Streptomycetes, which are known as producers of a vast variety of bioactive substances, are a significant tool in the hands of scientists who look for alternative, ecological solutions to handle against plant diseases caused by microorganisms. The outcome of these efforts has already resulted in the application of various strains against the phytopathogenic fungi *Rhizoctonia solani* and *Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici*. They have also lead to the effective protection of crops, such as cotton, asparagus, beans and tomato, as an alternative solution to the usage of synthetic fungicides.

The aim of the present thesis was to examine specifically the biocontrol capacity of the phytopathogenic fungi *Rhizoctonia solani* and *Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici* via indigenous strains of Streptomycetes.

In order to achieve the goal mentioned above, a total of 606 Streptomycetes, which were isolated from different habitats of Greece and belong to the collection of the Microbiology Laboratory of the Faculty of Biology of the University of Athens, have been examined in relation to their ability to control the growth of the phytopathogenic fungi *Rhizoctonia solani* and *Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici in vitro*, in solid cultures. Under the criterion of their high anti-fungal activity twelve micro-organisms were selected for further examination.

Culture extracts from the selected Streptomycetes have been concentrated and fractionated based on both their molecular weight and their polarity. The fractions occurred were examined in relation to their anti-fungal activity and it was shown that

the bioactive metabolites are polar compounds. The results also showed that the same Streptomycetes inhibit the growth of each of the two phytopathogenic fungi differently, i.e. their anti-fungal activity is specialized, since some of their micro-molecular metabolites inhibit the former and a combination of micro- and mega-molecular metabolites the latter.

The effectiveness of the selected Streptomycetes in controlling both the symptoms of pathogenic behaviour caused by the fungus *Rhizoctonia solani* in bean plants and cases of wilting caused by the fungus *Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici* in tomato plants was also examined through *in vivo* experiments. Different application methods of the examined biocontrol agents were tested in each infected plant, in order to estimate the easiest and most effective use in the field; at the same time the capability of the selected Streptomycetes to protect the plants against the fungi, promoting their growth, was also examined via *in vivo* trials. From the total evaluation of the results of the *in vivo* biocontrol trials it has been concluded that the most effective biocontrol agent against the phytopathogenic fungus *Rhizoctonia solani* DSM843 was *Streptomyces* GRE 25 (*Streptomyces rochei*), while against the phytopathogenic fungus *Fusarium oxysporum* DSM62059 was *Streptomyces* GRE 25 (*Streptomyces rochei*) and OL 7 (*Streptomyces sp.*). Additionally, the most efficient way to use the Streptomycetes was by covering the plant seeds with their spores prior planting. The Streptomycetes GRE 25 and OL 7 promoted the sprouting of the plants. They also promoted the rest growth parameters of tomato plants and, therefore, they could be characterized as tomato growth promoters. However, the *Streptomyces* GRE 25 could not promote the growth of bean plants. Subsequently, the mechanism of its activity as an effective biocontrol agent against *Rhizoctonia solani* in the field remains to be discussed.

1.1.	ΕΠΙΒΑΡΥΝΤΙΚΕΣ ΓΙΑ ΤΟ ΕΔΑΦΟΣ ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ (SOILBORNE DISEASES)	1
1.2.	ΟΙ ΦΥΤΟΠΑΘΟΓΟΝΟΙ ΜΥΚΗΤΕΣ <i>RHIZOCTONIA SOLANI</i> ΚΑΙ <i>FUSARIUM OXYSPORUM</i>	3
1.2.1.	Γενικά χαρακτηριστικά του μύκητα <i>Rhizoctonia solani</i>	3
1.2.1.1.	Μορφολογικά και ανατομικά χαρακτηριστικά του φυτοπαθογόνου μύκητα <i>Rhizoctonia solani</i>	4
1.2.1.2.	Παθογένεια του μύκητα <i>Rhizoctonia solani</i>	7
1.2.1.3.	Στρατηγικές έλεγχου των φυτικών ασθενειών που προκαλούνται από τον μύκητα <i>Rhizoctonia solani</i>	9
1.2.2.	Γενικά χαρακτηριστικά του φυτοπαθογόνου μύκητα <i>Fusarium oxysporum</i>	10
1.2.2.1.	Κύκλος ζωής του <i>Fusarium oxysporum</i>	13
1.2.2.2.	Συνθήκες ανάπτυξης του μύκητα <i>Fusarium oxysporum</i>	13
1.2.2.3.	Παθογένεια του μύκητα <i>Fusarium oxysporum</i>	14
1.2.2.3.1.	Εξέλιξη της ασθένειας	16
1.2.2.3.2.	Ξενιστές	16
1.2.2.4.	Αντιμετώπιση και έλεγχος του <i>Fusarium oxysporum</i>	17
1.2.2.5.	<i>Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici</i>	18
1.3.	Ο ΒΙΟΕΛΕΓΧΟΣ ΤΩΝ ΦΥΤΟΠΑΘΟΓΟΝΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ	20
1.3.1.	Πρότυπα βιοελέγχου φυτοπαθογόνων μικροοργανισμών	20

1.3.2.	Κοινοί παράγοντες βιοελέγχου φυτοπαθογόνων μικροοργανισμών	22
1.3.3.	Η αναγκαιότητα του βιοελέγχου	22
1.3.4.	Αξιολόγηση του βιοελέγχου	23
1.3.5.	Ο βιοέλεγχος του <i>Rhizoctonia solani</i> και <i>Fusarium oxysporum</i>	24
1.4.	ΤΟ ΓΕΝΟΣ ΤΩΝ ΣΤΡΕΠΤΟΜΥΚΗΤΩΝ	24
1.4.1.	Γενικά χαρακτηριστικά του γένους <i>Streptomyces</i>	25
1.4.2.	Οικοφυσιολογία	26
1.4.3.	Κύκλος ζωής των στρεπτομυκήτων	27
1.4.4.	Ταξινομική στρεπτομυκήτων	27
1.4.4.1.	Διάκριση των στελεχών βάση της BOX PCR αντίδρασης	28
1.4.4.2.	Ταυτοποίηση μικροβιακών στελεχών βάση της ανάλυσης της αλληλουχίας του γονιδίου 16S rRNA	31
1.4.5.	Οι στρεπτομύκητες ως παραγωγείς βιοενεργών ενώσεων και το βιοτεχνολογικό τους ενδιαφέρον	31
1.4.5.1.	Οι στρεπτομύκητες ως παράγοντες βιοελέγχου	33
1.4.5.2.	Μοριακή και γενετική μελέτη των στρεπτομυκήτων	34
1.4.5.3.	Περιγραφή του γονιδιώματος των στρεπτομυκήτων	35
1.4.5.4.	Ανάγνωση της αλληλουχίας του γονιδιώματος του πρότυπου στελέχους <i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2)	37
1.4.5.5.	Γενετική προσέγγιση της παραγωγής βιοενεργών ενώσεων από στρεπτομύκητες	37

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 **ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

2.1.	ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ	44
2.2.	ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ ΚΑΙ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ	44
2.2.1.	Θρεπτικό υπόστρωμα αργινίνης, γλυκερόλης και αλάτων (AGS agar)	44
2.2.2.	Θρεπτικό άγαρ (Nutrient Agar, NA)	44
2.2.3.	Θρεπτικό υπόστρωμα δεξτρόζης από πατάτα (Potato Dextrose Agar, PDA)	45
2.2.4.	Θρεπτικό υπόστρωμα παραγωγής αντιβιοτικών από στρεπτομύκητες (Streptomyces Antibiotic Agar, SAA)	45
2.2.4.1.	Θρεπτικό υπόστρωμα παραγωγής αντιβιοτικών από στρεπτομύκητες (α) [Streptomyces Antibiotic Agar, SAA(α)]	45
2.2.4.2.	Θρεπτικό υπόστρωμα παραγωγής αντιβιοτικών από στρεπτομύκητες (β) [Streptomyces Antibiotic Agar, SAA(β)]	45
2.2.4.3.	Θρεπτικό υπόστρωμα παραγωγής αντιβιοτικών από στρεπτομύκητες (γ) [Streptomyces Antibiotic Agar, SAA(γ)]	45
2.2.5.	Θρεπτικός ζωμός παραγωγής αντιβιοτικών από στρεπτομύκητες (Streptomyces Antibiotic Broth, SAB)	45
2.2.6.	Czapek-Dox Agar (CzA)	45
2.2.7.	Ελάχιστο υπόστρωμα με αμμωνία ως πηγή αζώτου (Minimal Medium, MM-NH ₃)	46

2.2.8.	Ελάχιστο υπόστρωμα με νιτρικά ιόντα ως πηγή αζώτου (Minimal Medium, MM-NO ₃)	46
2.2.9.	Ελάχιστο υπόστρωμα με ουρία ως πηγή αζώτου (Minimal Medium, MM-UREA)	46
2.2.10.	Διάλυμα γλυκερόλης 20 % (w/v)	46
2.2.11.	Διάλυμα αλάτων Ringer (1/4)	46
2.2.12.	Διάλυμα αλάτων	46
2.2.13.	Διάλυμα ιχνοστοιχείων	46
2.2.14.	Υδατικό διάλυμα οξικού οξέος 3 M	46
2.2.15.	Διάλυμα TAE (1x)	46
2.2.16.	Διάλυμα Βρωμιούχου Αιθιδίου	46
2.2.17.	Ρυθμιστικό διάλυμα Φόρτωσης	47
2.2.18.	Υδατικό διάλυμα αιθανόλης 70 %	47
2.3.	ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ ΤΗΣ ΑΥΞΗΣΗΣ ΤΩΝ ΦΥΤΟΠΑΘΟΓΟΝΩΝ ΜΥΚΗΤΩΝ ΑΠΟ ΣΤΕΛΕΧΗ ΣΤΡΕΠΤΟΜΥΚΗΤΩΝ	47
2.3.1.	Έλεγχος της <i>in vitro</i> αντιμυκητιακής δραστηριότητας των στρεπτομυκήτων	47
2.3.2.	Ποσοτικός προσδιορισμός της <i>in vitro</i> αντιμυκητιακής δραστηριότητας των στρεπτομυκήτων	48
2.3.3.	Επιλογή στελεχών στρεπτομυκήτων με την ισχυρότερη αντιμυκητιακή δράση εναντίον και των δύο φυτοπαθογόνων μυκήτων	48
2.4.	ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΟΛΙΚΟΥ DNA ΑΠΟ ΚΑΘΑΡΗ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ	48

ΣΤΡΕΠΤΟΜΥΚΗΤΩΝ

2.4.1.	Ανάλυση αλληλουχίας γονιδίου 16S rRNA	50
2.4.2.	Αντίδραση BOX-PCR	51
2.5.	ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΩΝ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ	51
2.6.	ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ	53
2.7.	ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ ΑΠΟ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΤΩΝ ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΣΤΡΕΠΤΟΜΥΚΗΤΩΝ	54
2.7.1.	Εκχύλιση μεταβολιτών από υγρές και στερεές καλλιέργειες των επιλεγμένων στελεχών στρεπτομυκήτων, σε υδατικό διάλυμα	54
2.7.2.	Κλασμάτωση μίγματος μεταβολιτών	56
2.7.3.	Εκχύλιση μεταβολιτών από στερεές καλλιέργειες των επιλεγμένων στελεχών στρεπτομυκήτων, σε οξικό αιθυλεστέρα	56
2.7.4.	Εκχύλιση μεταβολιτών από στερεές καλλιέργειες των επιλεγμένων στελεχών στρεπτομυκήτων, σε μεθανόλη	57
2.7.5.	Έλεγχος της αντιμικροβιακής δράσης των βιοενεργών υδατικών εκχυλισμάτων έναντι κοινών μικροβιακών δεικτών	58
2.8.	ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ ΤΗΣ ΑΥΞΗΣΗΣ ΤΩΝ ΦΥΤΟΠΑΘΟΓΟΝΩΝ ΜΥΚΗΤΩΝ ΑΠΟ ΣΤΕΛΕΧΗ ΣΤΡΕΠΤΟΜΥΚΗΤΩΝ <i>IN VIVO</i>	58
2.8.1.	Επιλογή των φυτών στόχων	58
2.8.2.	Προετοιμασία χώματος	59
2.8.3.	Προετοιμασία των σπόρων των εξεταζόμενων φυτών	59

2.8.3.1.	Προετοιμασία σπόρων φασολιού	59
2.8.3.2.	Προετοιμασία σπόρων τομάτας	60
2.8.4.	Καλλιέργειες μικροοργανισμών	60
2.8.4.1.	Καλλιέργειες μυκήτων για τη μόλυνση του χώματος	60
2.8.4.2.	Καλλιέργειες στρεπτομυκήτων για την κάλυψη των σπόρων των φυτών στόχων	61
2.8.5.	Επεξεργασία των σπόρων των φυτών φασολιού και τομάτας με σπόρια των επιλεγμένων στρεπτομυκήτων	62
2.8.5.1.	Επεξεργασία των σπόρων των φυτών φασολιού με σπόρια των επιλεγμένων στρεπτομυκήτων	62
2.8.5.2.	Επεξεργασία των σπόρων των φυτών τομάτας με σπόρια των επιλεγμένων στρεπτομυκήτων	62
2.8.6.	Έλεγχος της <i>in vivo</i> ανταγωνιστικής ικανότητας των στρεπτομυκήτων κατά των φυτοπαθογόνων μυκήτων <i>Rhizoctonia solani</i> DSM843 και <i>Fusarium oxysporum</i> DSM62059	63
2.8.6.1.	Πρωτόκολλο φύτευσης και επώασης	64
2.8.6.2.	Παράμετροι φύτευσης	65
2.8.6.3.	Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων	65

-
- 3.1.** *IN VITRO* ΑΝΤΙΜΥΚΗΤΙΑΚΗ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΕΝΔΗΜΙΚΩΝ ΣΤΡΕΠΤΟΜΥΚΗΤΩΝ 66
- 3.1.1.** *In vitro* αντιμυκητιακή δραστηριότητα των ενδημικών στρεπτομυκήτων εναντίον του φυτοπαθογόνου μύκητα *Rhizoctonia solani* DSM843 67
- 3.1.1.1.** Ποσοτικοποίηση της *in vitro* ανταγωνιστικής δράσης των απομονωμένων στρεπτομυκήτων εναντίον του φυτοπαθογόνου μύκητα *Rhizoctonia solani* DSM843 67
- 3.1.2.** *In vitro* αντιμυκητιακή δραστηριότητα των ενδημικών στρεπτομυκήτων εναντίον του φυτοπαθογόνου μύκητα *Fusarium oxysporum* DSM62059 77
- 3.1.2.1.** Ποσοτικοποίηση της *in vitro* ανταγωνιστικής δράσης των απομονωμένων στρεπτομυκήτων εναντίον του φυτοπαθογόνου μύκητα *Fusarium oxysporum* DSM62059 78
- 3.2.** ΟΜΑΔΟΠΟΙΗΣΗ ΣΕ ΕΠΙΠΕΔΟ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ ΤΩΝ ΣΤΡΕΠΤΟΜΥΚΗΤΩΝ ΠΟΥ ΕΚΔΗΛΩΣΑΝ ΑΝΤΙΜΥΚΗΤΙΑΚΗ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ 83
- 3.2.1.** Ομαδοποίηση σε επίπεδο στελέχους των στρεπτομυκήτων με ικανότητα αναστολής της ανάπτυξης του φυτοπαθογόνου μύκητα *Rhizoctonia solani* DSM843 ανά περιοχή δειγματοληψίας 84
- 3.2.2.** Ομαδοποίηση σε επίπεδο στελέχους των στρεπτομυκήτων με ικανότητα αναστολής της ανάπτυξης του φυτοπαθογόνου μύκητα *Fusarium oxysporum* DSM62059 ανά περιοχή δειγματοληψίας 93
- 3.3.** ΕΠΙΛΟΓΗ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΣΤΡΕΠΤΟΜΥΚΗΤΩΝ ΜΕ ΤΗΝ ΙΣΧΥΡΟΤΕΡΗ ΑΝΤΙΜΥΚΗΤΙΑΚΗ ΔΡΑΣΗ ΕΝΑΝΤΙΟΝ ΚΑΙ ΤΩΝ ΔΥΟ 100

3.3.1.	Διάκριση των επιλεγμένων στελεχών στρεπτομυκήτων βάσει της αντίδρασης BOX PCR	100
3.3.2.	Ταυτοποίηση των επιλεγμένων στρεπτομυκήτων βάσει της ανάλυσης της αλληλουχίας του γονιδίου 16S rRNA	101
3.4.	ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΩΝ ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ ΣΤΗΝ ΑΝΤΙΜΥΚΗΤΙΑΚΗ ΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΩΝ ΣΤΡΕΠΤΟΜΥΚΗΤΩΝ ΕΝΑΝΤΙΟΝ ΤΩΝ ΕΞΕΤΑΖΟΜΕΝΩΝ ΦΥΤΟΠΑΘΟΓΟΝΩΝ ΜΥΚΗΤΩΝ	102
3.4.1.	Επίδραση διαφορετικών πηγών θρεπτικών συστατικών στην αντιμυκητιακή δράση των επιλεγμένων στρεπτομυκήτων εναντίον των εξεταζόμενων φυτοπαθογόνων μυκήτων	103
3.4.2.	Επίδραση της θερμοκρασίας επώασης και της τιμής pH του θρεπτικού υποστρώματος στην αντιμυκητιακή δράση των επιλεγμένων στρεπτομυκήτων εναντίον των εξεταζόμενων φυτοπαθογόνων μυκήτων	111
3.5.	ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΩΝ ΣΤΡΕΠΤΟΜΥΚΗΤΩΝ	114
3.5.1.	Ανίχνευση ενζυμικής ενεργότητας κυτταρινάσης με πηγή άνθρακα κυτταρίνη	114
3.5.2.	Ανίχνευση ενζυμικής ενεργότητας ξυλανάσης με πηγή άνθρακα την ξυλάνη	116
3.5.3.	Ανίχνευση ενζυμικής ενεργότητας χιτινάσης με πηγή άνθρακα τη χιτίνη	117
3.6.	ΑΝΤΙΜΥΚΗΤΙΑΚΗ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΕΝΩΝ ΑΠΟ ΥΓΡΕΣ ΚΑΙ ΣΤΕΡΕΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΤΩΝ ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΣΤΡΕΠΤΟΜΥΚΗΤΩΝ, ΣΕ ΥΔΑΤΙΚΟ ΔΙΑΛΥΜΑ	119
3.6.1.	Βιοενεργότητα εκχυλισμάτων καλλιεργειών στρεπτομυκήτων	120

εναντίον του *Rhizoctonia solani* DSM843

3.6.1.1.	Βιοενεργότητα εκχυλισμάτων από υγρή καλλιέργεια των επιλεγμένων στρεπτομυκήτων εναντίον του φυτοπαθογόνου μύκητα <i>Rhizoctonia solani</i> DSM843	120
3.6.1.2.	Βιοενεργότητα εκχυλισμάτων από στερεή καλλιέργεια των επιλεγμένων στρεπτομυκήτων εναντίον του φυτοπαθογόνου μύκητα <i>Rhizoctonia solani</i> DSM843	120
3.6.1.3.	Κλασμάτωση μίγματος μεταβολιτών	123
3.6.2.	Βιοενεργότητα εκχυλισμάτων καλλιεργειών στρεπτομυκήτων εναντίον του <i>Fusarium oxysporum</i> DSM62059	124
3.6.2.1.	Βιοενεργότητα εκχυλισμάτων από υγρή καλλιέργεια των επιλεγμένων στρεπτομυκήτων εναντίον του φυτοπαθογόνου μύκητα <i>Fusarium oxysporum</i> DSM62059	124
3.6.2.2.	Βιοενεργότητα εκχυλισμάτων από στερεή καλλιέργεια των επιλεγμένων στρεπτομυκήτων εναντίον του φυτοπαθογόνου μύκητα <i>Fusarium oxysporum</i> DSM62059	124
3.6.2.3.	Κλασμάτωση μίγματος μεταβολιτών	126
3.7.	ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΔΡΑΣΗ ΒΙΟΕΝΕΡΓΩΝ ΥΔΑΤΙΚΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΕΝΑΝΤΙ ΚΟΙΝΩΝ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΩΝ ΔΕΙΚΤΩΝ	128
3.8.	ΑΝΤΙΜΥΚΗΤΙΑΚΗ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΕΝΩΝ ΣΕ ΟΞΙΚΟ ΑΙΘΥΛΕΣΤΕΡΑ ΚΑΙ ΜΕΘΑΝΟΛΗ (ΟΡΓΑΝΙΚΟΙ ΔΙΑΛΥΤΕΣ)	128
3.9.	ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ ΤΗΣ ΑΥΞΗΣΗΣ ΤΩΝ ΦΥΤΟΠΑΘΟΓΟΝΩΝ ΜΥΚΗΤΩΝ ΑΠΟ ΣΤΕΛΕΧΗ ΣΤΡΕΠΤΟΜΥΚΗΤΩΝ <i>IN VIVO</i>	130
3.9.1.	<i>In vivo</i> ικανότητα βιοελέγχου του μύκητα <i>Rhizoctonia solani</i> DSM843 από στελέχη στρεπτομυκήτων	130

3.9.1.1.	Διερεύνηση της ικανότητας βιοελέγχου του μύκητα <i>Rhizoctonia solani</i> DSM843 <i>in vivo</i> από στελέχη στρεπτομυκήτων, σε αποστειρωμένο χώμα	131
3.9.1.2.	Διερεύνηση της ικανότητας βιοελέγχου του μύκητα <i>Rhizoctonia solani</i> DSM843 <i>in vivo</i> από στελέχη στρεπτομυκήτων, σε μη αποστειρωμένο χώμα	140
3.9.2.	<i>In vivo</i> ικανότητα βιοελέγχου του μύκητα <i>Fusarium oxysporum</i> DSM62059 από στελέχη στρεπτομυκήτων	150
3.9.2.1.	Διερεύνηση της ικανότητας βιοελέγχου του μύκητα <i>Fusarium oxysporum</i> DSM62059 <i>in vivo</i> από στελέχη στρεπτομυκήτων, σε αποστειρωμένο χώμα	150
3.9.2.2.	Διερεύνηση της ικανότητας βιοελέγχου του μύκητα <i>Fusarium oxysporum</i> DSM62059 <i>in vivo</i> από στελέχη στρεπτομυκήτων, σε μη αποστειρωμένο χώμα	158
3.9.3.	Διερεύνηση της ικανότητας επιλεγμένων στρεπτομυκήτων να προωθούν τη φύτευση	169
3.9.3.1.	Διερεύνηση της ικανότητας επιλεγμένων στρεπτομυκήτων να προωθούν τη φύτευση και την ανάπτυξη φυτών φασολιάς σε αποστειρωμένο έδαφος	169
3.9.3.2.	Διερεύνηση της ικανότητας επιλεγμένων στρεπτομυκήτων να προωθούν τη φύτευση και την ανάπτυξη σπορόφυτων τομάτας σε αποστειρωμένο έδαφος	170

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

4.1.	ΕΠΙΛΟΓΗ ΣΤΡΕΠΤΟΜΥΚΗΤΩΝ ΜΕ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ ΤΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΤΩΝ ΦΥΤΟΠΑΘΟΓΟΝΩΝ ΜΥΚΗΤΩΝ	172
------	---	-----

4.2.	ΑΝΤΙΜΥΚΗΤΙΑΚΗ ΔΡΑΣΗ ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΩΝ ΣΤΡΕΠΤΟΜΥΚΗΤΩΝ <i>IN VIVO</i>	182
4.3.	ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΩΝ ΒΙΟΕΝΕΡΓΩΝ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ ΤΩΝ ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΩΝ ΣΤΡΕΠΤΟΜΥΚΗΤΩΝ	186

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

189

1

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

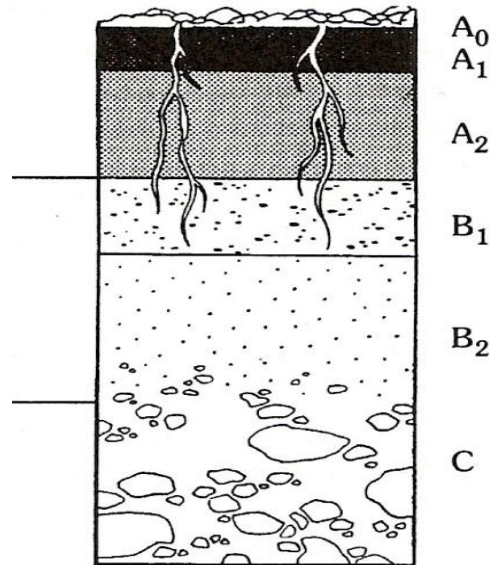
1.1. ΕΠΙΒΑΡΥΝΤΙΚΕΣ ΓΙΑ ΤΟ ΕΔΑΦΟΣ ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ (SOILBORNE DISEASES)

Οι επιβαρυντικές για το έδαφος ασθένειες (soilborne diseases) είναι εκείνες που προκαλούνται από παθογόνους μικροοργανισμούς, οι οποίοι επιβιώνουν είτε μέσα στο εδαφικό υλικό είτε στα επιφανειακά στρώματα του εδάφους και οι οποίες έχουν σαν αποτέλεσμα τη μείωση της σοδειάς και της ποιότητας των φυτικών καλλιεργειών (Koiike και συνεργάτες, 2007). Οι υπεύθυνοι για τις ασθένειες μικροοργανισμοί έχουν τη δυνατότητα να πλήξουν μεγάλη ποικιλία καλλιεργειών όταν τα εδάφη δεν καλλιεργηθούν για μεγάλα χρονικά διαστήματα (Koiike και συνεργάτες, 2007). Ταυτόχρονη προσβολή από πολλαπλούς παθογόνους μικροοργανισμούς πολλές φορές οδηγεί σε μια πολύπλοκη ασθένεια, η οποία μπορεί να καταστρέψει περαιτέρω την καλλιέργεια. Οι συγκεκριμένες ασθένειες είναι δύσκολο να προληφθούν και να διαγνωστούν και σε συνδυασμό με το γεγονός ότι το έδαφος είναι ένα ιδιαίτερος σύνθετο περιβάλλον, η κατανόηση του μηχανισμού δράσης των παθογόνων μικροοργανισμών, που προκαλούν επιβαρυντικές για το έδαφος ασθένειες είναι εξαιρετικά δύσκολη.

Στα περισσότερα αγροτικά οικοσυστήματα, οι μικροοργανισμοί που προκαλούν επιβαρυντικές για το έδαφος ασθένειες αποτελούν την κύρια αιτία της μείωσης της απόδοσης σε προϊόντα με μεγάλη εμπορική σημασία. Επίσης, είναι πιο απειθαρχοί στη διαχείριση και τον έλεγχό τους σε σχέση με τους παθογόνους μικροοργανισμούς, που προσβάλλουν υπέργεια τμήματα των φυτών (Bruehl, 1987). Οι παθογόνοι μικροοργανισμοί του εδάφους έχουν προσαρμοστεί να επιβιώνουν και να αναπτύσσονται σ' όλους τους εδαφικούς ορίζοντες (A_0 , A_1 , A_2 , B_1 , B_2) (Εικόνα 1.1) αλλά η ριζόσφαιρα είναι το κύριο πεδίο της μόλυνσης, όπου η συνύπαρξη του παθογόνου παράγοντα με το φυτό εγκαθιστά μια παρασιτική σχέση. Στο πεδίο αυτό, επίσης, δημιουργείται μια πολύπλοκη βιοκοινότητα με τη συμμετοχή τόσο του μικροβιακού φορτίου όσο και της μικροπανίδας, της οποίας η αλληλεπίδραση με τον παθογόνο παράγοντα θα καθορίσει την έκβαση της ασθένειας (Raaijmakers και συνεργάτες, 2009).

Τα συμπτώματα των πιο κοινών ασθενειών, που προκαλούνται από επιβαρυντικούς για το έδαφος παθογόνους μικροοργανισμούς, περιλαμβάνουν φαινόμενα σήψης, τα

οποία επηρεάζουν τους υπόγειους φυτικούς ιστούς καθώς και τον αγγειακό μαρασμό, ο οποίος εξαπλώνεται μετά από μόλυνση των ριζών. Σε λίγες περιπτώσεις προκαλούνται συμπτώματα στο φύλλωμα των φυτών ή/και καταστροφή των υπέργειων τμημάτων των φυτών.



Εικόνα 1.1. Κάθετη τομή εδάφους στην οποία διακρίνονται οι εδαφικοί ορίζοντες A₀, A₁, A₂, B₁, B₂ και ο ορίζοντας C.

Υπάρχουν τέσσερις κύριες ομάδες φυτοπαθογόνων μικροοργανισμών (Agrios, 2005) αλλά μόνο οι δύο από αυτές παίζουν σημαντικό ρόλο στο έδαφος. Σε αυτές ανήκουν οι μύκητες και οι νηματώδεις. Μόνο λίγα βακτήρια σχετίζονται με επιβαρυντικές για το έδαφος ασθένειες καθώς για τον σκοπό αυτό αποτελεί βασική προϋπόθεση η ικανότητα σχηματισμού σπορίων, τα οποία θα εξυπηρετούν τη μακρόχρονη επιβίωση των μικροοργανισμών στο έδαφος. Κατά συνέπεια τα βακτήρια, που δε σχηματίζουν σπόρια αποκλείονται. Επιπλέον, τα βακτήρια, όπως και οι ιοί, απαιτούν μια πύλη εισόδου στον φυτικό ιστό προκειμένου να εισχωρήσουν και να τον μολύνουν. Οι ιοί δεν ανήκουν στους συνήθεις παράγοντες που προκαλούν φυτικές ασθένειες, οι οποίες ξεκινούν από το έδαφος. Αντίθετα, οι μύκητες είναι οι πλέον κοινοί φυτοπαθογόνοι μικροοργανισμοί, που προκαλούν επιβαρυντικές για το έδαφος ασθένειες. Σχεδόν όλοι οι φυτοπαθογόνοι μύκητες εκδηλώνουν την παθογόνο δράση τους παράγοντας ένζυμα και τοξίνες, τα οποία νεκρώνουν τους ιστούς-στόχους, χωρίς να απαιτούν ζωντανά κύτταρα από τα οποία θα πάρουν θρεπτικά συστατικά. Οι φυτοπαθογόνοι μύκητες εντάσσονται σε πέντε ταξινομικές ομάδες με βάση τα μορφολογικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά τους. Αυτοί είναι: οι Πλασμοδιοφορομύκητες, οι

Ζυγομύκητες, οι Οωμύκητες, οι Ασκομύκητες και οι Βασιδιομύκητες (Koike και συνεργάτες, 2007). Ενώ το τυπικό λεπτότοιχο μυκήλιο πολλών μυκήτων επιβιώνει για μικρά χρονικά διαστήματα στο έδαφος, πολλοί από αυτούς τους μύκητες παρατείνουν την επιβίωσή τους στο έδαφος επειδή είναι σε θέση να σχηματίζουν ευέλικτες δομές επιβίωσης, όπως μελανόχρωμο μυκήλιο, γλαμυδοσπόρια, ωσπόρια ή σκληρότητα. Στο έδαφος ζουν σαπροβιοτικά, πάνω σε κατεστραμμένους φυτικούς ιστούς ή σε άλλου τύπου εδαφικό οργανικό υλικό.

Μοιράζονται το εδαφικό περιβάλλον με πολλούς άλλους μικροοργανισμούς και ανταγωνίζονται με αυτούς για περιορισμένες πηγές θρεπτικών στοιχείων. Πολλοί από τους υπόλοιπους μικροοργανισμούς είναι άμεσα ή έμμεσα ανταγωνιστές των φυτοπαθογόνων μυκήτων. Ο άμεσος ανταγωνισμός λαμβάνει χώρα όταν ένας μικροοργανισμός εκτοπίζει έναν παθογόνο ή όταν παρασιτεί σε αυτόν. Κατά τον έμμεσο ανταγωνισμό παράγονται από το μικροβιακό φορτίο του εδάφους τοξικές ενώσεις, οι οποίες περιορίζουν τους φυτοπαθογόνους μύκητες. Εδάφη που διαθέτουν τέτοιους ανταγωνιστικούς μικροοργανισμούς αναφέρονται ως «κατασταλτικά εδάφη» (suppressive soils). Το ενδιαφέρον των ερευνητών εστιάζεται στη δημιουργία συνθηκών «κατασταλτικού εδάφους» εισάγοντας μικροοργανισμούς στα εδάφη (Hornby, 1983, Mazzola, 2007)

1.2. ΟΙ ΦΥΤΟΠΑΘΟΓΟΝΟΙ ΜΥΚΗΤΕΣ *Rhizoctonia solani* ΚΑΙ *Fusarium oxysporum*

Οι μύκητες *Rhizoctonia solani* και *Fusarium oxysporum* διαθέτουν αντιπροσώπους γνωστούς για την παθογόνο δράση τους σε κοινά καλλιεργούμενα φυτικά είδη. Στις ενότητες που ακολουθούν παραθέτονται στοιχεία για τη μορφολογία, την ανατομία, την ταξινόμηση και την παθογένεια των μυκήτων αυτών.

1.2.1. Γενικά χαρακτηριστικά του μύκητα *Rhizoctonia solani*

Ο μύκητας *Rhizoctonia solani* είναι το πιο ευρέως αναγνωρισμένο είδος *Rhizoctonia*. Ο μύκητας περιγράφηκε με ακρίβεια το 1858 από τον Julius Kühn σε μολυσμένες πατάτες. Ο *Rhizoctonia solani* είναι βασιδιομύκητας, που δεν παράγει φυλετικά

σπόρια (κονίδια) παρά μόνο περιστασιακά (βασιδιοσπόρια). Στη φύση, ο *Rhizoctonia solani* αναπαράγεται αφυλετικά και υπάρχει βασικά ως βλαστητικό μυκήλιο και/ή σκληρώτια. Σε αντίθεση με πολλούς άλλους βασιδιομύκητες, τα βασιδιοσπόρια δεν εγκλείονται σε παχύνσεις ή καρπικά σωματία. Οι φυλετικές υφές και τα βασιδιοσπόρια παρατηρήθηκαν για πρώτη φορά και περιγράφηκαν λεπτομερώς από τους Prillieux & Delacroix το 1891. Το φυλετικό στάδιο του *Rhizoctonia solani* έχει υποβληθεί σε διάφορες αλλαγές ονόματος από το 1891, αλλά σήμερα είναι γνωστό σαν *Thanatephorus cucumeris* (Parmeter και συνεργάτες, 1969)

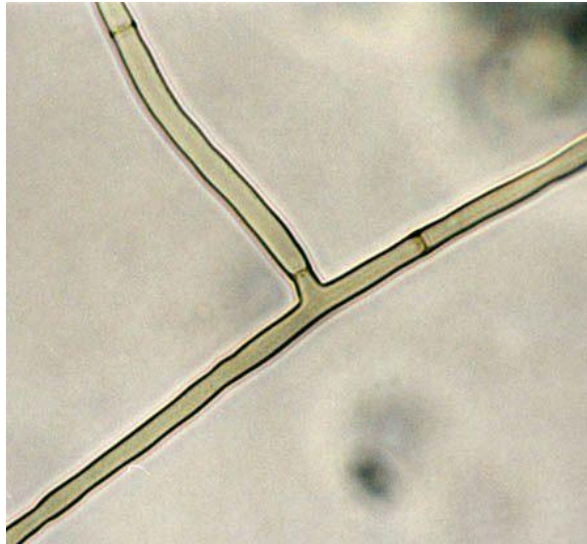
1.2.1.1. Μορφολογικά και ανατομικά χαρακτηριστικά του φυτοπαθογόνου μύκητα *Rhizoctonia solani*.

Ο *Rhizoctonia solani* και οι άλλοι μύκητες του γένους *Rhizoctonia* διαθέτουν άχρωμο νεαρό βλαστητικό μυκήλιο ενώ όταν αυτό μεγαλώνει και ωριμάζει χρωματίζεται καφετί (Εικόνα 1.2).



Εικόνα 1.2. Μικροσκοπική απεικόνιση υφών (νεαρών και ώριμων) του μύκητα *Rhizoctonia solani* (Cornell University)

Το μυκήλιο συνίσταται από υφές διαμερισματοποιημένες σε ξεχωριστά κύτταρα. Η διαμερισματοποίηση γίνεται από σέπτα (διαφράγματα) που φέρουν δακτυλιοειδούς σχήματος πόρο. Αυτός ο πόρος επιτρέπει τη μετακίνηση κυτοπλάσματος, μιτοχονδρίων και πυρήνων από κύτταρο σε κύτταρο. Κάθε κύτταρο της υφής περιέχει συνήθως τρεις πυρήνες. Η υφή συχνά διακλαδίζεται προς τα δεξιά σχηματίζοντας οξεία γωνία, η πλευρική υφή είναι ελαφρώς προσκολλημένη στην κύρια υφή και συχνά ένα διάφραγμα χωρίζει τη διακλάδωση από την υφή προέλευσης (Εικόνα 1.3).



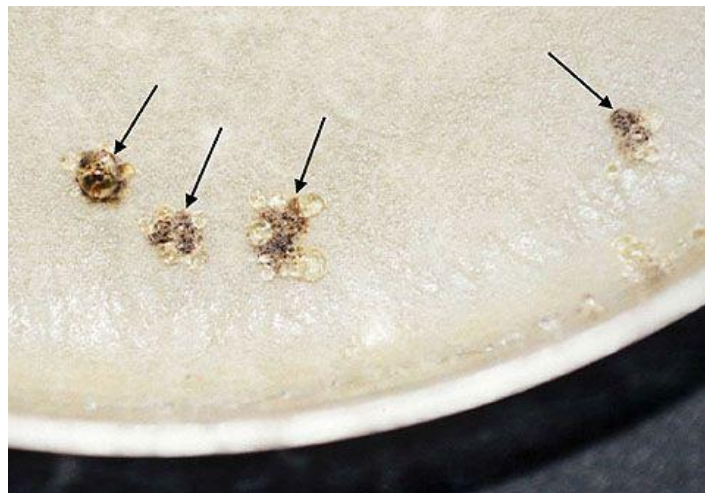
Εικόνα 1.3. Υφή του μύκητα *Rhizoctonia solani*. Η υφή διακλαδίζεται προς τα δεξιά, μεταξύ της πλευρικής και της κύριας υφής παρατηρείται πρόσφυση και διαχωρίζονται με διάφραγμα.

Επιπλέον, παράγουν ειδικές υφές, που αποτελούνται από συμπαγή κύτταρα, τα οποία ονομάζονται monilioid cells (Εικόνα 1.4). Τα κύτταρα αυτά συντήκονται και παράγουν σκληρές δομές, που ονομάζονται σκληρώτια (Εικόνα 1.5), τα οποία είναι ανθεκτικά σε ακραίες αλλαγές στις περιβαλλοντικές συνθήκες, επιτρέποντας έτσι στον μύκητα να επιβιώνει υπό αντίξοες συνθήκες (Tredway και Burpee, 2001).

Η ανατομία του πόρου του διαφράγματος καθώς και ο αριθμός των πυρήνων ανά κύτταρο έχουν εκτενώς χρησιμοποιηθεί από ερευνητές για να διαφοροποιήσουν τον *Rhizoctonia solani* από τους άλλους μύκητες του γένους *Rhizoctonia*. Έτσι ο *Rhizoctonia solani* χαρακτηρίζεται από: 1) παρουσία περισσότερων από δύο πυρήνων ανά κύτταρο της υφής, που εντοπίζονται στα άκρα των κυττάρων, 2) η διάμετρος της κύριας υφής είναι μεγαλύτερη των 7 μm , 3) το χρώμα του μυκηλίου από κιτρινωπό έως σκούρο καφετί, 4) τα σκληρώτια (όταν υπάρχουν) είναι ακανόνιστου σχήματος, χρωματισμένα από φωτεινό έως σκούρο καφετί, χωρίς διαφοροποίηση σε φλοιό και μυελό και τα οποία ως τελεομορφή έχουν το *Thanatephorus cucumeris* (Ceresini και συνεργάτες, 1999).



Εικόνα 1.4. Συμπαγή κύτταρα του μύκητα *Rhizoctonia solani*. Παράγουν εξειδικευμένες υφές σε πυκνά συσσωματώματα με σκοπό να σχηματιστούν ανθεκτικές δομές επιβίωσης.



Εικόνα 1.5. Σκληρώτια του μύκητα *Rhizoctonia solani*, που δημιουργούνται στην επιφάνεια στερεού θρεπτικού υποστρώματος δεξτρόζης πατάτας, στο οποίο αναπτύσσεται ο μύκητας.

Εξαιτίας του ότι ο *Rhizoctonia solani* και οι άλλοι μύκητες του γένους *Rhizoctonia* δεν παράγουν κονίδια και μόνο σπάνια παράγουν βασιδιοσπόρια, η κατάταξη αυτών των μυκήτων ήταν δύσκολη. Στη δεκαετία του '60, οι ερευνητές προκειμένου να κατατάξουν τους μύκητες *Rhizoctonia* εστίαζαν κυρίως σε μορφολογικές διαφορές που γίνονταν ορατές σε καλλιέργειες των μυκήτων σε διάφορα θρεπτικά υποστρώματα και/ή στην παθογένειά τους εναντίον διαφόρων φυτικών ειδών. Στα 1969, ο Parmeter και συνεργάτες στο Πανεπιστήμιο της Καλιφόρνια στο Berkeley, επαναπροσδιόρισαν την ιδέα της "αναστόμωσης των υφών" (hyphal anastomosis) για να χαρακτηρίσουν και να ταυτοποιήσουν τον *Rhizoctonia*. Συγκεκριμένα, στελέχη *Rhizoctonia* που είχαν τη δυνατότητα να αναγνωρίζονται και να συντήκονται μεταξύ τους ήταν γενετικά συγγενικά ενώ όσα στελέχη δεν είχαν αυτή τη δυνατότητα δε συγγένευαν γενετικά.

1.2.1.2. Παθογένεια του μύκητα *Rhizoctonia solani*

Ο μύκητας *Rhizoctonia solani* είναι ένας κοινός φυτοπαθογόνος μύκητας ικανός να προκαλεί ασθένειες σε πολλά καλλιεργούμενα φυτά, τα οποία παρουσιάζουν οικονομικό ενδιαφέρον. Τέτοια φυτά είναι η πατατιά και η ντοματιά (Latorre, 2004, Montealegre και συνεργάτες, 2010), το βαμβάκι (Abd-Elsalam και συνεργάτες, 2010), η φασολιά (Balali and Kowsari 2004, Godoy-Lutz και συνεργάτες, 2008, Nerey και συνεργάτες, 2010) (Εικόνα 1.5), το ζαχαροκάλαμο (Sadeghi και συνεργάτες, 2009, Hanson, 2010, Kluth και συνεργάτες, 2010) και άλλα.

Ο φυτοπαθογόνος μύκητας *Rhizoctonia solani* αρχικά προσβάλλει υπόγεια μέρη του φυτού όπως τα σπέρματα, τα υποκοτύλια και τις ρίζες αλλά είναι επίσης ικανός να μολύνει και υπέργεια τμήματα του φυτού, όπως για παράδειγμα τα περικάρπια, τους καρπούς, τα φύλλα και τον βλαστό. Το κοινό σύμπτωμα των ασθενειών που προκαλούνται από τον μύκητα είναι ο μαρασμός και περιγράφεται από ανικανότητα βλάστησης των σπερμάτων, που έχουν υποστεί σοβαρή μόλυνση ενώ προσβεβλημένα σπορόφυτα είναι δυνατό να νεκρώνονται τόσο πριν όσο και μετά την ανάδυσή τους από το έδαφος. Τα μολυσμένα σπέρματα που δεν νεκρώνονται από τον μύκητα συχνά παρουσιάζουν καρκινώματα, που εμφανίζονται σαν κοκκινοκαφέ πηλιδές πάνω στο βλαστό και τις ρίζες. Επιπρόσθετα στην προσβολή υπόγειων φυτικών τμημάτων, ο μύκητας μπορεί περιστασιακά να μολύνει καρπούς και φύλλα, που βρίσκονται κοντά

ή πάνω στην επιφάνεια του εδάφους. Αυτός ο τύπος ασθένειας συχνά δημιουργείται εξαιτίας του ότι το μυκήλιο και/ή τα σκληρώτια του μύκητα είναι κοντά ή βυθισμένα στον φυτικό ιστό (Ceresini και συνεργάτες, 1999).



Εικόνα 1.6. Ρίζες φασολιάς που έχουν προσβληθεί από το μύκητα *Rhizoctonia solani* (IPM, The Bulletin (14), 2006)

Παρόλο που οι περισσότερες ασθένειες που προκαλούνται από τον *Rhizoctonia* προέρχονται από το μυκήλιο και/ή τα σκληρώτια, διάφορες σοβαρές ασθένειες των φασολιών, του σακχαροκάλαμου και του καπνού, έχουν ως αιτία τους τη μόλυνση από τα βασιδιοσπόρια. Αυτά τα βασιδιοσπόρια αναφέρονται επίσης και ως η πηγή για γρήγορη και μεγάλης απόστασης διασπορά του μύκητα. Σ' αυτές τις περιπτώσεις η εξέλιξη της νόσου στο φυτό είναι δυνατό να παρακολουθηθεί και με γυμνό μάτι. Από το επίπεδο του εδάφους, ο μύκητας ανέρχεται καλύπτοντας με μια γκριζωπή ινώδη μεμβράνη τα ανώτερα μέρη των ριζών, τον βλαστό ακόμα και τον μίσχο των κατώτερων φύλλων. Η μεμβράνη αυτή είναι το μυκήλιο του μύκητα, του οποίου τα πιο ώριμα τμήματα καλύπτονται από υμένιο, στο οποίο εντοπίζονται ομάδες βασιδίων, που φέρουν ένα σπόριο σε καθένα από τα τέσσερα στηρίγματά τους (Parmeter και συνεργάτες, 1969). Τα βασιδιοσπόρια βλαστάνουν παράγοντας υφές οι οποίες μολύνουν φύλλα κατά τη διάρκεια περιόδων υψηλής υγρασίας και περιόδων εκτεταμένων βροχοπτώσεων. Υπό αυτές τις συνθήκες, τα βασιδιοσπόρια μπορεί συχνά να παρατηρούνται στη βάση των βλαστών κοντά στην επιφάνεια του εδάφους ή στην κάτω επιφάνεια των φύλλων (Ceresini και συνεργάτες, 1999, Sneh και συνεργάτες, 1996).

Ο *Rhizoctonia solani* επιβιώνει στο έδαφος σαπροφυτικά τόσο ως μυκήλιο, αποικίζοντας το οργανικό υλικό του εδάφους όσο και ως σκληρώτια. Με τη μορφή σκληρωτίων, δηλαδή μικρών (διαμέτρου 1 έως 3 mm), ακανόνιστου σχήματος, καφέ έως μαύρων σχηματισμών εξασφαλίζει τη μακροχρόνια παρουσία του μέσα στο έδαφος και πάνω στους φυτικούς ιστούς. Κυρίως τα στελέχη *Rhizoctonia solani* που είναι παθογόνα για το ρύζι, έχουν αναπτύξει την ικανότητα να παράγουν σκληρώτια με ένα παχύ εξωτερικό στρώμα, το οποίο τους επιτρέπει να επιπλέουν και να επιβιώνουν στο νερό. Τα σκληρώτια και/ή το μυκήλιο που παρίστανται στο έδαφος ή στο φυτικό ιστό βλαστάνουν για να παράγουν βλαστητικές υφές του μύκητα οι οποίες μπορούν και προσβάλλουν ένα ευρύ φάσμα συγκομιδών (Ceresini και συνεργάτες, 1999).

Ο μύκητας έλκεται από το φυτό μέσω χημικών διεγερτικών που απελευθερώνονται από ενεργά αναπτυσσόμενα κύτταρα και/ή φυτικά μέρη σε αποσύνθεση. Καθώς η διαδικασία της προσέλευσης προχωρά, οι υφές του μύκητα θα έρθουν σε επαφή με το φυτό και θα ακουμπήσουν στην εξωτερική του επιφάνεια. Μετά την επαφή, ο μύκητας συνεχίζει να μεγαλώνει στην εξωτερική επιφάνεια του φυτού και θα προκαλέσει ασθένεια παράγοντας έναν ειδικό μολυσματικό παράγοντα που διαπερνά το φυτικό κύτταρο και ελευθερώνει θρεπτικά συστατικά προκειμένου να εξασφαλισθεί η συνεχόμενη ανάπτυξη του μύκητα. Η πορεία της μόλυνσης προωθείται από την παραγωγή μιας πλειάδας διαφορετικών εξωκυτταρικών ενζύμων, τα οποία αποικοδομούν ποικιλία συστατικών των φυτικών κυτταρικών τοιχωμάτων (π.χ. κυτταρίνη, χιτίνη και πηκτίνη). Ενώ ο μύκητας θανατώνει τα φυτικά κύτταρα, οι υφές του εξακολουθούν να αναπτύσσονται και να εποίκουν νεκρούς ιστούς, συχνά σχηματίζοντας σκληρώτια. Έτσι, παράγονται νέες εστίες λοίμωξης πάνω ή μέσα στον ιστό του ξενιστή και ένας νέος μολυσματικός κύκλος επαναλαμβάνεται όταν νέα υποστρώματα είναι διαθέσιμα (Sneh και συνεργάτες, 1996).

1.2.1.3. Στρατηγικές ελέγχου των φυτικών ασθενειών που προκαλούνται από τον μύκητα *Rhizoctonia solani*

Μέχρι σήμερα, ο έλεγχος της παθογένειας του *Rhizoctonia solani* στις καλλιέργειες σχετίζεται με κοινές αγροτικές πρακτικές.

Δεδομένου ότι ο μύκητας προσβάλλει μόνο τις ρίζες των πολύ νεαρών φυτών, οτιδήποτε μπορεί να προωθήσει και να επιταχύνει την ανάπτυξη των ριζών είναι δυνατόν να περιορίσει την ασθένεια. Για το σκοπό αυτό ο επαρκής εμπλουτισμός του εδάφους με θρεπτικά συστατικά, κυρίως άζωτο, φώσφορο και ψευδάργυρο, όργωση του εδάφους για αερισμό του, ειδικά σε συμπαγή εδάφη και σπορά σε θερμά εδάφη (όπου αυτό είναι δυνατό) βοηθούν τη γρήγορη ανάπτυξη ριζών προλαμβάνοντας έτσι τη μόλυνσή τους από τον μύκητα (Sullivan, 2004).

Επιπλέον, όργωση της καλλιεργήσιμης έκτασης μία έως δύο εβδομάδες πριν τη σπορά του με σκοπό το σπάσιμο του δικτύου των υφών του μύκητα που έχουν αναπτυχθεί στο έδαφος μπορεί να αποβεί πολύ αποτελεσματική.

Σημαντική, ωστόσο, είναι και η επιλογή του καλλιεργούμενου φυτού. Η Canola και τα όσπρια είναι συνήθως λιγότερο ευπαθή από τα δημητριακά ενώ μεταξύ των δημητριακών πιο ανθεκτική είναι η βρώμη και ακολουθεί το τριτικάλε, το σιτάρι και το κριθάρι, το οποίο είναι και το πιο ευπαθές (Sullivan, 2004).

Τέλος, ενίσχυση ώριμων καλλιεργειών με άζωτο είναι δυνατό να περιορίσει τις απώλειες κατά το ήμισυ.

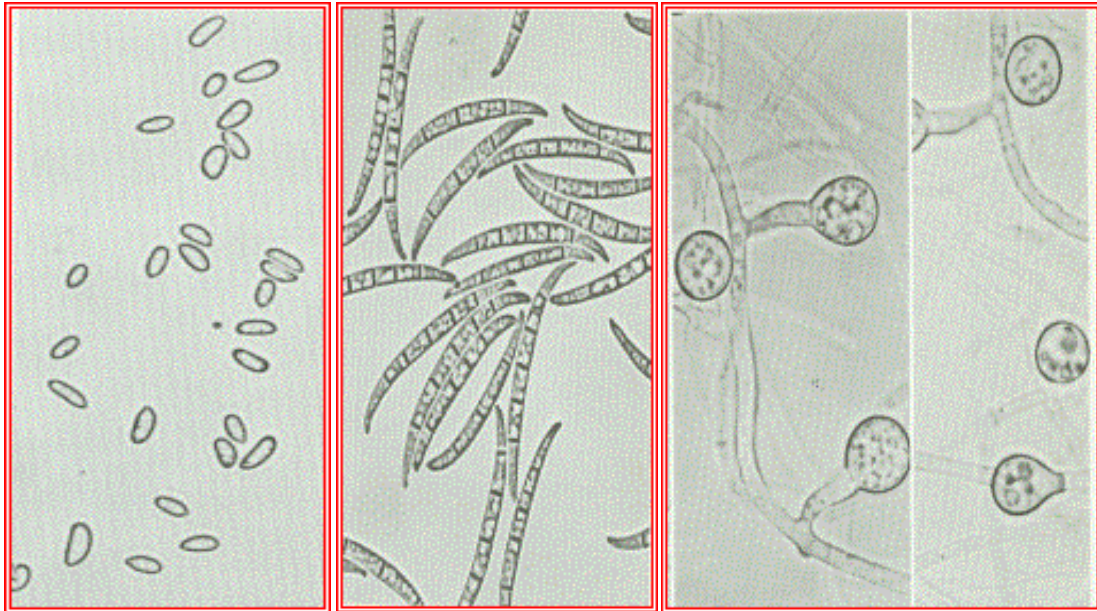
1.2.2. Γενικά χαρακτηριστικά του φυτοπαθογόνου μύκητα *Fusarium oxysporum*

Ανάλογα με τη δομή των υφών πάνω ή μέσα στις οποίες δημιουργούνται οι κονιδιοφορείς, το *Fusarium spp.* κατατάσσεται στην υποκλάση των Hyphomycetidae των Δευτερομυκήτων. Όμως, εξαιτίας της πολύ μεγάλης ποικιλομορφίας στο επίπεδο του γένους θεωρείται μία από τις πιο δύσκολες ομάδες μυκήτων στην ταξινόμησή τους κατάταξη (Alexopoulos και Mims 1979). Ο Booth (1971) χαρακτήρισε το *F. oxysporum* ως κοσμοπολίτικο, εδαφικό, νηματοειδή μύκητα. Πρόκειται για ένα αναμορφικό είδος που περιλαμβάνει πολυάριθμα φυτοπαθογόνα στελέχη, που προκαλούν αδρομυκώσεις σε ένα ευρύ φάσμα αγροτικών και διακοσμητικών φυτικών καλλιεργειών (Appel και Gordon, 1996).

Το *F. oxysporum* είναι ατελής μύκητας και παράγει τρεις τύπους σπορίων: μικροκονίδια, μακροκονίδια και γλαμυδοσπόρια (Nelson και συνεργάτες, 1983) (Εικόνα 1.6). Τα κονίδια παράγονται σε μονοφιαλίδες και σε σποριάγγεια, τα οποία διατάσσονται χαλαρά στην επιφάνεια του μυκηλίου (Griffin, 1994). Τα μικροκονίδια είναι μονοκύτταρα ή δικύτταρα και είναι τα πιο άφθονα, ενώ παράγονται υπό

οποιοσδήποτε συνθήκες (Agiros, 1988). Είναι κυρίως μονοπύρηνια και βλαστάνουν χωρίς κάποιο συγκεκριμένο πρότυπο, με βλαστητική ικανότητα που κυμαίνεται από 1-20 % (Ebbole και Sachs, 1990). Τα μακροκονίδια αποτελούνται από τρία ως πέντε κύτταρα και συναντώνται κυρίως στην επιφάνεια φυτών που έχουν θανατωθεί από τον μύκητα (Agiros, 1988). Παράγονται σε αφθονία και είναι πολυπύρηνια, επιπλέον βλαστάνουν ταχύτατα αποτελώντας τον πιο αποδοτικό τρόπο αναπαραγωγής του μύκητα. Η μορφή αυτών των σπορίων έχει χρησιμοποιηθεί στη διάκριση ανάμεσα στα είδη του μύκητα (Toussoun και Nelson, 1968). Τα χλαμυδοσπόρια είναι κατά κανόνα σφαιρικά και παχύτοιχα, μπορεί να είναι μονοκύτταρα και πιο σπάνια δικύτταρα (Agiros, 1988). Είναι ικανά για ανεξάρτητη επιβίωση και ανάπτυξη, πρόκειται για μιτωτικά παραγόμενα βοηθητικά σπόρια, τα οποία είτε προέρχονται από τη δομική τροποποίηση τμήματος ή τμημάτων βλαστητικών υφών, είτε από λεπτότοιχα κονιδιακά κύτταρα που αποτελούνται κυρίως από νεοσυντεθημένα τοιχωματικά υλικά (Schippers και Van Eck, 1981). Ο κύριος ρόλος τους είναι η επιβίωση στο έδαφος. Ο μορφολογικός χαρακτηρισμός του *F. oxysporum* βασίζεται στο σχήμα των μακροκονιδίων, στη δομή των μικροκονιδιοφορέων και στον τρόπο δημιουργίας και τη διεύθυνση των χλαμυδοσπορίων (Beckman, 1987). Μη φυλετική αναπαραγωγή στο *F.oxysporum* επιτυγχάνεται με τα μακροκονίδια και μικροκονίδια, ενώ φυλετική αναπαραγωγή ουδέποτε έχει παρατηρηθεί (Booth, 1971).

Οι φυτοπαθογόνες μορφές του *F. oxysporum* διακρίνονται σε ειδικές μορφές [*formae speciales* (*ff.spp.*)] ανάλογα με τα φυτά ξενιστές που προσβάλλουν (Armstrong και Armstrong, 1981). Επιπλέον υποδιαιρέσεις των ειδικών μορφών (*ff.spp.*) σε φυλές συχνά γίνονται βάσει της παθογένειας του μύκητα σε επιμέρους ποικιλίες των φυτικών ειδών, που προσβάλλει η εκάστοτε ειδική μορφή (*f.sp.*) του *F. oxysporum* (Correll, 1991). Η γενετική βάση της εξειδίκευσης ως προς τον ξενιστή (*formae speciales*) και της εξειδίκευσης ως προς την ποικιλία του ξενιστή (φυλές) για το *F. oxysporum* δεν είναι γνωστή (Baayen και συνεργάτες, 2000). Αυτοί οι παθογόνοι μύκητες είναι μορφολογικά αδιάκριτοι μεταξύ τους, όπως επίσης και από μη παθογόνους.



1.

2.

3.

Εικόνα 1.6. 1: Μικροκονίδια, 2: Μακροκονίδια, 3: Χλαμυδοσπόρια (<http://www.mycologia.org/cgi/content/full/100/5/746>)

Η σύντηξη υφών και η δημιουργία ετεροκαρύου ανάμεσα σε δύο στελέχη μπορεί να συμβεί ανεξάρτητα από τη φυλετική αναπαραγωγή, αλλά συνήθως συμβαίνει μόνο ανάμεσα σε στελέχη με παρόμοιους γονοτύπους (Kistler, 1997). Τα στελέχη, που χαρακτηρίζονται από την ικανότητά τους για ετεροκαρύωση οργανώνονται σε «βλασθητικές ομάδες συμβατότητας» (Vegetative Compatible Groups, VCGs) (Puhalla, 1985). Κάποιες ειδικές μορφές (*ff.spp.*) ανταποκρίνονται σε μία μόνο VCG, ενώ άλλες περιλαμβάνουν μερικές VCGs. Ο Katan (1999) ανέφερε 59 VCGs για 38 ειδικές μορφές (*ff.spp.*). Ο προσδιορισμός των VCGs, συνεπώς, δε μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως καθολικό εργαλείο για την ταυτοποίηση των ειδικών μορφών του *F. oxysporum* (Fravel και συνεργάτες, 2003).

Εξαιτίας των δυσκολιών στην κατάταξη των αντιπροσώπων του γένους *Fusarium* σε είδη, αλλά και των ειδών σε μικρότερες ταξινομικές ομάδες με βάση τα μορφολογικά χαρακτηριστικά, οι προσπάθειες ταξινόμησης έχουν πλέον στραφεί σε μοριακές τεχνικές. Οι μοριακές αυτές τεχνικές περιλαμβάνουν Αλληλούχηση Πολυμορφισμών Μεγέθους Περιοριστικών Τμημάτων (Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP) και Τυχαία Ενίσχυση Πολυμορφικού DNA (Random Amplified Polymorphic DNA, RAPD) (Visser, 2003). Ο προσδιορισμός των *formae speciales*, δυστυχώς,

ακόμα βασίζεται σε χρονοβόρες διαδικασίες δοκιμασίας της παθογένειας του μύκητα έναντι διαφόρων φυτικών ειδών (Fravel και συνεργάτες, 2003).

1.2.2.1. Κύκλος ζωής του *Fusarium oxysporum*

Ο κύκλος ζωής του *F. oxysporum* ξεκινά με τη σαπροφυτική φάση κατά την οποία ο μύκητας επιβιώνει στο έδαφος με τη μορφή γλαμυδοσπορίων (Beckman και Roberts, 1995). Τα γλαμυδοσπόρια παραμένουν αδρανή σε υπολείμματα αποσυντεθημένων φυτικών ιστών μέχρι να διεγερθούν σε βλάστηση από τη δέσμευση εξειδικευμένων θρεπτικών που απελευθερώνονται από τις αναπτυσσόμενες ρίζες μιας ποικιλίας φυτών (Stover, 1962a,b, Beckman και Roberts, 1995). Μετά τη βλάστηση δημιουργείται ένας μικρός θαλλός ο οποίος σε 6 με 8 ώρες παράγει κονίδια και γλαμυδοσπόρια σε 2 με 3 ημέρες, αν οι συνθήκες είναι ευνοϊκές. Η προσβολή των ριζών ξεκινά με τη διείσδυση στα επιδερμικά κύτταρα φυτών ξενιστών ή μη ξενιστών (Beckman και Roberts, 1995) και συνεχίζεται με τη δημιουργία συστηματικών αγγειακών ασθενειών στα φυτά ξενιστές (Stover, 1970). Σε προχωρημένα στάδια της ασθένειας, ο μύκητας μεγαλώνει εκτός του αγγειακού συστήματος μέσα στα γειτονικά παρεγχυματικά κύτταρα, παράγοντας τεράστιες ποσότητες κονιδίων και γλαμυδοσπορίων. Το *F. oxysporum* επιζεί σε υπολείμματα προσβεβλημένων φυτών στο έδαφος υπό μορφή μυκηλίου και σε όλες τις μορφές σπορίων, με πιο συχνά τα γλαμυδοσπόρια σε περιοχές με πιο ψυχρά κλίματα (Agris, 1997).

Σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα, όπως σε PDA, οι διαφορετικές ειδικές μορφές (*ff.spp.*) του *F. oxysporum* μπορούν να έχουν ποικίλες εμφανίσεις. Γενικά, το αέριο μυκήλιο πρώτα εμφανίζεται λευκό, ενώ στη συνέχεια μπορεί να αλλάξει σε μια ποικιλία χρωμάτων, που κυμαίνεται από το μπλε μέχρι το βαθύ μωβ, ανάλογα με το στέλεχος ή τις ειδικές μορφές (*ff.spp.*). Αν τα σποριάγγεια είναι άφθονα, η αποικία μπορεί να εμφανίζεται κρεμ ή πορτοκαλί σε χρώμα (Smith και συνεργάτες, 1988).

1.2.2.2. Συνθήκες ανάπτυξης του μύκητα *Fusarium oxysporum*

Το βέλτιστο θερμοκρασιακό εύρος του μύκητα είναι μεταξύ 25 °C και 28 °C (AVRDC). Οι Cook και Baker (1983), σε μελέτες που έκαναν στον βιοέλεγχο των

φυτικών ασθενειών, παρατήρησαν ότι η ανάπτυξη του *Fusarium* είναι βέλτιστη στους 28 °C, αναστέλλεται επάνω από 33 °C, ενώ δεν ευνοείται για θερμοκρασίες κάτω των 17 °C. Ακόμα, έχει βρεθεί ότι η εμφάνιση της ασθένειας επηρεάζεται από τη θερμοκρασία του χώματος (Ben-Yephet και Shtienberg, 1997). Η ασθένεια είναι πιο διαδεδομένη σε όξινα, αμμώδη εδάφη (Wilson, 1946). Οι παθογόνοι αντιπρόσωποι του γένους είναι εδαφικοί και επιζούν πολλά χρόνια στο έδαφος απουσία ξενιστή (AVRDC).

1.2.2.3. Παθογένεια του μύκητα *Fusarium oxysporum*

Η διαδικασία της αγγειακής προσβολής από το *F.oxysporum* είναι πολύπλοκη και περιλαμβάνει μια σειρά υψηλά ρυθμιζόμενες διαδικασίες:

Προσκόλληση: Η μυκητιακή μόλυνση ξεκινά όταν οι μολυσματικές υφές προσκολλώνται στην επιφάνεια της ρίζας του φυτού ξενιστή (Bishop και Cooper, 1983a). Η προσκόλληση του μύκητα στην επιδερμίδα του ξενιστή δεν είναι μια ειδική διαδικασία, καθώς μπορεί να προσκολληθεί τόσο σε φυτά ξενιστές όσο και σε μη ξενιστές (Vidhyasekaram, 1997). Η τοποειδική πρόσδεση μπορεί να είναι σημαντική στην αγκυροβόληση των αναπαραγωγικών μονάδων του μύκητα στην επιφάνεια των ριζών, έτσι ώστε οι επιπλέον διαδικασίες που απαιτούνται για την αποίκιση να μπορούν να προωθηθούν (Recorbet και Alabouvette, 1997).

Διείσδυση: Η διείσδυση μπορεί να ελεγχθεί από ένα συνδυασμό διαφορετικών παραγόντων που περιλαμβάνουν τα μυκητιακά συστατικά, τις δομές στην επιφάνεια των ξενιστών, ενεργοποιητές ή αναστολείς της βλάστησης των μυκητιακών σπορίων και από τον σχηματισμό των βλαστητικών σωλήνων (Mengden και συνεργάτες, 1996). Συνεπώς, οι τρόποι με τους οποίους τα στελέχη του *Fusarium oxysporum*, που προκαλούν αδρομυκώσεις, διεισδύουν στις ρίζες μπορεί να διαφέρουν, ωστόσο υπάρχουν δύο διακριτοί τύποι. Σε κάποιες περιπτώσεις ο μύκητας εισβάλλει στη ρίζα άμεσα, ενώ σε άλλες προσβάλλει το φυτό έμμεσα διεισδύοντας από τραύματα του ιστού (Lucas, 1998). Τα πιο κοινά σημεία άμεσης διείσδυσης εντοπίζονται στην κορυφή τόσο των κεντρικών, όσο και των πλαγίων ριζών ή κοντά σε αυτές (Lucas, 1998). Το παθογόνο εισέρχεται στην κορυφαία περιοχή της ρίζας όπου η ενδοδερμίδα

δεν έχει πλήρως διαφοροποιηθεί και ο μύκητας μπορεί και αναπτύσσεται μέχρι να φτάσει το αναπτυσσόμενο πρωτοξύλωμα (Εικόνα 1.8).



Εικόνα 1.8. Προσβεβλημένες ρίζες από τον μύκητα *F. oxysporum*

(<http://www.slhfarm.com/alfalfapest.html>)

Κατά τη διάρκεια της αποίκησης, το μυκήλιο προωθείται διακυτταρικά διαμέσου του φλοιού της ρίζας μέχρι να φτάσει τα αγγεία του ξυλώματος, όπου και εισέρχεται σε αυτά μέσω βοθρίων (Bishop και Cooper, 1983b). Ο μύκητας μετά την είσοδό του στα αγγεία του ξυλώματος παραμένει αποκλειστικά εκεί, χρησιμοποιώντας τα αγγεία για να αποικήσει τον ξενιστή (Bishop και Cooper, 1983b). Η μυκητιακή αποίκηση του αγγειακού συστήματος του φυτού ξενιστή είναι άμεση και συχνά υποβοηθείται από τον σχηματισμό μικροκονιδίων μέσα στα στοιχεία του ξυλώματος (Beckman και συνεργάτες, 1961), τα οποία αποκολλώνται και παρασύρονται προς τα ανώτερα τμήματα του βλαστού (Bishop και Cooper, 1983b). Όταν οι διάτρητες πλάκες σταματούν τα σπόρια, αυτά βλαστάνουν και οι προεκβολές τους κινούνται κατά μήκος των διάτρητων πλακών. Οι υφές που αναπτύσσονται σχηματίζουν κονιδιοφορείς και κονίδια, τα οποία συμβάλουν στην περαιτέρω εξάπλωση του μύκητα (Beckman και συνεργάτες, 1961, Beckman και συνεργάτες, 1962). Ο μύκητας μπορεί ακόμη να κινηθεί εγκάρσια καθώς το μυκήλιο διεισδύει τα γειτονικά αγγεία του ξυλώματος διαμέσου των βοθρίων (Agris, 1988).

1.2.2.3.1. Εξέλιξη της ασθένειας

Η αδροφουζαρίωση (*Fusarium wilt*) είναι πολύ πιθανόν να οφείλεται σε έναν συνδυασμό παθογενικών δραστηριοτήτων. Αυτές περιλαμβάνουν τη συσσώρευση μυκηλίου στο ξύλωμα και/ή την παραγωγή τοξινών, τις αντιδράσεις άμυνας του ξενιστή, που περιλαμβάνει την παραγωγή γελών, ρητινών και την τύλωση και την καταστροφή των αγγείων από την εκβλάστηση γειτονικών παρεγχυματικών κυττάρων (Beckman και συνεργάτες, 1987). Τα συμπτώματα των αδρομυκώσεων φαίνονται να οφείλονται σε οξεία υδατική καταπόνηση, κυρίως λόγω της παρακώλησης της λειτουργίας των αγγείων. Τα συμπτώματα ποικίλουν αρκετά, αλλά περιλαμβάνουν συνδυασμούς των παρακάτω, δηλαδή διαφανοποίηση αγγείων, επιναστία των φύλλων, μαρασμό, χλώρωση, νέκρωση και αποκοπή φυτικών τμημάτων. Φυτά ξενιστές με σημαντική αδρομύκωση μαραίνονται και πεθαίνουν, ενώ φυτά επηρεασμένα σε μικρότερο βαθμό υπολείπονται στην ανάπτυξη και είναι μη παραγωγικά (MacHardy και Beckman, 1981). Το πιο εμφανές εσωτερικό σύμπτωμα είναι το σκούρο καφέ χρώμα που αποκτούν τα αγγειακά στοιχεία (MacHardy και Beckman, 1981).

Εξαιτίας της ανάπτυξης του μύκητα στο εσωτερικό των αγγείων, το υδατικό ισοζύγιο του φυτού επηρεάζεται σημαντικά. Αυτό το υδατικό έλλειμμα οδηγεί σε κλείσιμο των στομάτων των φύλλων, τα φύλλα κιτρινίζουν και ο ξενιστής τελικά πεθαίνει. Σε αυτό το σημείο ο μύκητας εισβάλλει στον παρεγχυματικό ιστό, μέχρι που φτάνει στην επιφάνεια του νεκρού ιστού, όπου και σποριώνει άφθονα (Agrios, 1988). Τα σπόρια που προκύπτουν αποτελούν απόθεμα για την περαιτέρω διασπορά του μύκητα.

Το γένος *Fusarium* χαρακτηρίζεται από την παραγωγή μυκοτοξινών. Από το 1984 έχουν συνολικά απομονωθεί και περιγραφεί 20 τοξίνες από 30 είδη του *Fusarium* (Moss και Smith, 1984). Οι τοξίνες παράγονται κυρίως στο καλαμπόκι, αλλά και σε άλλα σπέρματα, είτε κατά την ανάπτυξη αυτών είτε κατά την αποθήκευσή τους (Agrios, 1988).

1.2.2.3.2. Ξενιστές

Όπως αρκετοί άλλοι παθογόνοι μύκητες έτσι και το *F. oxysporum* έχει ορισμένες εξειδικευμένες μορφές – γνωστές ως ειδικές μορφές (*ff.spp.*) – οι οποίες προσβάλουν

μια ποικιλία ξενιστών προκαλώντας διάφορες ασθένειες. Οι συνήθεις ξενιστές είναι: η ντομάτα (f.sp. *lycopersici*), το σπαράγγι (f.sp. *asparagi*), η μπανάνα (f.sp. *cubense*), το γαρίφαλο (f.sp. *dianthi*), το τζίντζερ (f.sp. *zingiberi*), το καρπούζι (f.sp. *niveum*), το μπιζέλι (f.sp. *pisi*), η σόγια (f.sp. *tracheiphilum*), το πεπόνι (f.sp. *melonis*), το αγγούρι (f.sp. *cucurbitacearum*), το κρεμμύδι (f.sp. *cepaе*), το κυκλάμινο (f.sp. *cyclaminis*), η πατάτα (f.sp. *tuberosi*), η τουλίπα (f.sp. *tulipae*) και το βαμβάκι (f.sp. *vasinfectum*) (Gonsalves και Ferreira 1997, DSMZ).

Η προσβολή της ντομάτας αποτελεί και την πιο σημαντική, από οικονομική σκοπιά, ασθένεια που προκαλείται από το *F. oxysporum* (<http://www.cbwinfo.com>).

1.2.2.4. Αντιμετώπιση και έλεγχος του *Fusarium oxysporum*

Όταν το *Fusarium* εισαχθεί σε ένα νέο περιβάλλον είναι πολύ δύσκολο να απομακρυνθεί. Αναπτύσσεται και συντηρείται σε νεκρή οργανική ύλη ακόμη και απουσία κατάλληλου ξενιστή. Ο μοναδικός αποτελεσματικός τρόπος αντιμετώπισης είναι η αποστείρωση του χώματος, διαδικασία που είναι οικονομικά ανέφικτη για τους παραγωγούς. Μερικός έλεγχος μπορεί να επιτευχθεί με τη χρήση μυκητοκτόνων, αλλά η χρήση ανθεκτικών ποικιλιών είναι και η προτιμώμενη προσέγγιση στο πρόβλημα (Fravel και συνεργάτες, 2003).

Το πιο τρωτό σημείο του κύκλου της ασθένειας είναι η έλλειψη ενός φυσικού μηχανισμού διασποράς. Η αύξηση του εδαφικού pH σε 6,5 με 7 και η χρήση νιτρικών έναντι αμμωνιακών λιπασμάτων, περιορίζει σημαντικά την ανάπτυξη του *F. oxysporum*. Πρέπει να αποφεύγεται η άρδευση με μολυσμένο νερό. Η αμειψισπορά είναι ως επί το πλείστον αναποτελεσματική εξαιτίας των αποτελεσματικών στρατηγικών επιβίωσης του μύκητα (Botanic Garden Trust, <http://www.rbg Syd.nsw.gov.au>).

Σύμφωνα με τους Nelson και συνεργάτες (1981) τα μέτρα που πρέπει να λαμβάνονται για την αντιμετώπιση του παθογόνου είναι τα εξής:

1. Η χρήση ανθεκτικών μορφοτύπων του φυτού.
2. Η αποστείρωση του εδάφους, όπου είναι δυνατό πρακτικά και οικονομικά,

3. Η διαχείριση της εδαφικής γονιμότητας με τέτοιο τρόπο έτσι ώστε να μειωθεί η αύξηση, η σπορίωση και η παθογένεια του παθογόνου:

- Προσθήκη οξικών έτσι ώστε το εδαφικό pH να είναι τουλάχιστον 7,0.
- Αποφυγή της υπερβολικής χρήσης λιπασμάτων πλούσιων σε φωσφόρο και μαγνήσιο.
- Χρήση νιτρικών έναντι αμμωνιακών αλάτων ως πηγή αζώτου.
- Προσθήκη των λιπασμάτων σε ζώνες αυστηρά κοντά στις ρίζες των φυτών.
- Αγρανάπαυση πριν από τη σπορά.

4. Η αποφυγή χρήσης μολυσμένων φυταρίων ή σπόρων.

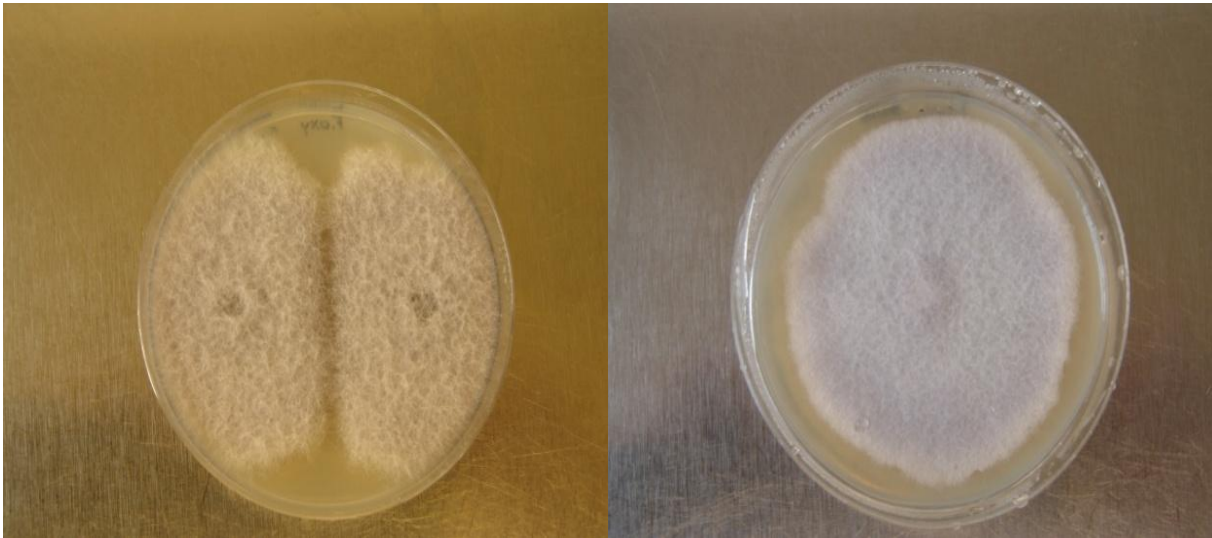
5. Η πρόληψη της διασποράς του παθογόνου με την αποφυγή μετακίνησης μολυσμένου χώματος σε ελεύθερες από την ασθένεια περιοχές (Nelson και συνεργάτες, 1981).

1.2.2.5. *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*

Η ασθένεια που προκαλεί το *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* (Εικόνα 1.9) στην ντομάτα ονομάζεται αδροφουζαρίωση (*Fusarium wilt*) (Geoplexus.net).

Τα βασικά συμπτώματα είναι η καθυστέρηση της ανάπτυξης, ο αποχρωματισμός των αγγειακών στοιχείων, τα οποία αποκτούν σκούρο καφέ χρώμα, χλώρωση, ο μαρασμός και τέλος ο θάνατος του φυτού (Εικόνα 1.10).

Στα νεαρά προσβεβλημένα φυτά τα γηραιότερα φύλλα κυρτώνουν και στρέφονται προς τα κάτω, ο αγγειακός ιστός σκουραίνει, το φυτό κιτρινίζει και τελικά πεθαίνει (Εικόνα 1.10). Σε μεγαλύτερα προσβεβλημένα φυτά, τα φύλλα κιτρινίζουν μετά την άνθηση. Στη συνέχεια το φυτό μαραίνεται κατά τις θερμότερες ώρες της ημέρας και μέσα σε μερικές μέρες, καταρρέει και πεθαίνει. Ο αγγειακός ιστός του βλαστού είναι σκούρος καφέ αλλά ο φλοιός παραμένει υγιής. Η μόλυνση μπορεί να επεκταθεί στους καρπούς, η οποία εμφανίζεται με τον χαρακτηριστικό αποχρωματισμό των αγγειακών στοιχείων. Η εμφάνιση της ασθένειας συχνά συσχετίζεται με μόλυνση από ριζοκόμβιους νηματώδεις (Janssen, 2002).



Εικόνα 1.9. *Fusarium oxysporum f.sp.lycopersici* ανεπτυγμένο σε θρεπτικό υπόστρωμα δεξτρόζης πατάτας (PDA, §2.2.3) (φωτογραφίες της παρούσας εργασίας).



Εικόνα 1.10. Ανθεκτικό στέλεχος ντομάτας (αριστερά) και φυσικός τύπος ντομάτας (δεξιά) προσβεβλημένα από *Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici*. (http://www.rogersadvantage.com/products/tomato_fusariumrace3.asp)

Η καλύτερη μέθοδος για τον έλεγχο της αδροφουζαρίωσης σε μικρής έκτασης καλλιέργειες είναι η χρήση μορφοτύπων με την ένδειξη VFN, που δηλώνει την

ανθεκτικότητά τους σε "V" (*Verticillium wilt*, που είναι μια παρόμοια ασθένεια), σε "F" (αδροφουζαρίωση) και σε "N" (ριζοκόμβιοι νηματώδεις). Είναι επίσης εξέχουσας σημασίας η εναλλαγή του σημείου σποράς κάθε χρόνο για την αποφυγή της αύξησης των επιπέδων του μύκητα στο έδαφος.

1.3. Ο ΒΙΟΕΛΕΓΧΟΣ ΤΩΝ ΦΥΤΟΠΑΘΟΓΟΝΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ

Βιοέλεγχος φυτικών ασθενειών ορίζεται η εμπλοκή της χρήσης ευνοϊκών μικροοργανισμών, όπως εξειδικευμένοι μύκητες και βακτήρια, που επιτίθενται ή ελέγχουν τους φυτοπαθογόνους οργανισμούς και τις ασθένειες που προκαλούν (United States Department of Agriculture, USDA, <http://www.usda.gov/wps/portal/usda/usdahome>). Αυτοί οι “εξειδικευμένοι” μύκητες και βακτήρια είναι μικροοργανισμοί οι οποίοι διαβιούν φυσιολογικά στα περισσότερα εδάφη. Στο φυσικό τους περιβάλλον ανταγωνίζονται με άλλους μικροοργανισμούς για χώρο και θρεπτικά συστατικά και σε μερικές περιπτώσεις παράγουν τοξικές ουσίες που αναστέλλουν ή/και σκοτώνουν εδαφικούς μύκητες όπως τα *Pythium* sp., *Phytophthora* sp., *Rhizoctonia* sp., καθώς και άλλους φυτοπαθογόνους μύκητες.

Ο βιοέλεγχος των φυτοπαθογόνων μυκήτων παρουσιάζει θεμελιώδεις διαφορές από τον βιοέλεγχο ζιζανίων, εντόμων ή άλλων ζώων. Έμφαση δίνεται στον έλεγχο της ασθένειας περισσότερο παρά στον έλεγχο του παθογόνου και σε ορισμένες περιπτώσεις ο παθογόνος μικροοργανισμός δεν στοχοποιείται καθόλου. Περιλαμβάνει λοιπόν πολύ διαφορετικά χαρακτηριστικά και αυτός ο τύπος βιοελέγχου μόνο σπάνια ομοιάζει με τις παραδοσιακές προσεγγίσεις σχετικά με τη χρήση παθογόνων ή παρασίτων για την καταστροφή του οργανισμού στόχου.

1.3.1. Πρότυπα βιοελέγχου φυτοπαθογόνων μικροοργανισμών

Ο έλεγχος των φυτοπαθογόνων μικροοργανισμών με τη χρήση βιολογικών μέσων βασίζεται σε τέσσερα πρότυπα. Το πρώτο αφορά στην ανάπτυξη φυσικών ανταγωνιστικών σχέσεων μεταξύ του μικροοργανισμού στόχου και του παράγοντα βιοελέγχου, που σχετίζεται με τη διεκδίκηση θρεπτικών υλικών. Το δεύτερο αφορά

στην ικανότητα παραγωγής ουσιών με αντιμικροβιακή δράση από τον παράγοντα βιοελέγχου οι οποίες στοχεύουν και αναστέλλουν τον φυτοπαθογόνο μικροοργανισμό. Το τρίτο πρότυπο δράσης του βιοελέγχου προτείνει τη χρήση ως παραγόντων βιοελέγχου οργανισμών που είναι παράσιτα για τον φυτοπαθογόνο μικροοργανισμό-στόχο. Τέλος μπορεί να επιτευχθεί η προστασία ενός φυτού επάγοντας ανθεκτικότητα έναντι των φυτοπαθογόνων οργανισμών μέσω της προστασίας των σημείων του φυτού που είναι τρωτά από τον φυτοπαθογόνο παράγοντα, της αναστολής ή καταστολής της φυτοπαθογόνου δραστηριότητας, της επαγωγής από μέρους του φυτού αποκρίσεων που να αποτρέπουν τη δράση των φυτοπαθογόνων οργανισμών καθώς και της παραγωγής ουσιών από τους παράγοντες βιοελέγχου, που επάγουν τη φυτική ανάπτυξη.

Είναι επίσης σημαντικό να αναφερθεί ότι ο βιοέλεγχος των φυτοπαθογόνων μικροοργανισμών χαρακτηρίζεται πολύ συχνά από περιορισμένη προσέγγιση του φυτοπαθογόνου παράγοντα. Αυτό αφορά κυρίως στους εδαφομεταφερόμενους φυτοπαθογόνους μικροοργανισμούς και μπορεί να συμβαίνει είτε λόγω του ότι οι τελευταίοι είναι ενσωματωμένοι στο έδαφος είτε γιατί ο χρόνος επιβίωσής τους στο έδαφος είναι μικρός (Larkin, 2003).

Η επιτυχημένη εφαρμογή του βιολογικού ελέγχου σε μια καλλιέργεια προϋποθέτει την τήρηση δύο βασικών κανόνων. Πρώτον, όλα αυτά τα προϊόντα πρέπει να εφαρμόζονται ταυτόχρονα με συνήθεις τεχνικές ελέγχου των καλλιεργειών για ασθένειες. Ο έλεγχος των καλλιεργειών πρέπει να περιλαμβάνει: ανάπτυξη των φυτών σε καλά στραγγισμένο υπόστρωμα, αποφυγή υπερβολικού ποτίσματος, αυστηρή τήρηση κανόνων εξυγίανσης, εξασφάλιση ότι τα θρεπτικά συστατικά και οι συνθήκες, όπως θερμοκρασία και pH είναι κατάλληλα ρυθμισμένες για βέλτιστη ανάπτυξη των φυτών και αν πρόκειται για καλλιέργεια σε θερμοκήπιο η σχετική υγρασία θα πρέπει να είναι κάτω από 85%. Δεύτερον, όλα τα προϊόντα βιοελέγχου θα πρέπει να εφαρμόζονται πριν από το ξέσπασμα της ασθένειας. Σε καμία περίπτωση δεν επαναφέρουν τα ήδη προσβεβλημένα φυτά. Αν οι παραπάνω προϋποθέσεις εφαρμοστούν σωστά τότε αυξάνεται σημαντικά η πιθανότητα επιτυχίας του βιοελέγχου (Nameth, 2001).

1.3.2. Κοινοί παράγοντες βιοελέγχου φυτοπαθογόνων μικροοργανισμών

Οι διαδεδομένοι παράγοντες βιοελέγχου φυτοπαθογόνων μικροοργανισμών αφορούν σε στελέχη νηματοειδών μυκήτων, όπως *Trichoderma* spp. (*harzianum*, *virens*, *hamatum*, *atroviride*, *koningii*), *Coniothyrium minitans*, *Fusarium oxysporum* (μη παθογόνα στελέχη) ενώ μεταξύ των βακτηρίων οι πιο κοινά εξεταζόμενοι και εφαρμοζόμενοι παράγοντες βιοελέγχου είναι είδη του γένους *Bacillus* (*Bacillus subtilis*), *Pseudomonas* (*Pseudomonas fluorescens*) και *Streptomyces* (*S. lydicus*, *S. lividans*, *S. olivaceoviridis*, *S. diastatochromogenes*, *S. scabies*, *S. plicatus*, *S. hydroscopicus*, *S. violaceusniger*).

Οι στόχοι αυτών των παραγόντων βιοελέγχου είναι αντίστοιχα οι παθογόνοι μικροοργανισμοί που ανήκουν στα γένη *Pythium*, *Rhizoctonia*, *Fusarium* και πολλά άλλα.

Υπάρχουν και άλλοι μικροοργανισμοί, οι οποίοι δρουν ως παράγοντες βιοελέγχου άλλων φυτοπαθογόνων, για παράδειγμα *Gliocladium catenulatum*, *Ampelomyces quisqualis*, *Candida oleophila*, *Sporidesmium sclerotivorum*, *Paecilomyces lilacinus*, *Phlebia gigantean*, *Pythium oligandrum*, *Penicillium* spp. (Larkin, 2003).

1.3.3. Η αναγκαιότητα του βιοελέγχου

Η εφαρμογή του βιοελέγχου αναδύεται από την αναγκαιότητα για την ανάδειξη εναλλακτικών λύσεων για την αντιμετώπιση των φυτικών ασθενειών γενικότερα. Μέχρι σήμερα, για την αντιμετώπιση των φυτοπαθογόνων μικροοργανισμών που καταστρέφουν τις καλλιέργειες χρησιμοποιούνται χημικά μέσα, κυρίως οργανικά συνθετικά χημικά μόρια, τα οποία από τη μια πλευρά είναι αποτελεσματικά στη μικροβιοκτόνο δράση τους, από την άλλη όμως επιφέρουν καταστροφές στο φυσικό περιβάλλον και άρα και στον ίδιο τον άνθρωπο (Emmert και Handelsman, 1999, Nebel και Wright, 1998).

Τα χημικά μέσα που χρησιμοποιούνται για την αντιμετώπιση των φυτικών ασθενειών μπορούν άμεσα να επηρεάσουν το περιβάλλον και να βλάψουν τον άνθρωπο με το να μην είναι βιοαποικοδομήσιμα, οπότε γίνονται τοξικά και λειτουργούν ως ρυπαντές. Παράλληλα, δρουν καταστροφικά και εμμέσως προκαλώντας την ανάπτυξη

ανθεκτικότητας στους παθογόνους μικροοργανισμούς. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να απαιτούνται ολοένα και μεγαλύτερες δόσεις της χημικής ουσίας ώστε να είναι αποτελεσματική, γεγονός που επιβραδύνει την αποικοδόμησή της. Επιπλέον κάτω απ' αυτές τις συνθήκες απαιτείται συνεχής ανακάλυψη νέων χημικών συνθέσεων, που να είναι αποτελεσματικές έναντι των ανθεκτικών στελεχών (Nebel και Wright, 1998). Είναι σαφές ότι κάτι τέτοιο είναι οικονομικά ασύμφορο για τις υπεύθυνες εταιρείες. Επιπλέον, ένα πρόβλημα που εκπορεύεται από τη χρήση χημικών μέσων για την καταστολή φυτοπαθογόνων μικροοργανισμών είναι το ότι οι ουσίες αυτές δεν διακρίνονται από εξειδίκευση και κατά την εφαρμογή τους είναι δυνατόν να θανατώσουν και φυσικούς αναστολείς των μικροοργανισμών στόχων με αποτέλεσμα σε επόμενο στάδιο την επανάκαμψη και δευτερογενή "έκρηξη" του πληθυσμού του παθογόνου μικροοργανισμού. Επομένως, τελικά όχι μόνο δε λύνεται το πρόβλημα της ύπαρξης και δράσης του παθογόνου μικροοργανισμού αλλά επιπρόσθετα αφενός διαταράσσεται το οικοσύστημα αφετέρου το πρόβλημα διογκώνεται (Nebel και Wright, 1998)

1.3.4. Αξιολόγηση του βιοελέγχου

Τα αποτελέσματα της κριτικής του βιοελέγχου επιβεβαίωσαν και ενίσχυσαν τα πλεονεκτήματα της εφαρμογής του για την καταπολέμηση των φυτικών ασθενειών αλλά, επιπλέον, ανέδειξαν και προβλήματα που προέκυψαν κατά την εφαρμογή ή κινδύνους που ελλοχεύουν.

Σχετικά με τα πλεονεκτήματα της εναλλακτικής λύσης που προσφέρει ο βιοέλεγχος στην καταπολέμηση των φυτοπαθογόνων μικροοργανισμών αναφέρεται ότι οι παράγοντες βιοελέγχου επιτρέπουν τη μείωση της χρήσης χημικών μυκητοκτόνων, ελαττώνουν το οικολογικό κόστος της ανάπτυξης ανθεκτικών παθογονικών στελεχών στα παραδοσιακά χημικά μυκητοκτόνα, στην πλειονότητα των περιπτώσεων είναι πιο ασφαλείς και αν αποθηκευτούν σωστά τείνουν να είναι πιο σταθεροί από τα χημικά ζιζανιοκτόνα. Επιπλέον, στην πλειονότητα των περιπτώσεων είναι λιγότερο φυτοτοξικοί, έχουν χαμηλότερους μέσους χρόνους επανεφαρμογής στο πεδίο [Re-Entry Interval (R.E.I.) times] και σε βάθος χρόνου η πρακτική του βιοελέγχου μπορεί να αποβεί οικονομικότερη (για κάθε 1 \$ που επενδύεται σε έρευνα που αφορά σε βιοέλεγχο υπάρχει οικονομικό όφελος 30 \$).

Στον αντίποδα, στα μειονεκτήματα της εφαρμογής του βιοελέγχου συνοψίζεται στα παρακάτω: (α) δυσκολία εφαρμογής στο πεδίο, (β) μικρό εύρος στόχου τους (στις περισσότερες περιπτώσεις δεν είναι προϊόντα ευρέος φάσματος), (γ) μεγαλύτερος χρόνος που απαιτείται μέχρι να εκδηλωθεί η δράση τους και (δ) μεγαλύτερο κόστος χρήσης τους. Επιπρόσθετα, οι παράγοντες βιοελέγχου δεν εξαλείφουν τον παθογόνο παράγοντα, ούτε προστατεύουν τον ξενιστή από μόλυνση, έχουν μικρότερη διάρκεια ζωής στο ράφι αν δεν αποθηκευτούν σωστά, ενώ ενδέχεται να μην είναι συμβατοί με τη χρήση άλλων χημικών μυκητοκτόνων και βακτηριοκτόνων.

1.3.5. Ο βιοέλεγχος του *Rhizoctonia solani* και *Fusarium oxysporum*

Έχει προταθεί ότι μικροοργανισμοί που έχουν απομονωθεί από τη ρίζα και τη ριζόσφαιρα ενός ξενιστή είναι πιθανόν να είναι καλύτερα προσαρμοσμένοι σε αυτόν και έτσι να προσφέρουν καλύτερο έλεγχο από μικροοργανισμούς που έχουν απομονωθεί από άλλα είδη. Τέτοιοι οργανισμοί, που σχετίζονται με μια καλλιέργεια, μπορεί να αποτελούν καλύτερους παράγοντες βιοελέγχου επειδή ήδη βρίσκονται σε συνάφεια με αυτή αλλά και είναι καλύτερα προσαρμοσμένοι στις συγκεκριμένες περιβαλλοντικές συνθήκες που ευνοούν τον ξενιστή ή σε δομές του ξενιστή (Ogawa και Komada, 1984, Postma και Rattink, 1992). Η επιλογή τέτοιων, τοπικά προσαρμοσμένων, στελεχών έχει σε αρκετές περιπτώσεις ενισχύσει την επίδραση του βιοελέγχου (Larkin και Fravel, 1998).

Είναι πλέον διαδεδομένη η ικανότητα κάποιων ακτινοβακτηρίων να παρασιτούν και να αποικοδομούν σπόρια φυτοπαθογόνων μυκήτων (El-Tarabily και συνεργάτες, 1997). Επιπλέον γίνεται προσπάθεια απομόνωσης αποικοδομητικών ενζύμων (π.χ. χιτινολυτικά ένζυμα), που εκκρίνονται από βακτήρια και τα οποία χρησιμοποιούνται ως παράγοντες βιοελέγχου.

1.4. ΤΟ ΓΕΝΟΣ ΤΩΝ ΣΤΡΕΠΤΟΜΥΚΗΤΩΝ

Οι στρεπτομύκητες ανήκουν στο γένος *Streptomyces* (Waksman and Henrici, 1943), της οικογένειας *Streptomycetaceae* (Waksman and Henrici, 1943), της τάξης βακτηρί-

ων *Actinomycetales* (Buchanan, 1917). Η ονομασία της τάξης άλλαξε το 1997 από τους Stackebrandt και συνεργάτες, σε *Actinobacteria*.

1.4.1. Γενικά χαρακτηριστικά του γένους *Streptomyces*

Αναλυτικότερα, το γένος *Streptomyces* περιλαμβάνει αερόβιους, χημειοοργανότροφους σποροφόρους ακτινομύκητες. Τα μέλη του γένους σχηματίζουν εκτεταμένο, διακλαδιζόμενο βλαστητικό και αέριο μυκήλιο. Το βλαστητικό μυκήλιο έχει διάμετρο που κυμαίνεται από 0,5 έως 2,0 μm και παρουσιάζει ασυνεχή διαμερισματοποίηση ενώ σε σπάνιες περιπτώσεις παρατηρείται παραγωγή σπορίων (Shirling και Gottlieb, 1968α). Οι αέριες υφές φέρουν συνήθως μακριές αλυσίδες σπορίων με περισσότερα από 50, μη κινητά σπόρια ανά αλυσίδα (Becker και συνεργάτες, 1965, Shirling και Gottlieb, 1968α). Οι διακλαδιζόμενες υφές αυτών των σαπροφυτικών βακτηρίων αποκτούν θρεπτικά στοιχεία και ενέργεια κυρίως με την αποικοδόμηση αδιάλυτου οργανικού υλικού μέσω των εξωκυτταρικών υδρολυτικών ενζύμων τους (McCarthy και Williams, 1992). Ως απόκριση σε κατάλληλα σήματα περιορισμού των θρεπτικών συστατικών, υποστηρίζεται αλλά δεν έχει αποδειχθεί ότι δίνεται ώθηση στον σχηματισμό των αέριων υφών, που καταλήγουν σε σπόρια στο πλαίσιο ενός μηχανισμού διασποράς και εποίκισης σε νέα περιβάλλοντα (Chater και Losick, 1997). Σχηματίζουν ευδιάκριτες λειχνοειδείς, δερματώδεις ή βουτυρώδεις αποικίες. Στα αρχικά τους στάδια οι αποικίες χαρακτηρίζονται από μία σχετικά λεία επιφάνεια στη συνέχεια όμως ακολουθεί η ανάπτυξη αέριου μυκηλίου που μπορεί να είναι : α) σα φούντα μαλλιών, β) κοκκοειδής, γ) κονιορτώδης ή δ) σα βελούδο. Το χρώμα του βλαστητικού και του αέριου μυκηλίου οφείλεται σε μια μεγάλη ποικιλία χρωστικών που παράγουν οι Στρεπτομύκητες.

Χαρακτηρίζονται ως θετικά κατά Gram βακτήρια και ο χημικός τύπος του τοιχώματός τους είναι I (Lechevalier και Lechevalier, 1970 a,b) με κύριο χαρακτηριστικό την παρουσία, II-διαμινοπιμελικού οξέος (L-DAP) στις πεπτιδογλυκάνες και γλυκίνης, αλλά και την απουσία χαρακτηριστικών σακχάρων. Από τους στρεπτομύκητες απουσιάζουν τα μυκολικά οξέα ενώ αντίθετα εμφανίζονται σημαντικά ποσά κεκορεσμένων ίσο- και ανισοδιακλαδιζόμενων λιπαρών οξέων και έξα- ή οκτα-υδρογονομένων μενακινονών με εννέα ισοπρενικές μονάδες.

Η σύσταση του DNA των στρεπτομυκήτων σε βάσεις γουανίνη και κυτοσίνη είναι της τάξης του 69 με 73% (Pridham και Tresner, 1974). Δίνουν θετική αντίδραση καταλάσης. Ανάγουν τα νιτρώδη ιόντα σε νιτρικά και αποικοδομούν ουσίες όπως η α-δενίνη, εσκουλίνη, κασεΐνη, ζελατίνη, υποξανθίνη, άμυλο, και L-τυροσίνη.

Χρησιμοποιούν ένα μεγάλο φάσμα οργανικών υποστρωμάτων σαν πηγές άνθρακα και ενέργειας. Η ιδανική θερμοκρασία αύξησης των στρεπτομυκήτων κυμαίνεται από 25 έως 35 °C αν και υπάρχουν και μερικά ψυχρόφιλα ή θερμόφιλα είδη. Γενικά αυξάνονται σε pH 6,5 έως 8,0.

Μερικά είδη στρεπτομυκήτων είναι παθογόνα : α) για τον άνθρωπο, έχουν αναφερθεί τα είδη *Streptomyces somaliensis* και *Streptomyces paraguayensis* (Pulverer και Schaal, 1978, Mishra και συνεργάτες, 1980, Gordon, 1985), β) για τα ζώα, στελέχη του είδους *S. griseus* (Mishra και συνεργάτες, 1980) έχουν αναφερθεί ότι προσβάλλουν δελφίνια (Jasmin και συνεργάτες, 1972) και γάτες (Lewis και συνεργάτες, 1972) και γ) για τα φυτά, έχουν αναφερθεί στελέχη του είδους *Streptomyces scabies* που είναι υπεύθυνα για διάφορες ασθένειες των φυτών της πατάτας και του τεύτλου (Labruyete, 1971, Lapwood, 1973).

1.4.2. Οικοφυσιολογία

Οι στρεπτομύκητες συναντώνται σε μια ποικιλία οικοσυστημάτων (Philips, 1992) με σημαντικότερο αυτό του εδάφους, όπου είναι ιδιαίτερα άφθονοι (Williams και Wellington, 1982) και βρίσκονται κυρίως στα επιφανειακά στρώματα. Η αφθονία τους υπολογίζεται στις 10^4 ως 10^7 βιώσιμες μονάδες ανά γραμμάριο χώματος, αντιπροσωπεύοντας έτσι το 1-20 % ή και περισσότερο του συνόλου των βιώσιμων μονάδων του εδάφους. Οι αριθμοί αυτοί αυξάνονται σε εδάφη πλούσια σε οργανικό υλικό. Είναι οι κύριοι υπεύθυνοι της οσμής του χώματος λόγω χημικών ουσιών που παράγουν, οι οποίες καλούνται γαιοσμίνες ενώ έχουν σπουδαίο ρόλο στην αποικοδόμηση της νεκρής οργανικής ύλης.

Σημαντική είναι η παρουσία των στρεπτομυκήτων στη ριζόσφαιρα διάφορων φυτών είτε ως συμβιωτικοί οργανισμοί είτε ως παθογόνοι.

Εκτός του εδάφους η παρουσία στρεπτομυκήτων έχει καταγραφεί και σε υδάτινα οικοσυστήματα. Στο ίζημα λιμνών οι στρεπτομύκητες είναι ο δεύτερος επικρατέστερος πληθυσμός μετά τους αντιπροσώπους του γένους *Micromonospora*.

Όπως και στο έδαφος έτσι και στο νερό, οι στρεπτομύκητες είναι παραγωγείς αντιβακτηριακών και αντιμυκητιακών ενώσεων ενώ επιπλέον έχουν τη δυνατότητα υδρόλυσης ποικιλίας μακρομορίων, όπως κυτταρίνη, χιτίνη και πρωτεΐνες καθώς επίσης και διάσπασης τοξινών.

Σε υψηλές συγκεντρώσεις βρίσκονται στον πεπτικό σωλήνα ορισμένων γεοσκωλήκων και αρθροπόδων ενώ έχουν απομονωθεί κυτταρινολυτικά στελέχη του γένους από το πεπτικό σύστημα τερμιτών (Bignell και συνεργάτες, 1991). Έχουν επιπλέον απομονωθεί από διάφορα θηλαστικά και τον άνθρωπο.

Στρεπτομύκητες απαντώνται επίσης σε εδάφη βεβαρυμμένα με ρύπους, όπως διάφοροι υδρογονάνθρακες, τους οποίους χρησιμοποιούν ως πηγή άνθρακα και βαρέα μέταλλα.

1.4.3. Κύκλος ζωής των στρεπτομυκήτων

Ο κύκλος ζωής των στρεπτομυκήτων μοιάζει αρκετά με τον κύκλο ζωής των μυκήτων. Συγκεκριμένα, κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του βλαστητικού μυκηλίου του στρεπτομύκητα (μυκήλιο υποστρώματος και αέριο μυκήλιο) πραγματοποιείται αντιγραφή του DNA χωρίς αυτή να συνοδεύεται από διχοτόμηση του κυττάρου με αποτέλεσμα την ανάπτυξη νηματοειδών δομών. Οι στρεπτομύκητες αναπαράγονται και διασπείρονται μέσω του σχηματισμού σπορίων, ο οποίος έπεται της βλαστητικής περιόδου. Τα σχηματιζόμενα σπόρια καλούνται κονίδια. Τα τελευταία σχηματίζονται σε αέριες υφές, που ονομάζονται σποριοφορείς (sporophores) και εκτείνονται πάνω από την αποικία. (Εικόνα 1.11).

1.4.4. Ταξινόμηση των στρεπτομυκήτων

Τα ακτινοβακτήρια (*Actinomycetales* ή *Actinobacteria*) περιλαμβάνουν περισσότερα από 30 γένη Gram-θετικών βακτηρίων (Εικόνα 1.12).

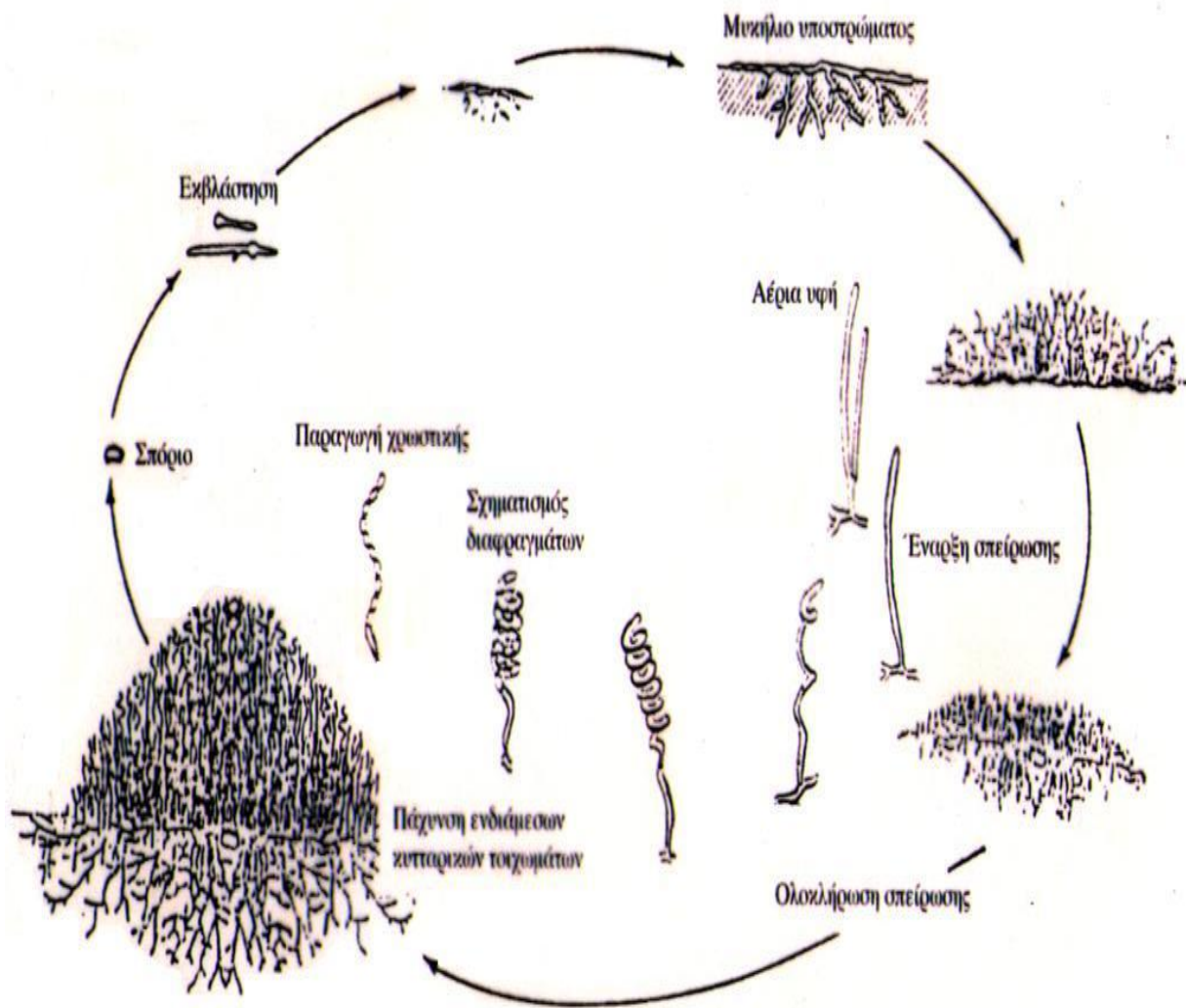
Η ονομασία ακτινομύκητας εμφανίστηκε στη βιβλιογραφία γύρω στα 1887, αποτελεί ελληνική λέξη, η οποία δείχνει ότι αυτοί οι μικροοργανισμοί αρχικά παρατηρήθηκαν, καλλιεργήθηκαν και μελετήθηκαν ως μύκητες. Τα ακτινοβακτήρια περιλαμβάνουν στελέχη και είδη που διαφέρουν πολύ μορφολογικά. Οι πιο απλές μορφές αφορούν μονοκύτταρους κόκκους και βάκιλους, μεταξύ των οποίων τα *Corynebacteria*, που

περιλαμβάνουν κυρίως βιομηχανικά είδη, τα οποία χρησιμοποιούνται για την παραγωγή αμινοξέων ως πρόσθετα τροφίμων. Άλλα ακτινοβακτήρια είναι νηματοειδή, όπως τα *Mycobacteria*, στελέχη των οποίων προκαλούν φυματίωση και λέπρα. Τα μέλη του γένους *Streptomyces* είναι τα περισσότερο πολύπλοκα. Αναπτύσσονται ως μυκήλιο με διακλαδισμένες υφές δημιουργώντας ένα αέριο μυκήλιο το οποίο καταλήγει σε αλυσίδες σπορίων (Εικόνα 1.12).

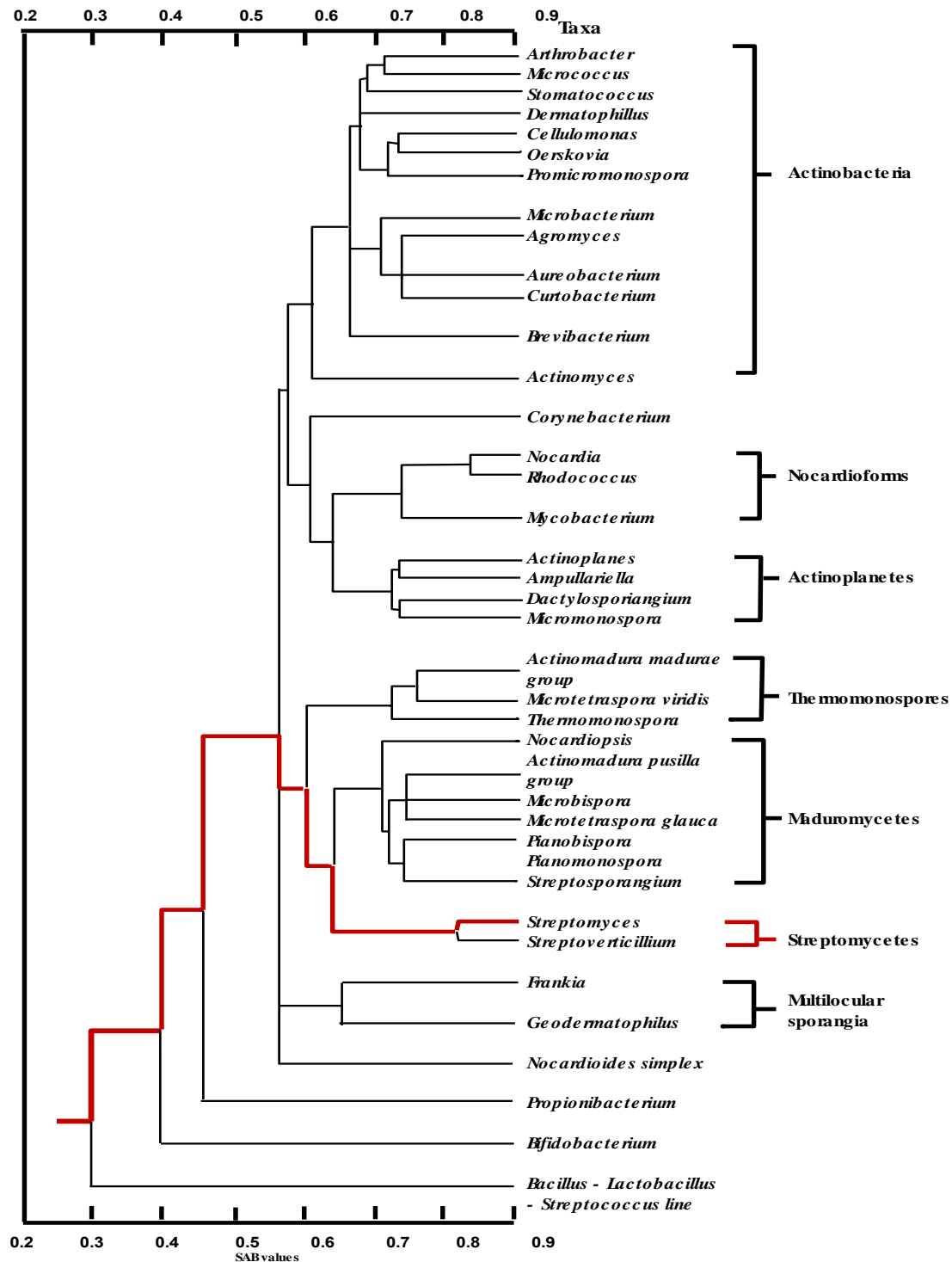
1.4.4.1. Διάκριση των στελεχών βάση της BOX PCR αντίδρασης

Τα γονιδιώματα των προκαρυωτικών και ορισμένων απλών ευκαρυωτικών οργανισμών διαθέτουν πολυάριθμες μικρές επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες, οι οποίες παρέχουν στοιχεία για τη γενετική ανάλυση και τυποποίηση πολλών μικροοργανισμών. Οι BOX αλληλουχίες ανήκουν σε μια από τις τρεις οικογένειες (REP, ERIC και BOX) τέτοιων αλληλουχιών που έχουν εντοπιστεί στο προκαρυωτικό γονιδίωμα και περιλαμβάνουν διαφορετικούς συνδυασμούς από τρεις υπομονάδες boxA, boxB και boxC οι οποίες έχουν μήκος 59, 45 και 50 νουκλεοτίδια αντίστοιχα (Martin και συνεργάτες, 1992, Walker και συνεργάτες, 2001). Η μέθοδος της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης BOX, για τη διάκριση βακτηριακών στελεχών χρησιμοποιεί μόρια εκκινητές συμπληρωματικά προς υψηλά συντηρημένες, επαναλαμβανόμενες DNA αλληλουχίες, που απαντώνται σε πολλαπλά αντίγραφα στο γονιδίωμα των περισσότερων αρνητικών και θετικών κατά Gram βακτηρίων. Τα ενισχυμένα τμήματα (διαφορετικών μηκών) μπορούν να ηλεκτροφορηθούν σε πήκτωμα αγαρόζης και να διαχωριστούν, δίνοντας την εικόνα ενός ραβδωτού κώδικα, μοναδικού για κάθε στέλεχος (Versalovic και συνεργάτες, 1994, Koeuth και συνεργάτες, 1995).

Η μέθοδος του BOX-PCR αποτυπώματος αποτελεί μία χαμηλού κόστους και υψηλής ταχύτητας μέθοδο φυλογενετικής διάκρισης και κατάταξης των μικροοργανισμών σε ομάδες σε επίπεδο στελέχους (Maiti και συνεργάτες, 2008, Brusetti και συνεργάτες, 2008). Ωστόσο, υπάρχουν περιπτώσεις φυλογενετικά όμοιων βακτηριακών στελεχών με διαφορετικές μεταβολικές ικανότητες και ιδιότητες. Οι τελευταίες μπορεί να οφείλονται σε μεταλλαγές προσαρμογής ή στην παρουσία πλασμιδίων.



Εικόνα 1.11. Ο κύκλος ζωής των στρεπτομυκήτων.



Εικόνα 1.12. Το φυλογενετικό δένδρο των ακτινοβακτηρίων βασισμένο στην ανάλυση αλληλουχιών του 16S rRNA. Με κόκκινο χρώμα επισημαίνεται το σημαντικότερο από τα γένη, το γένος *Streptomyces*.

1.4.4.2. Ταυτοποίηση μικροβιακών στελεχών βάση της ανάλυσης της αλληλουχίας του γονιδίου 16S rRNA

Η ανάλυση αλληλουχιών του γονιδίου 16s rRNA για τους προκαρυωτικούς και του 18s rRNA για τους ευκαρυωτικούς αποτελεί ορόσημο στη μελέτη της εξέλιξης και ταξινόμησης των οργανισμών. Η στροφή από την παρατήρηση των φαινοτυπικών χαρακτηριστικών στη γονιδιακή αλληλουχία ξεκίνησε 3 περίπου δεκαετίες πριν, από τον Woese και τους συνεργάτες του, και μπήκε στη ρουτίνα της ταξινόμησης των οργανισμών μετά την ανακάλυψη της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) και της αυτοματοποίησης της αλληλουχικής ανάλυσης (Woo και συνεργάτες, 2008).

Η ταυτοποίηση των βακτηρίων με κριτήριο την ανάλυση συγκεκριμένων γονιδίων είναι περισσότερο αντικειμενική και εμφανίζει σημαντικά πλεονεκτήματα, με κυριότερο το ότι δεν απαιτεί ιδανική ανάπτυξη μικροοργανισμού ούτε καν βιωσιμότητα (Petti, 2007). Το γονίδιο 16s rRNA θεωρείται από τους σημαντικότερους γενετικούς δείκτες στη φυλογενετική ταξινόμηση καθώς: υπάρχει σχεδόν σε όλα τα βακτήρια (σε πολυγονιδιακές οικογένειες ή οπερόνια), η λειτουργία του στην πορεία του χρόνου δεν έχει αλλάξει επομένως η συσσώρευση τυχαίων μεταλλαγών αντικατοπτρίζει την εξελικτική πορεία και τέλος, το μέγεθος του (περίπου 1500 ζεύγη βάσεων) επιτρέπει βιοπληροφορική επεξεργασία (Patel, 2001).

Ο σημαντικότερος περιορισμός στη χρήση του 16s rRNA γονιδίου ως φυλογενετικού εργαλείου είναι η αδυναμία του να διακρίνει όλα τα διαφορετικά βακτηριακά είδη. Για παράδειγμα, το *Bacillus cereus* και το *Bacillus anthracis* εμφανίζουν όμοια αλληλουχία του 16s rRNA γονιδίου και δεν μπορούν να διακριθούν αξιόπιστα σε μοριακό επίπεδο γονιδιώματος καθότι οι διαφορές τους εντοπίζονται στην παρουσία πλασμιδίων. Στην περίπτωση αυτή χρησιμοποιούνται διαφορετικά γονίδια – στόχοι όπως τα: *rpoB* (β υπομονάδα RNA πολυμεράσης), *tuf* (παράγοντας επιμήκυνσης Tu), *gyrA* ή *gyrB* (γυράση A ή B) και *sodA* (υπεροξειδική δισμουτάση) (Petti, 2007).

1.4.5. Οι στρεπτομύκητες ως παραγωγοί βιοενεργών ενώσεων και το βιοτεχνολογικό τους ενδιαφέρον.

Οι στρεπτομύκητες κατέχουν τη σημαντικότερη θέση μεταξύ των βακτηρίων που παράγουν βιοενεργούς μεταβολίτες με εφαρμογές στην Ιατρική (αντιβιοτικά, αντικαρκινικοί παράγοντες, ανοσοκαταστολείς), στη Γεωργία (μυκητοκτόνα,

ζιζανιοκτόνα, παρασιτοκτόνα) και σε τομείς της Βιομηχανίας, όπως τη Βιομηχανία φαρμάκων, τροφίμων κλπ (ένζυμα, ενζυμικοί αναστολείς).

Μετά την ανακάλυψη της στρεπτομυκίνης από τον Waksman και την ομάδα του (1941) το επιστημονικό ενδιαφέρον του ίδιου και πολλών άλλων εστιάστηκε στην απομόνωση και τον έλεγχο των ακτινοβακτηρίων. Το γεγονός αυτό οδήγησε στην ανακάλυψη πολλών αντιβιοτικών με σπουδαίες εφαρμογές και εκτίναξε τα ακτινοβακτήρια στην πρώτη θέση μεταξύ των άλλων ομάδων μικροοργανισμών σε σχέση με την ικανότητα παραγωγής βιολογικά ενεργών ενώσεων (Πίνακας 1.1). Τα αντιβιοτικά που έχουν μέχρι σήμερα απομονωθεί από τους στρεπτομύκητες παρουσιάζουν ποικιλία χημικών τύπων, όπως αμινογλυκοσίδες, ανσαμυσίνες, ανθρακυκλίνες, β-λακτάμες, μακρολίδια, νουκλεοσίδια, πεπτίδια, πολυένια, πολυαιθέρες, τετρακυκλίνες και άλλα αντιβιοτικά που δεν συμπεριλαμβάνονται σε αυτές τις καλά προσδιορισμένες ομάδες (συνοπτικά παρουσιάζονται από τους Crandall και Hamill, 1986 και Pape και Rehm, 1986).

Πίνακας 1.1. Φυσικά προϊόντα παραγόμενα από τρεις ομάδες μικροοργανισμών, έως το 2002

Παραγωγοί	Αντιβιοτικά	Άλλες ενεργότητες ¹	Σύνολο
Ακτινοβακτήρια	8.700	1.400	10.100
Άλλα Βακτήρια	2.900	900	3.800
Μύκητες	4.900	3.700	8.600
Σύνολο	16.500	6.000	22.500

¹Περιλαμβάνονται αντικαρκινικοί, αντιπαρασιτικοί, ανοσοκατασταλτικοί και ζιζανιοκτόνοι παράγοντες.

Με δεδομένη την εξέχουσα θέση των ακτινοβακτηρίων και ειδικά των στρεπτομυκήτων στην παραγωγή αντιβιοτικών αλλά και ενζύμων που διασπούν το κυτταρικό τοίχωμα των μυκήτων, όπως χιτινάσες, κυτταρινάσες, ημικυτταρινάσες, γλουκανάσες, αμυλάσες, κλπ έχουν γίνει προσπάθειες να αξιοποιηθούν τα βακτήρια αυτά στην αντιμετώπιση φυτοπαθογόνων μυκήτων όπως *Rhizoctonia solani* και *Fusarium oxysporum*.

1.4.5.1. Οι στρεπτομύκητες ως παράγοντες βιοελέγχου.

Το συνεχές αυξανόμενο ενδιαφέρον για την προστασία του περιβάλλοντος και η επιμονή στην οργανική καλλιέργεια κατευθύνουν την έρευνα στην αναζήτηση εναλλακτικών μεθόδων ελέγχου των ασθενειών, όπως για παράδειγμα τη χρήση των φυσικών ανταγωνιστών ώστε βιολογικά να ελεγχθούν οι φυτοπαθογόνοι μικροοργανισμοί (Nerey και συνεργάτες, 2010)

Τα ακτινοβακτήρια και συγκεκριμένα τα μέλη του γένους *Streptomyces* χαρακτηρίζονται από την πολύπλοκη μορφολογική διαφοροποίηση και την ικανότητα να παράγουν μεγάλης ποικιλίας δευτερογενείς μεταβολίτες (Challis και Horwood, 2003). Οι μικροοργανισμοί αυτοί μπορούν να βρεθούν στη ριζόσφαιρα πολλών διαφορετικών φυτικών ειδών. Διάφορα είδη του γένους των στρεπτομυκήτων, όπως τα *S. lydicus*, *S. lividans*, *S. olivaceoviridis*, *S. scabies*, *S. plicatus*, *S. hydroscopicus*, *S. violaceusniger*, *S. humidus*, *S. avermitilis*, *S. aurofaciens*, *S. roseoflavus* είναι ήδη γνωστά ως παραγωγοί σημαντικών ουσιών που είναι ενεργές ενάντια σε μεγάλο φάσμα παθογόνων μυκήτων (Sessitsch και συνεργάτες, 2002). Στις ουσίες αυτές περιλαμβάνονται διάφορα αντιβιοτικά καθώς επίσης και ποικιλία ενζύμων (πχ. χιτινάσες), που αποικοδομούν το κυτταρικό τοίχωμα των μυκήτων. Επιπλέον, μεταβολίτες από στρεπτομύκητες χρησιμοποιούνται ευρύτατα στη Γεωργία ως προωθητές της αύξησης των καλλιεργούμενων φυτών (Doelle και συνεργάτες, 1992, Haas και Défago, 2005, Hellenic Ministry of Rural Development and Food, Sadeghi και συνεργάτες, 2009)

Επιλεγμένα στελέχη στρεπτομυκήτων έχουν ήδη χρησιμοποιηθεί ως άμεσοι παράγοντες βιοελέγχου για τον έλεγχο διάφορων φυτικών ασθενειών (Scherwinski και συνεργάτες, 2008, Wharton και συνεργάτες, 2007, Lu και συνεργάτες, 2010, Doelle και συνεργάτες, 1992, Bakker και συνεργάτες, 2010)

Το Ελλαδικό οικοσύστημα, χάρη στη γεωγραφική του θέση η οποία χαρακτηρίζεται από το Μεσογειακό κλίμα, έχει αποδειχθεί ότι αποτελεί ενδιαίτημα πλούσιο σε πληθυσμούς στρεπτομυκήτων με ευρύ βιοτεχνολογικό ενδιαφέρον (Baur 2006, Montealegre και συνεργάτες, 2010, Igarashi και συνεργάτες, 2000, Paululat και συνεργάτες, 2010).

Ειδικά ως παράγοντες βιοελέγχου οι στρεπτομύκητες παρουσιάζουν μεγάλο βιοτεχνολογικό ενδιαφέρον. Στην επιλογή αυτής της ομάδας μικροοργανισμών σαν

παραγόντων βιοελέγχου φυτοπαθογόνων μυκήτων, εκτός από την ικανότητα των στρεπτομυκήτων να παράγουν αντιμικροβιακές ουσίες συντείνει και το γεγονός ότι οι στρεπτομυκήτες ζουν φυσιολογικά κυρίως στο έδαφος (Williams και Wellington, 1982) καθώς και κοντά στις ρίζες των φυτών οι οποίες αποτελούν τον κύριο στόχο των μυκήτων. Επομένως, πολλοί στρεπτομυκήτες αποτελούν φυσικούς ανταγωνιστές των φυτοπαθογόνων μυκήτων στόχων δεδομένης της συνύπαρξής τους στην περιοχή της ρίζας των φυτών, γεγονός που προσφέρει τόσο δυνατότητες όσο και κατευθυντήριες γραμμές για την εφαρμογή εναλλακτικών τρόπων αντιμετώπισης των φυτικών ασθενειών που προκαλούνται από μύκητες, δηλαδή τον βιοέλεγχό τους.

1.4.5.2. Μοριακή και γενετική μελέτη των στρεπτομυκήτων.

Το γένος των Στρεπτομυκήτων χαρακτηρίζεται από μεγάλα (>8 Mb) γραμμικά χρωμοσώματα, υψηλή περιεκτικότητα σε G-C, και μεγάλα κυρίως γραμμικά αλλά και κυκλικά πλασμίδια.

Ο πρώτος γενετικός χάρτης στρεπτομυκήτα, ο οποίος έριξε φως στο πως μπορεί να οργανώνεται το γονιδίωμα κατασκευάστηκε από τον David Hopwood στο στέλεχος *Streptomyces coelicolor* A3(2). Αυτός ο πρώτος χάρτης κατασκευάστηκε από τον διαχωρισμό ανασυνδυασμένων ομάδων που προέκυψαν από σύζευξη γονικών στελεχών μαρκαρισμένων με σημειακές αυξότροφες μεταλλάξεις (Hopwood, 1959). Παράλληλα κατασκευάστηκαν αντίστοιχοι χάρτες και άλλων ειδών στρεπτομυκήτων, όπως *S. clavuligerus* (Kirby, 1978), *S. ambofaciens* (Smokvina και συνεργάτες, 1988), *S. chrysomallus* (Smokvina και συνεργάτες, 1988, Keller και συνεργάτες, 1985), *S. glaucescens* (Cramer και συνεργάτες, 1983), *S. griseus* (Parag, 1978), *S. lividans* (Hopwood και συνεργάτες, 1983), *S. venezuelae* (Doull και συνεργάτες, 1986) χρησιμοποιώντας εύκολα αναγνωρίσιμους φαινότυπους, όπως αυξοτροφίες, ανθεκτικότητες σε αντιβιοτικά και μορφολογικές διαφοροποιήσεις (ικανότητα σπορίωσης ή ανάπτυξη αέριων υφών). Σε κάθε περίπτωση, οι γενετικοί χάρτες περιέγραφαν ένα κυκλικό χρωμόσωμα. Η εφαρμογή της μεθόδου PFGE (pulse field gel electrophoresis) στη μελέτη της δομής του γονιδιώματος παρείχε την πρώτη ένδειξη ότι το χρωμόσωμα αυτών των οργανισμών είναι στην πραγματικότητα ένα γραμμικό μόριο DNA μήκους 8 Mb που περιέχει μια κεντρική θέση έναρξης της αντιγραφής (*oriC*). Αυτή η γραμμική δομή αρχικά παρατηρήθηκε στον *S. Lividans*

(Lin και συνεργάτες, 1993, Huang και συνεργάτες, 1998) και σύντομα επιβεβαιώθηκε και για τον *S. coelicolor* (Kieser και συνεργάτες, 1992) καθώς και για την πλειονότητα των στρεπτομυκήτων με εξαίρεση είδη, όπως τα *Corynebacterium glutamicum* (Correia και συνεργάτες, 1994), *Mycobacterium tuberculosis* (Philipp και συνεργάτες, 1996), *M. bovis* BCG (Philipp και συνεργάτες, 1996), *Rhodococcus fascians* (Pisabarro και συνεργάτες, 1998) και *Rhodococcus sp.* R3 (Bigey και συνεργάτες, 1995), τα οποία έχουν κυκλικό χρωμόσωμα. Με δεδομένο ότι τα τελευταία είδη δεν σχηματίζουν μυκήλιο πιθανολογείται η σχέση μεταξύ του μεγάλου, γραμμικού χρωμοσώματος και της πολύπλοκης μορφολογίας των μικροοργανισμών αυτών.

1.4.5.3. Περιγραφή του γονιδιώματος των στρεπτομυκήτων.

Τα χρωμοσώματα των ειδών του γένους των Στρεπτομυκήτων και κάποιων από τα πολύ συγγενικά τους ακτινοβακτήρια, όπως *Actinoplanes philippinensis*, *Micromonospora chalkea*, *Nocardia asteroides*, *Streptoverticillum abikoense* (Chen, 2000, Redenbach και συνεργάτες, 2000) παρουσιάζουν μια νέα τάξη βακτηριακών γραμμικών μονάδων αντιγραφής, που καλύπτονται από «τερματικές πρωτεΐνες» (TPs) ομοιοπολικά προσδεδεμένες στο 5' άκρο (Chaconas και Chen, 2005).

Τα γραμμικά χρωμοσώματα των στρεπτομυκήτων είναι από τα μεγαλύτερα μεταξύ των βακτηρίων. Το μήκος τους κυμαίνεται από 8 Mb ως πάνω από 10 Mb και υψηλή περιεκτικότητα σε G-C, περίπου 72 %. Το επιπλέον μήκος του χρωμοσώματος των στρεπτομυκήτων είναι αποτέλεσμα τόσο του μεγάλου αριθμού γονιδίων που περιέχουν όσο και του μεγάλου μήκους των γονιδίων αυτών. Το πλήθος των γονιδίων αντανακλά την πολύπλοκη δομή, την ποικιλότητα του εδαφικού περιβάλλοντος, στο οποίο εποικούν και στον πλούσιο δευτερογενή μεταβολισμό τους (Dyson, 2011).

Μέχρι σήμερα έχουν δημοσιευτεί τα πλήρη γονιδιώματα τριών ειδών στρεπτομυκήτων (Πίνακας 1.2). Το γονιδίωμα του *Streptomyces scabies* (10.148.695 Mb) είναι μερικώς αναγνωσμένο (<http://www.sanger.ac.uk/projects/S.scabies/>) αλλά όχι ακόμα δημοσιευμένο. Όλες αυτές οι χρωμοσωμικές αλληλουχίες μπορούν να διακριθούν σε μια κεντρική περιοχή όπου εδράζονται τα σχετικά συντηρημένα γονίδια βασικών λειτουργιών (housekeeping genes) και σε δύο βραχίονες που

περιέχουν περισσότερο αποκλίνοντα και οριζόντια μεταφερόμενα γονίδια (Dyson, 2011).

Τα άκρα των χρωμοσωμάτων είναι ιδιαίτερος ασταθή. Σε εργαστηριακές συνθήκες, αυτόματες ελλείψεις τάξης μεγέθους 1 Mb συμβαίνουν συχνά οδηγώντας στην κυκλοποίηση των μορίων. Επιπλέον, άνισες αμοιβαίες μετατοπίσεις μεταξύ των δύο βραχιόνων ή μεταξύ ενός βραχίονα και ενός γραμμικού παλασμιδίου είναι συχνές έχοντας ως αποτέλεσμα μεγάλες ανακατατάξεις στο χρωμόσωμα. Σε κάθε περίπτωση, η δυναμική των άκρων του χρωμοσώματος συνάδει απόλυτα με την υψηλή γενετική τους ποικιλότητα.

Οι στρεπτομύκητες διαθέτουν συχνά πλασμίδια. Είτε γραμμικά είτε κυκλικά, τα πλασμίδια είναι συζευκτικά ενώ σπάνια διαθέτουν γονίδια ανθεκτικότητας σε τοξικά στοιχεία ή άλλα εμφανή επιλεκτικά πλεονεκτήματα (Horwood και Kieser, 1993). Μικρός αριθμός πλασμιδίων είναι γνωστό ότι περιέχουν μία ή περισσότερες ομάδες γονιδίων σχετιζόμενες με τη βιοσύνθεση δευτερογενών μεταβολιτών.

Πίνακας 1.2. Περιγραφή του γονιδιώματος των τριών στρεπτομυκήτων που έχουν αλληλουχηθεί πλήρως και έχει δημοσιευτεί το γονιδιώμα τους

Στέλεχος Στρεπτομύκητα	Μέγεθος γονιδιώματος	Αριθμός γονιδίων	Αριθμός γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες	Αναφορά
<i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2)	8.667.507 Mb	7.912	7.769	Bentley και συνεργάτες, 2002
<i>Streptomyces avermitilis</i>	9.025.608 Mb	7.669	7.580	Ikeda και συνεργάτες, 2003
<i>Streptomyces griceus</i> IFO 13350	8.545.929 Mb	7.224	7.136	Ohnishi και συνεργάτες, 2008

1.4.5.4. Ανάγνωση της αλληλουχίας του γονιδιώματος του πρότυπου στελέχους *Streptomyces coelicolor* A3(2).

Η αλληλούχιση του γονιδιώματος του πρότυπου οργανισμού *S. coelicolor* ολοκληρώθηκε τον Ιούλιο του 2001 στο Ινστιτούτο Sanger στο Cambridge, (www.Sanger.ac.uk/Projects/S_coelicolor) (Bentley και συνεργάτες, 2002) (Εικόνα 1.13). Η πλήρης αλληλουχία του γονιδιώματος έχει διαβαστεί και για τους παθογόνους μικροοργανισμούς της οικογένειας των Ακτινοβακτηρίων *M. tuberculosis* (Cole και συνεργάτες, 1998), *M. leprae* (Cole και συνεργάτες, 2001) και *C.diphtheriae* (http://www.sanger.ac.uk/Projects/C_diphtheriae), που είναι υπεύθυνοι για τη φυματίωση, τη λέπρα και τη διφθερίτιδα αντίστοιχα. Η σύγκριση αυτών των γονιδιωμάτων με άλλα, μη παθογόνων ακτινοβακτηρίων μπορεί να παράσχει σημαντικές πληροφορίες για τη φύση της παθογονικότητάς τους.

Με μόνο 55 γονίδια να προβλέπεται να είναι ψευδογονίδια, στο 8.667.507 ζευγών βάσεων γονιδίωμα του *S. coelicolor* έχουν ταυτοποιηθεί 7.825 γονίδια, πλήθος διπλάσιο του αντίστοιχου των *M. tuberculosis* και *E. coli* (Bentley και συνεργάτες, 2002). Στον *S. coelicolor*, αυτή η επιπλέον απόδοση κωδικοποίησης περιλαμβάνει εκτεταμένες οικογένειες πρωτεϊνών που σχετίζονται με τη ρύθμιση, τη μεταφορά και την αποικοδόμηση εξωκυτταρικών θρεπτικών συστατικών (Πίνακας 1.3).

Η αλληλούχιση ανέδειξε μια κεντρική «μήτρα» που περιέχει αναγκαία γονίδια και «βραχίονες» που αποτελούνται κυρίως από γονίδια που ελέγχουν λειτουργίες όχι αναγκαίες ή σχετικές με την προσαρμογή στις συνθήκες, όπως παραγωγή υδρολυτικών εξωενζύμων και δευτερογενών μεταβολιτών.

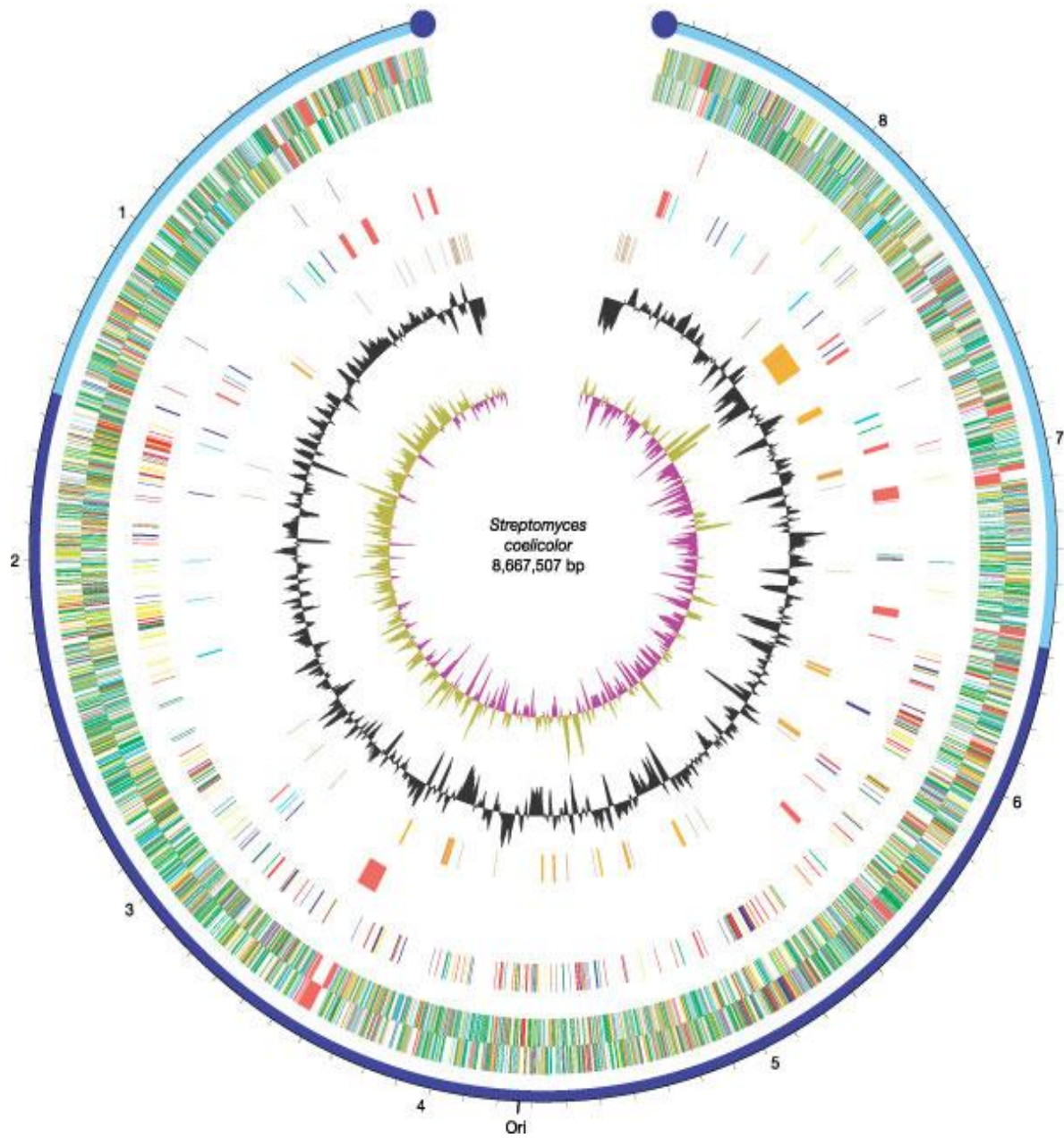
1.4.5.5. Γενετική προσέγγιση της παραγωγής βιοενεργών ενώσεων από στρεπτομύκητες

Τα ακτινοβακτήρια είναι μια σημαντική πηγή βιοενεργών μορίων με εμπορική σημασία. Έτσι, η γενετική και η βιοχημική μελέτη της παραγωγής δευτερογενών μεταβολιτών από αυτούς τους οργανισμούς έχει πρωτεύοντα ρόλο στην έρευνα. Μέχρι σήμερα, γονίδια που κωδικοποιούν για περίπου 80 μονοπάτια δευτερογενών μεταβολιτών έχουν κλωνοποιηθεί και αλληλουχηθεί (τουλάχιστον μερικώς). Συνολικά, οι αλληλουχίες αυτές παρέχουν δεδομένα μεγαλύτερα των 3,3 Mb, τα οποία έχουν αποδειχθεί ιδιαίτερος βοηθητικά στην αποσαφήνιση των βιοσυνθετικών

μηχανισμών και έχουν τροφοδοτήσει με στρατηγικές για την τροποποίηση φυσικών προϊόντων μέσω Γενετικής Μηχανικής (Paradkar και συνεργάτες, 2003).

Τα γονίδια, που ελέγχουν τα δευτερογενή μεταβολικά μονοπάτια καλύπτουν έκταση που κυμαίνεται μεταξύ 15 kb και πάνω από 120 kb στο γονιδίωμα. Εξαιτίας της ομαδοποίησης των γονιδίων, ολόκληρα μονοπάτια μπορούν να κλωνοποιηθούν εύκολα αναλύοντας μια γειτονική χρωμοσωμική περιοχή από τη στιγμή που ένα και μοναδικό γονίδιο του μονοπατιού έχει ταυτοποιηθεί. Με τον τρόπο αυτό επιταχύνεται κατά πολύ η απομόνωση ομάδων βιοσυνθετικών γονιδίων (Paradkar και συνεργάτες, 2003).

Διάφορες προσεγγίσεις έχουν εφαρμοστεί για την κλωνοποίηση βιοσυνθετικών μηχανισμών αλλά όλες οδηγούν στο εύρημα ότι τα γονίδια που κωδικοποιούν δευτερογενή μεταβολικά μονοπάτια στους στρεπτομύκητες οργανώνονται σε ομάδες στο χρωμόσωμα (Martin και Liras, 1989). Τόσο ρυθμιστικά γονίδια όσο και γονίδια ανθεκτικότητας έχουν βρεθεί μέσα στις ομάδες γονιδίων. Ωστόσο, υπάρχουν κάποιες αξιοσημείωτες εξαιρέσεις σύμφωνα με τις οποίες γονίδια ανθεκτικότητας ή βιοσυνθετικά γονίδια βρίσκονται εκτός των ομάδων γονιδίων (Madduri και συνεργάτες, 2001, Yu και συνεργάτες, 2002).



Εικόνα 1.13. Γενετικός χάρτης του χρωμοσώματος του *Streptomyces coelicolor* A3(2) (Bentley και συνεργάτες, 2002)

Πίνακας 1.3. Γενικά χαρακτηριστικά του γονιδιώματος του *S. coelicolor* (Paradkar και συνεργάτες, 2003)

Μέγεθος (ζ.β.)	8.667.507
Ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης	7.825
Πυκνότητα κωδικοποίησης	88,9 %
Περιεκτικότητα σε G-C	72,12 %
Μέσος όρος μήκους γονιδίου (ζ.β.)	991
Προβλεπόμενες ρυθμιστικές πρωτεΐνες (σύνολο)	965
Παράγοντες «σ»	63
Δύο συνθετικά συστήματα ρύθμισης	85 sensor kinases 79 response regulators 53 sensor-regulator pairs
Κινάσες σερίνης/θρεονίνης	44
Προβλεπόμενη μεταφορική λειτουργία (σύνολο)	614
ABC-περμεάσες	81
Πρωτεΐνες που προσδένονται στο ATP	141
Πρωτεΐνες επιφάνειας που προσδένονται στο υπόστρωμα	75
Εκκρινόμενες πρωτεΐνες (σύνολο)	819
Πρωτεάσες/Πεπτιδάσες	60
Χιτινάσες/Χιτοσανάσες	13
Κυτταρινάσες/Ενδογλουκανάσες	8
Αμυλάσες	3
Πηκτινάσες	2
Δευτερογενείς μεταβολίτες (σύνολο)	22
Αντιβιοτικά	3
Σιδηροφόρα	3
Χρωστικές	3
Λιπίδια	2
Άλλα μόρια	11

Ποικίλες τεχνικές έχουν επιστρατευτεί για την απομόνωση γονιδίων που κωδικοποιούν βιοσυνθετικά μονοπάτια στους στρεπτομύκητες. Το βιοσυνθετικό μονοπάτι της ακτινοροδίνης (ACT) μονοπάτι από τον *S. coelicolor* ήταν το πρώτο μονοπάτι που κλωνοποιήθηκε και χαρακτηρίστηκε (Malpartida και Horwood, 1984, Malpartida και Horwood, 1986). Γρήγορα ακολούθησε η κλωνοποίηση άλλων μονοπατιών, όπως για παράδειγμα της τετρασενομυκίνης (Motamedi και συνεργάτες, 1987), της γρανατικίνης (Sherman και συνεργάτες, 1989) και της στρεπτομυκίνης (Distler και συνεργάτες, 1987, Ohnuki και συνεργάτες, 1985). Η ανάλυση των κλωνοποιημένων γονιδίων σύντομα έδειξε ότι όσα εμπλέκονται σε ομόλογες λειτουργίες είναι συχνά πολύ συντηρημένα στην οικογένεια των Ακτινοβακτηρίων (Malpartida και συνεργάτες, 1987). Έτσι, πολλά γονίδια χρησιμοποιήθηκαν επιτυχώς ως ανιχνευτές για την ταυτοποίηση ομόλογων γονιδίων σε στελέχη που παράγουν διαφορετικά αλλά σχετικά μόρια. Η ομαδοποίηση των βιοσυνθετικών γονιδίων δευτερογενών μεταβολιτών έδωσε επίσης τη δυνατότητα απευθείας κλωνοποίησης ολόκληρων μονοπατιών μέσω ετερόλογης έκφρασης. Ωστόσο, αυτή η προσέγγιση απαιτεί μια κατάλληλη μέθοδο επιλογής και έναν φορέα ικανό να δεχτεί ολόκληρο το μονοπάτι.

Η συσσώρευση και η εκμετάλλευση ενός σημαντικού αριθμού αλληλουχιών από δευτερογενή μονοπάτια έχει οδηγήσει στον σχεδιασμό περισσότερων άμεσων μεθόδων κλωνοποίησης βιοσυνθετικών γονιδίων και μονοπατιών. Πολλές από αυτές τις μεθόδους αξιοποιούν την αντίδραση PCR και εκμεταλλεύονται τόσο τις συντηρημένες περιοχές των ενζύμων όσο και τα ειδικά κωδικόνια, που χρησιμοποιούν οι στρεπτομύκητες. Αυτές οι μέθοδοι δημιουργούν εσωτερικές αλληλουχίες γονιδίων, οι οποίες στη συνέχεια χρησιμοποιούνται σαν ομόλογοι ανιχνευτές για τον έλεγχο παρουσίας της αντίστοιχης ομάδας γονιδίων σε βιβλιοθήκες (Wright και Bibb, 1992).

Ανιχνευτές ειδικοί για ένα ιδιαίτερο ικρίωμα μιας ουσίας μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν για την ταυτοποίηση μονοπατιών για πολύ διαφορετικές μεταξύ τους ουσίες που περιέχουν αυτό το ικρίωμα [πχ. ταυτοποίηση των ομάδων της μιτοκίνης (Mao και συνεργάτες, 1999) και της ανσαμιτοκίνης (Yu και συνεργάτες, 2002) με τη χρήση του γονιδίου της AHBA-συνθάσης από την ομάδα της ριφαμικίνης]. Η ταυτόχρονη χρήση ανιχνευτών για διαφορετικά δομικά χαρακτηριστικά ή ενζυμικές λειτουργίες σε ένα μονοπάτι μειώνει σημαντικά τον

κίνδυνο της απομόνωσης λάθος ομάδας, καθώς πολλά στελέχη περιέχουν περισσότερα από ένα μονοπάτια δευτερογενούς μεταβολισμού. Η ανάπτυξη αυτών των μεθόδων έχει επηρεάσει κατά πολύ την ταχύτητα ταυτοποίησης ομάδων γονιδίων και έχει οδηγήσει στην κλωνοποίηση και την αλληλούχιση πλήθους τέτοιων ομάδων τα τελευταία χρόνια (Paradkar και συνεργάτες, 2003).

DNA ανιχνευτές έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί για την εδραίωση της πιθανότητας ένα ακτινοβακτήριο να παράγει δευτερογενείς μεταβολίτες. Σε αυτή την προσέγγιση στελέχη αναλύονται για την παρουσία ειδικών ομάδων βιοσυνθετικών γονιδίων (Malpartida και συνεργάτες, 1987). Τέτοιου τύπου έλεγχος έδειξε ότι τα περισσότερα στελέχη περιέχουν περισσότερα γονίδια από όσα αναμένονταν σύμφωνα με τις ουσίες που είναι γνωστό ότι παράγουν. Στελέχη που δεν είχαν προηγουμένως αναγνωριστεί ως παραγωγείς αποδείχθηκε ότι παράγουν δευτερογενείς μεταβολίτες μέσω ειδικών αλληλουχιών (Sosio και συνεργάτες, 2000, Mendez και συνεργάτες, 2002). Ίσως ταυτοποιηθούν μυστικά μονοπάτια για φυσικά προϊόντα τα οποία δεν παράγονται υπό κανονικές συνθήκες καλλιέργειας.

Τέλος, η γενετική ανάλυση των μονοπατιών σε συνδυασμό με τις βιοχημικές μελέτες έχει κατά πολύ ανάγει την κατανόηση του τρόπου με τον οποίο τα αντιβιοτικά παράγονται από απλές πρόδρομες ενώσεις και έχει διευκολύνει την πρόβλεψη της λειτουργίας πολλών γονιδίων που βρίσκονται σε μονοπάτια δευτερογενούς μεταβολισμού (Paradkar και συνεργάτες, 2003).

1.5. ΣΤΟΧΟΙ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Στην Ελλάδα, οι φυτοπαθογόνοι μύκητες πλήττουν καλλιέργειες καπνού (Βόρεια Ελλάδα), τομάτας (Βόρεια και Κεντρική Ελλάδα) και φασολιού (Κεντρική και Νότια Ελλάδα). Σε αυτές τις περιπτώσεις, ο έλεγχος των παθογόνων παραγόντων, συμπεριλαμβανομένων των μυκήτων *Rhizoctonia solani* και *Fusarium oxysporum*, βασίζεται κυρίως σε καλλιεργητικές πρακτικές, όπως τη μείωση της υγρασίας του εδάφους, την κάλυψη του εδάφους και τη χρήση ανθεκτικών φυτικών ποικιλιών. Οι Έλληνες παραγωγοί, επίσης, χρησιμοποιούν χημικά αντιμικροβιακά σκευάσματα χωρίς σημαντική αποτελεσματικότητα, όπως για παράδειγμα τα σκευάσματα με τις δραστικές ουσίες «metham sodium» (Varam), «quintozene+etrizidazole», όπως το

Terrachlor Super-X και «methyl Bromide» είτε πριν είτε μετά τη μόλυνση. Ωστόσο, η χρήση τους περιορίζεται λόγω του υψηλού κόστους τους και της ισχυρής τοξικότητάς τους (Marouli και Tzavella-Klonari, 2002). Επιπρόσθετα, εξαιτίας της ελλιπούς συνεργασίας μεταξύ του Ελληνικού Υπουργείου Αγροτικής Ανάπτυξης και των αγροτικών συνεταιρισμών, η πληροφόρηση σχετικά με τις διαδικασίες διαχείρισης τέτοιων προβλημάτων είναι ασαφής και ανεπαρκής.

Από την άλλη πλευρά, το αυξανόμενο ενδιαφέρον για προστασία του περιβάλλοντος και η απαίτηση για οργανική γεωργία, οδηγεί τους ερευνητές προς εναλλακτικές προτάσεις και λύσεις, όπως τη χρήση φυσικών ανταγωνιστών με σκοπό τον βιολογικό έλεγχο των φυτοπαθογόνων μικροοργανισμών (De Curtis και συνεργάτες, 2010, Hernández-Suárez και συνεργάτες, 2011).

Το Εργαστήριο Μικροβιολογίας του Τμήματος Βιολογίας του Πανεπιστημίου Αθηνών διαθέτει μια πλούσια συλλογή στρεπτομυκήτων ενδημικών του Ελλαδικού χώρου, απομονωμένων από διαφορετικά ενδιαιτήματα ανά την Ελλάδα, που χαρακτηρίζονται από ιδιαίτερες οικοφυσιολογικές ιδιότητες. Το γεγονός αυτό ενδέχεται να προσδίδει στους μικροοργανισμούς αυτούς βιοτεχνολογικό ενδιαφέρον, εστιασμένο στην αξιοποίησή τους ως παράγοντες βιοελέγχου κοινών φυτοπαθογόνων μυκήτων. Η παρούσα Διδακτορική Διατριβή βασισμένη στο μικροβιακό αυτό πλούτο έθεσε ως στόχους τα παρακάτω:

1. Τον έλεγχο της ικανότητας των στρεπτομυκήτων της συλλογής του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας ως προς την ικανότητά τους να αναστέλλουν την ανάπτυξη των κοινών για την ελληνική γεωργία φυτοπαθογόνων μυκήτων *Rhizoctonia solani* και *Fusarium oxysporum*.
2. Την επιλογή των στρεπτομυκήτων με την ισχυρότερη αντιμυκητιακή ικανότητα.
3. Τη διερεύνηση της χημικής φύσης των ουσιών που σχετίζονται με την ικανότητα των επιλεγμένων στρεπτομυκήτων να αναστέλλουν την ανάπτυξη των φυτοπαθογόνων μυκήτων.
4. Τον έλεγχο της ικανότητας των επιλεγμένων στρεπτομυκήτων να αναστέλλουν τη μολυσματική δράση των φυτοπαθογόνων μυκήτων *in vivo*.
5. Τη διερεύνηση του μηχανισμού με τον οποίο επιτυγχάνεται η αντιμυκητιακή δράση των επιλεγμένων στρεπτομυκήτων.

2

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ

Από την τράπεζα των βακτηριακών στελεχών του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας (Τομέας Βοτανικής, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ) επιλέχθηκαν 606 στελέχη στρεπτομυκήτων βάσει των διαφόρων οικοσυστημάτων προέλευσης. Όλα τα στελέχη της συλλογής χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο της ικανότητάς τους να δρουν ανασταλτικά έναντι δύο φυτοπαθογόνων μυκήτων του είδους *Rhizoctonia solani* και *Fusarium oxysporum*. Και οι δύο μύκητες προέρχονται από τη γερμανική συλλογή μικροοργανισμών DSMZ (*Rhizoctonia solani* Kühn, AG1, DSM843 και *Fusarium oxysporum* Schlechtendahl: Fries f. sp. *lycopersici*, DSM62059).

Όλα τα στελέχη των στρεπτομυκήτων διατηρήθηκαν σε στερεές καλλιέργειες σε θρεπτικό υπόστρωμα AGS (§2.3.1). Μετά από επώαση 6 έως και 7 ημερών στους 28 °C, τρυβλία με το κάθε στέλεχος διατηρήθηκαν στους 4 °C για μικρές χρονικές περιόδους. Η συντήρηση για μεγαλύτερα διαστήματα (6 έως και 8 μήνες) έγινε με την εναιώρηση σπορίων από στερεές καλλιέργειες στρεπτομυκήτων 8 έως και 9 ημερών σε αποστειρωμένο υδατικό διάλυμα γλυκερόλης 30 % (w/v), σε θερμοκρασία -20 °C, σύμφωνα με τη μέθοδο των Horwood και συνεργατών (1985).

Τα στελέχη των φυτοπαθογόνων μυκήτων συντηρήθηκαν για μικρά χρονικά διαστήματα σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα PDA (§2.3.3), σε θερμοκρασία 4 °C.

2.2. ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ ΚΑΙ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

2.2.1. Θρεπτικό υπόστρωμα αργινίνης, γλυκερόλης και αλάτων (**AGS agar**) (Herron και Wellington, 1990). Περιέχει (g ανά l απεσταγμένου H₂O): γλυκερόλη 12,5, υδροχλωρική L-αργινίνη 1,2, K₂HPO₄·3H₂O 1,3, NaCl 1,0, MgSO₄·7H₂O 0,5, άγαρ 15,0. Προσθήκη πριν την αποστείρωση 1 ml υδατικού διαλύματος ιχνοστοιχείων (g ανά 100 ml απεσταγμένου και αποστειρωμένου H₂O): Fe₂(SO₄)₃ 1,0, CuSO₄ 0,1, ZnSO₄ 0,1, MnSO₄ 0,1. Ρύθμιση του pH στην τιμή 7,8 πριν την αποστείρωση.

2.2.2. Θρεπτικό άγαρ (Nutrient Agar, **NA**) (Biokar Diagnostics, Beauvais, France). Περιέχει (g ανά l απεσταγμένου H₂O): θρεπτικό ζωμό 13,0, άγαρ 15,0.

2.2.3. Θρεπτικό υπόστρωμα δεξτρόζης από πατάτα (Potato Dextrose Agar, **PDA**). (DSMZ) Περιέχει (g ανά 1 εγχύματος πατάτας): γλυκόζη 20,0, άγαρ 15,0. Το έγχυμα πατάτας παρασκευάστηκε μετά τον βρασμό 200 g από καθαρισμένες και κομμένες πατάτες σε 1000 ml νερό για μία ώρα και το πέρασμα από λεπτό ηθμό.

2.2.4. Θρεπτικό υπόστρωμα παραγωγής αντιβιοτικών από στρεπτομύκητες (Streptomyces Antibiotic Agar, **SAA**) (Atlas, 2003). Περιέχει (g ανά 1 απεσταγμένου H₂O): Πεπτόνη σόγιας 15,0, γλυκόζη 15,0, NaCl 5,0, CaCO₃ 1,0, εκχύλισμα ζύμης 1,0, άγαρ 15,0. Προσθήκη πριν την αποστείρωση 2,5 ml γλυκερόλης. Ρύθμιση του pH στην τιμή 8,2 πριν την αποστείρωση.

2.2.4.1. Θρεπτικό υπόστρωμα παραγωγής αντιβιοτικών από στρεπτομύκητες (α) [Streptomyces Antibiotic Agar, **SAA(α)**]. Περιέχει (g ανά 1 απεσταγμένου H₂O): Πεπτόνη σόγιας 15,0, γλυκόζη 15,0, NaCl 5,0, CaCO₃ 1,0, εκχύλισμα ζύμης 1,0, άγαρ 15,0. Ρύθμιση του pH στην τιμή 8,2 πριν την αποστείρωση.

2.2.4.2. Θρεπτικό υπόστρωμα παραγωγής αντιβιοτικών από στρεπτομύκητες (β) [Streptomyces Antibiotic Agar, **SAA(β)**]. Περιέχει (g ανά 1 απεσταγμένου H₂O): Πεπτόνη σόγιας 15,0, γλυκόζη 10,0, NaCl 5,0, CaCO₃ 1,0, εκχύλισμα ζύμης 1,0, άγαρ 15,0. Ρύθμιση του pH στην τιμή 8,2 πριν την αποστείρωση.

2.2.4.3. Θρεπτικό υπόστρωμα παραγωγής αντιβιοτικών από στρεπτομύκητες (γ) [Streptomyces Antibiotic Agar, **SAA(γ)**]. Περιέχει (g ανά 1 απεσταγμένου H₂O): Πεπτόνη σόγιας 15,0, γλυκόζη 5,0, NaCl 5,0, CaCO₃ 1,0, εκχύλισμα ζύμης 1,0, άγαρ 15,0. Ρύθμιση του pH στην τιμή 8,2 πριν την αποστείρωση.

2.2.5. Θρεπτικός ζωμός παραγωγής αντιβιοτικών από στρεπτομύκητες (Streptomyces Antibiotic Broth, **SAB**) (Atlas, 2003). Περιέχει (g ανά 1 απεσταγμένου H₂O): Πεπτόνη σόγιας 15,0, γλυκόζη 15,0, NaCl 5,0, CaCO₃ 1,0, εκχύλισμα ζύμης 1,0. Προσθήκη πριν την αποστείρωση 2,5 ml γλυκερόλης. Ρύθμιση του pH στην τιμή 8,2 πριν την αποστείρωση.

2.2.6. Czapek-Dox Agar (**CZA**). Περιέχει (g ανά 1 απεσταγμένου H₂O): Σουκρόζη 30,0, NaNO₃ 3,0, MgSO₄·7H₂O 0,5, KCl 0,5, MgSO₄·7H₂O 0,01, K₂HPO₄ 1,0, άγαρ 15,0.

2.2.7. Ελάχιστο υπόστρωμα με αμμωνία ως πηγή αζώτου (Minimal Medium, **MM-NH₃**). Περιέχει (g ανά 1 απεσταγμένου H₂O): 10,0 D-γλυκόζη. Προσθήκη 20 ml διαλύματος αλάτων (βλ. §2.3.12) και υδατικού διαλύματος αμμωνίας 20 mM. Ρύθμιση του pH στην τιμή 6,8 πριν την αποστείρωση.

2.2.8. Ελάχιστο υπόστρωμα με νιτρικά ιόντα ως πηγή αζώτου (Minimal Medium, **MM-NO₃**). Περιέχει (g ανά 1 απεσταγμένου H₂O): 10,0 D-γλυκόζη. Προσθήκη 20 ml διαλύματος αλάτων (βλ. §2.3.12) και υδατικού διαλύματος νιτρικών ιόντων 20 mM. Ρύθμιση του pH στην τιμή 6,8 πριν την αποστείρωση.

2.2.9. Ελάχιστο υπόστρωμα με ουρία ως πηγή αζώτου (Minimal Medium, **MM-UREA**). Περιέχει (g ανά 1 απεσταγμένου H₂O): 10,0 D-γλυκόζη. Προσθήκη 20 ml διαλύματος αλάτων (βλ. §2.3.12.) και υδατικού διαλύματος ουρίας 20 mM. Ρύθμιση του pH στην τιμή 6,8 πριν την αποστείρωση.

2.2.10. Διάλυμα γλυκερόλης 20 % (w/v) (Wellington και Williams, 1978). Περιέχει 20,0 g γλυκερόλη σε 100 ml αποστειρωμένο και αποσταγμένο H₂O.

2.2.11. Διάλυμα αλάτων Ringer (1/4) (Wellington και συνεργάτες, 1990). Περιέχει (g ανά 1 απεσταγμένου και αποστειρωμένου H₂O): NaCl 2,15, KCl 0,15, CaCl₂ 0,075, K₂HPO₄ 0,5.

2.2.12. Διάλυμα αλάτων. Περιέχει (g ανά 1 απεσταγμένου και αποστειρωμένου H₂O): KCl 26,0, MgSO₄·7H₂O 26,0 g, KH₂PO₄ 76,0. Προσθήκη 2 ml χλωροφορμίου και 50 ml διαλύματος ιχνοστοιχείων (βλ. §2.3.13.).

2.2.13. Διάλυμα ιχνοστοιχείων. Περιέχει (g ανά 1 απεσταγμένου και αποστειρωμένου H₂O): Na₂B₄O₇·10H₂O 40 mg, CuSO₄·5H₂O 400 mg, FeO₄P·4H₂O 714 mg, MnSO₄·1H₂O 728 mg, Na₂MoO₄·2H₂O 800 mg, ZnSO₄·7H₂O 8 mg.

2.2.14. Υδατικό διάλυμα οξικού οξέος 3 M. Περιέχει (g l⁻¹): 180,15 οξικό οξύ.

2.2.15. Διάλυμα TAE (1x): 0,04 M Tris-acetate, 0,001 M EDTA, pH 8,0. Το διάλυμα παρασκευάστηκε σε συγκέντρωση 50 φορές μεγαλύτερη (50x) από το διάλυμα εργασίας (1x) και φυλάχθηκε σε θερμοκρασία δωματίου. Το διάλυμα εργασίας παρασκευάστηκε λίγο πριν την ηλεκτροφόρηση με ανάλογη αραίωση του 50x πυκνού διαλύματος.

2.2.16. Διάλυμα Βρωμιούχου Αιθιδίου: 10 mg ml⁻¹ βρωμιούχο αιθίδιο (Sigma) σε

αποστειρωμένο και αποσταγμένο νερό. Το φιαλίδιο όπου φυλάχθηκε το διάλυμα καλύφθηκε με αλουμινόχαρτο και το διάλυμα φυλάχθηκε σε θερμοκρασία δωματίου.

2.2.17. Ρυθμιστικό διάλυμα Φόρτωσης: 0,25 % (w/v) κυανούν βρωμοφαινόλης (Sigma), 0,25 % (w/v) κυανολικό ξυλένιο (Sigma), 30 % (w/v) γλυκερόλη. Το διάλυμα φυλάχθηκε στους 4 °C.

2.2.18. Υδατικό διάλυμα αιθανόλης 70 %. Περιέχει (ml l^{-1}): 70 αιθανόλη.

2.3. ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ ΤΗΣ ΑΥΞΗΣΗΣ ΤΩΝ ΦΥΤΟΠΑΘΟΓΟΝΩΝ ΜΥΚΗΤΩΝ ΑΠΟ ΣΤΕΛΕΧΗ ΣΤΡΕΠΤΟΜΥΚΗΤΩΝ

Περιγράφονται οι πειραματικές δοκιμασίες μέσω των οποίων οι εξεταζόμενοι στρεπτομύκητες ελέγχθηκαν με κριτήριο την αντιμυκητιακή τους ικανότητα εναντίον των *Rhizoctonia solani* και *Fusarium oxysporum*.

2.3.1. Έλεγχος της *in vitro* αντιμυκητιακής δραστηριότητας των στρεπτομυκήτων

Η ικανότητα καθενός από τα εξεταζόμενα στελέχη στρεπτομυκήτων να αναστέλλουν την αύξηση των επιλεγμένων φυτοπαθογόνων μυκήτων εκτιμήθηκε με την εφαρμογή *in vitro* δοκιμής που περιέγραψαν οι Lee και Hwang (2002), Getha και Vikineswary (2002) και Chamberlain και Crawford (1999), τροποποιημένης ως ακολούθως. Εμβόλια στρεπτομυκήτων όγκου 30 μl από εναιώρημα σπορίων σε γλυκερόλη τοποθετήθηκαν στο κέντρο τρυβλίων διαμέτρου 9 mm, που περιείχαν θρεπτικό άγαρ (NA) και ακολούθησε επώαση για 48 h στους 28 °C. Στη συνέχεια, εκατέρωθεν της σχηματισμένης αποικίας του στρεπτομύκητα και σε απόσταση περίπου 30 mm από αυτή τοποθετήθηκε τμήμα μυκηλίου από νεαρή καλλιέργεια του φυτοπαθογόνου μύκητα σε PDA. Ακολούθησε επώαση για 5 ημέρες στους 28 °C και κατόπιν καταγράφηκε ο ανταγωνισμός μεταξύ των δύο μικροοργανισμών ως ζώνη αναστολής της ανάπτυξης του μύκητα γύρω από την αποικία του στρεπτομύκητα.

2.3.2. Ποσοτικός προσδιορισμός της *in vitro* αντιμυκητιακής δραστηριότητας των στρεπτομυκήτων

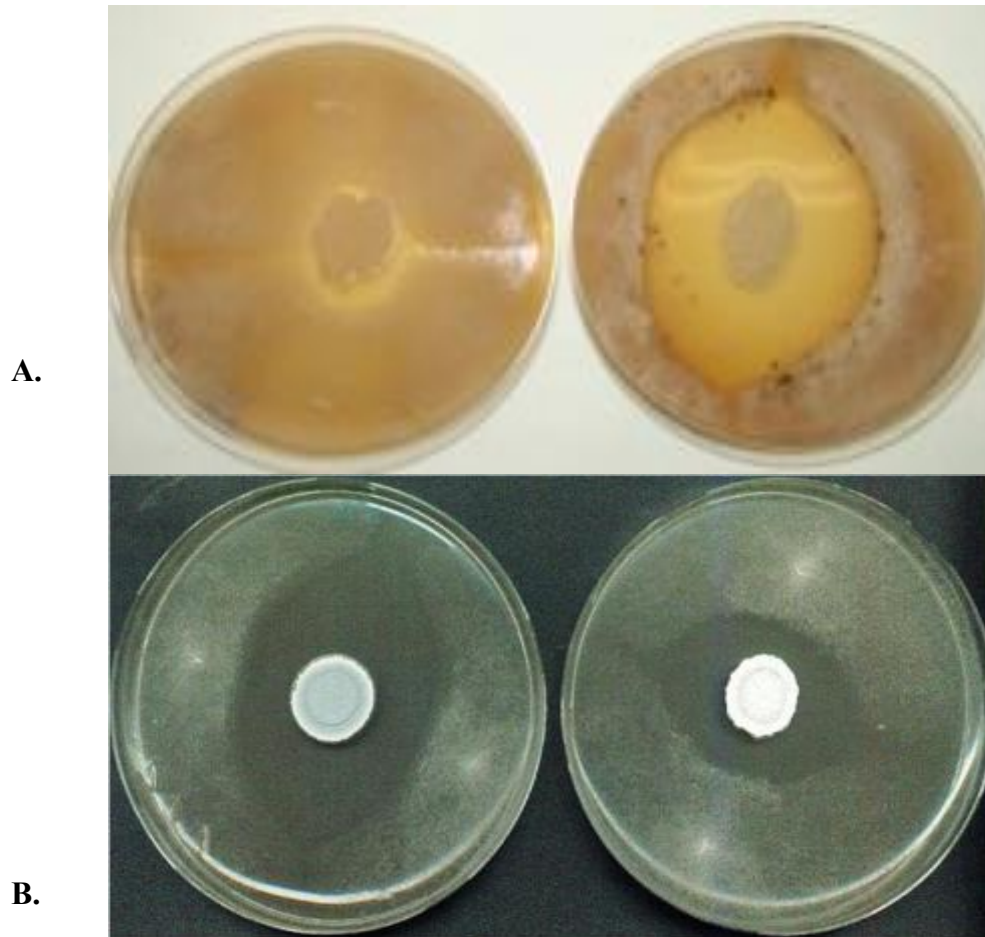
Σε όσες περιπτώσεις οι εξεταζόμενοι στρεπτομύκητες προκαλούσαν αναστολή της ανάπτυξης κάποιου από τους μύκητες-στόχους μετρήθηκε η διάμετρος της σχηματιζόμενης ζώνης αναστολής, καθώς και της αποικίας που σχηματίστηκε από τον εμβολιασμό του στρεπτομύκητα στο τρυβλίο. Το μέγεθος της αναστολής είναι συνάρτηση της διαμέτρου αυτής της ζώνης αναστολής, καθώς και της διαμέτρου της αποικίας του στρεπτομύκητα και εκφράζεται ως το πηλίκο του εμβαδού του κύκλου αναστολής προς το εμβαδόν της αποικίας του στρεπτομύκητα ($\pi R_{ζ.αν.}^2 / \pi R_{στρ}^2$) (Kanini και συνεργάτες, 2013).

2.3.3. Επιλογή στελεχών στρεπτομυκήτων με την ισχυρότερη αντιμυκητιακή δράση εναντίον και των δύο φυτοπαθογόνων μυκήτων

Από την καταγραφή των θετικών και των αρνητικών (Εικόνα 2.1.), ως προς την αντιμυκητιακή τους ικανότητα, στρεπτομυκήτων, καθώς επίσης και από την καταγραφή του μεγέθους της αναστολής κάθε μύκητα ξεχωριστά, αναδείχθηκαν τα στελέχη στρεπτομυκήτων που έδειξαν πειραματικά την ισχυρότερη αντιμυκητιακή συμπεριφορά τόσο έναντι του *Rhizoctonia solani* DSM843 όσο και έναντι του *Fusarium oxysporum* DSM62059. Οι δώδεκα στρεπτομύκητες που επιλέχθηκαν σύμφωνα με τα παραπάνω χρησιμοποιήθηκαν για περαιτέρω δοκιμές, προκειμένου να διερευνηθεί ο αντιμικροβιακός τους χαρακτήρας.

2.4. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΟΛΙΚΟΥ DNA ΑΠΟ ΚΑΘΑΡΗ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΣΤΡΕΠΤΟΜΥΚΗΤΩΝ

Η απομόνωση DNA από καθαρή καλλιέργεια πραγματοποιήθηκε βάσει του πρωτοκόλλου των Haught και συνεργάτες (1994). Το γενωμικό DNA απομονώθηκε από κύτταρα που συλλέχθηκαν από στερεή καλλιέργεια 24 ωρών, σε θρεπτικό άγαρ. Μεταφέρθηκαν με αποστειρωμένο κρίκο εμβολιασμού σε φυγοκεντρικούς σωλήνες που περιείχαν 500 μ l διαλύματος $MgSO_4$ 10 mM και φυγοκεντρήθηκαν σε 11000 στροφές για 10 λεπτά στους 4 °C.



Εικόνα 2.1. Σχηματισμός ζώνης αναστολής της ανάπτυξης του φυτοπαθογόνου μύκητα *Rhizoctonia solani* (A) και του *Fusarium oxysporum* (B) από στελέχη στρεπτομυκητών

Στο ίζημα έγινε προσθήκη διαλύματος λύσης (25 mM Tris, 25 mM EDTA, 10,3 % σακχαρόζη, 10 mg ml⁻¹ λυσοζύμη) και ακολούθησε επώαση για 2 ώρες στους 37 °C. Στη συνέχεια, προστέθηκε διάλυμα SDS 10 % (w/v) και το μίγμα επώαστηκε στους 65 °C για 20 λεπτά. Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 10 λεπτά, στις 14.000 στροφές ανά λεπτό, στους 15°C. Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε καθαρούς σωλήνες και έγινε προσθήκη διαλύματος οξικού καλίου 5 M και άμεση μεταφορά των σωλήνων σε πάγο. Μετά από παραμονή 30 λεπτών οι σωλήνες φυγοκεντρήθηκαν για 10 λεπτά, στις 14.000 στροφές ανά λεπτό, στους 4 °C και έγινε μεταφορά του υπερκειμένου σε καθαρούς σωλήνες. Ακολούθησε καταβύθιση με ισοπροπανόλη για 30 λεπτά στους 21 °C και φυγοκέντρηση για 20 λεπτά, στις 14.000 στροφές ανά λεπτό, στους 4 °C. Στο ίζημα προστέθηκε διάλυμα αιθανόλης 70 % και μετά από φυγοκέντρηση για 5 λεπτά, στις 14.000 στροφές ανά λεπτό, στους 4 °C, το ίζημα ξηράθηκε και αναδιαλύθηκε σε απεσταγμένο και αποστειρωμένο νερό. Το DNA που απομονώθηκε

ηλεκτροφορήθηκε σε πήκτωμα αγαρόζης 0,8 % (w/v) και παρατηρήθηκε σε υπεριώδη ακτινοβολία.

2.4.1. Ανάλυση αλληλουχίας γονιδίου 16S rRNA

Κατά την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) ενισχύθηκε το τμήμα του γονιδίου 16s rRNA μεταξύ των βάσεων 8 και 1510 (αρίθμηση κατά *E.coli*). Τα μόρια εκκινητές (primers) που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα pA και R1492 (Edwards και συνεργάτες, 1989, Lane, 1991). Η σύσταση του μίγματος της αντίδρασης PCR περιελάμβανε τα παρακάτω: 40 ng γενωμικού DNA, ρυθμιστικό διάλυμα KaraTaq με Mg^{2+} , 1 Unit KaraTaq DNA πολυμεράση, 0,2 mM dNTPs, 0,4 μ M pA primer και 0,4 μ M R1492 primer.

Ένα αρχικό στάδιο 2 λεπτών στους 95 °C, ακολουθήθηκε από 30 κύκλους που περιλαμβάνουν 30 δευτερόλεπτα σε θερμοκρασία αποδιάταξης στους 95 °C, 30 δευτερόλεπτα σε θερμοκρασία 53 °C, κατά το οποίο τα εκκινητικά μόρια σχημάτισαν δεσμούς υδρογόνου στις κατάλληλες θέσεις των μορίων DNA και 2 λεπτά στους 72 °C, όπου σχηματιστήκαν οι νέες πολυνουκλεοτιδικές αλυσίδες. Ακολούθησε ένα τελικό βήμα στους 72 °C για 2 λεπτά. Τελικά τα προϊόντα του PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 1,2 % (w/v) και ακολούθησε παρατήρηση σε υπεριώδη ακτινοβολία. Τα PCR προϊόντα διαχωρίστηκαν από τους εκκινητές και τα ελεύθερα νουκλεοτίδια με τη χρήση του Nukleospin Kit (MN, Γερμανία), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή και χρησιμοποιήθηκαν απευθείας για ανάλυση αλληλουχίας (www.macrogen.com, Κορέα).

Οι αλληλουχίες που προέκυψαν για κάθε γονίδιο συγκρίθηκαν με ήδη γνωστές αλληλουχίες της γονιδιακής τράπεζας (www.pubmed.com) με τη χρήση του αλγόριθμου BLAST (Altschul και συνεργάτες, 1997), ώστε να βρεθούν οι μικροοργανισμοί που παρουσίαζαν μεγαλύτερη ταυτότητα αλληλουχίας με βάση την πρωτοταγή δόμη των γονιδίων.

2.4.2. Αντίδραση BOX-PCR

Με δεδομένο ότι οι BOX αλληλουχίες βρίσκονται διάσπαρτες στο προκαρυωτικό γονιδίωμα ως παλίνδρομες επαναλήψεις, για την ενίσχυση των μεταξύ τους τμημάτων χρησιμοποιήθηκε ένα μόνο εκκινητικό μόριο. Στον σχεδιασμό του (κωδικός BOXA1R) βοήθησαν οι ήδη γνωστές αλληλουχίες BOX και η αλληλουχία του είναι η εξής:

5' -CTA CGG CAA GGC GAC GCT GAC C - 3' (Versalovic και συνεργάτες, 1994).

Η σύσταση του μείγματος της αντίδρασης PCR η οποία χρησιμοποιήθηκε για την ενίσχυση των τμημάτων μεταξύ των BOX αλληλουχιών του προκαρυωτικού γονιδιώματος ήταν η εξής: 40 ng γενωμικού DNA, 10 mM KCl, 10 mM Tris – HCl (pH 9,0), 0,1 % (w/v) Triton X-100, 1 Unit Taq DNA πολυμεράση, 0,2 mM dNTPs, 3,75 mM MgCl₂, 20 nM του εκκινητικού μορίου BOXA1R και 4 % (v/v) DMSO. Ένα αρχικό στάδιο 10 λεπτών στους 94 °C, ακολουθήθηκε από 35 κύκλους που περιλαμβάνουν 1 λεπτό σε θερμοκρασία αποδιάταξης στους 95 °C, 1 λεπτό σε θερμοκρασία 53 °C, κατά το οποίο το εκκινητικό μόριο σχημάτισε δεσμούς υδρογόνου στις κατάλληλες θέσεις των μορίων DNA και 8 λεπτά στους 65 °C, όπου σχηματίστηκαν οι νέες πολυνουκλεοτιδικές αλυσίδες. Ακολούθησε ένα τελικό βήμα στους 65 °C για 16 λεπτά. Τελικά, τα προϊόντα του PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 1,2 % (w/v) και ακολούθησε παρατήρηση σε υπεριώδη ακτινοβολία. Οι συνθήκες ηλεκτροφόρησης ήταν 50 V και η διάρκεια της ηλεκτροφόρησης ήταν 5 ώρες.

2.5. ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΩΝ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ

α) Θρεπτικά υποστρώματα

Οι δοκιμασίες αναστολής (βλ. §2.4.1.) επαναλήφθηκαν σε διαφορετικά στερεά θρεπτικά υποστρώματα και διαφορετικές τιμές θερμοκρασίας και pH. Για τον σκοπό αυτό, οι επιλεγμένοι στρεπτομύκητες εμβολιάστηκαν σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα

Αργινίνης, Γλυκερόλης και Αλάτων (**AGS**, §2.3.1), στερεό θρεπτικό υπόστρωμα Δεξτρόζης πατάτας (**PDA**, §2.3.3), Czapeck Agar (**CzA**, §2.3.6) και στερεό θρεπτικό υπόστρωμα παραγωγής αντιβιοτικών από στρεπτομύκητες (**SAA**, §2.3.4), ενώ σε κάθε περίπτωση εξετάστηκαν τέσσερις τιμές pH (pH6, pH7, pH8, pH9). Κάθε καλλιέργεια επώαστηκε σε τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες (26 °C, 28 °C και 30 °C) για δύο ημέρες πριν τον εμβολιασμό σε αυτές του κάθε μύκητα, οπότε η επώαση συνεχίστηκε για ακόμα 5 ημέρες. Η αντιμυκητιακή ισχύς προσδιορίστηκε και πάλι σε σχέση με τη διάμετρο της σχηματιζόμενης ζώνης αναστολής, καθώς και της αποικίας που σχηματίστηκε από τον εμβολιασμό του στρεπτομύκητα στο τρυβλίο (βλ. §2.4.1.). Με αυτόν τον τρόπο καθορίστηκαν οι άριστες συνθήκες έκφρασης του αντιμυκητιακού χαρακτήρα των επιλεγμένων στρεπτομυκήτων.

i. Συγκέντρωση γλυκόζης

Το θρεπτικό υπόστρωμα που επιλέχθηκε ως άριστο (SAA, §2.2.4), προκαλώντας την έκφραση μέγιστης αντιμυκητιακής δράσης των επιλεγμένων στελεχών στρεπτομυκήτων έναντι και των δύο φυτοπαθογόνων μυκήτων, τροποποιήθηκε ως προς την συγκέντρωσή του σε γλυκόζη και τη χρήση της τελευταίας ως μοναδικής πηγής άνθρακα. Προηγήθηκαν δοκιμασίες ανάπτυξης των επιλεγμένων στρεπτομυκήτων και των μυκήτων σε καθαρές καλλιέργειες, σε υπόστρωμα SAA με συγκέντρωση γλυκόζης 1,5 % βάρος κατ' όγκον (SAA (α), §2.2.4.1), 1 % βάρος κατ' όγκον (SAA (β), §2.2.4.2) και 0,5 % βάρος κατ' όγκον (SAA (γ), §2.2.4.3), για τον έλεγχο της ικανότητας ανάπτυξης των μικροοργανισμών σε κάθε συνθήκη. Ακολούθησαν συγκαλλιέργειες των εξεταζόμενων μικροοργανισμών, με σκοπό την εκτίμηση της ανταγωνιστικής ικανότητας των στρεπτομυκήτων έναντι των μυκήτων στις παραπάνω συνθήκες. Σε όλες τις παραπάνω δοκιμασίες, η θερμοκρασία επώασης ήταν σταθερά στους 28 °C ενώ η τιμή pH του εκάστοτε θρεπτικού υποστρώματος ήταν ρυθμισμένη στην τιμή 8.

ii. Διαφορετικές πηγές αζώτου

Η επίδραση της πηγής αζώτου στην έκφραση της αντιμυκητιακής δράσης των επιλεγμένων στρεπτομυκήτων πραγματοποιήθηκε σε θρεπτικό υπόστρωμα SAA

(§2.2.4), όπου η πηγή αζώτου (πεπτόνη σόγιας) αντικαταστάθηκε διαδοχικά από νιτρικά ιόντα (10 mM) (§2.2.8), αμμωνία (5 mM) (§2.2.7) και ουρία (5 mM) (§2.2.9). Διατηρήθηκε σταθερή η συγκέντρωση του υποστρώματος σε γλυκόζη στην άριστη τιμή, όπως αυτή καθορίστηκε από προηγούμενη δοκιμασία, καθώς και οι συνθήκες θερμοκρασίας και τιμής pH. Τα προκαταρκτικά πειράματα καθαρών καλλιεργειών των εξεταζόμενων μικροοργανισμών στις παραπάνω συνθήκες κατέδειξαν ανικανότητα ανάπτυξης υγιούς μυκηλίου και από τους δύο μύκητες. Το αποτέλεσμα αυτό οδήγησε στην επιλογή του ελάχιστου θρεπτικού υποστρώματος, εμπλουτισμένου με διαφορετικές πηγές αζώτου για τον ίδιο σκοπό. Πραγματοποιήθηκαν όχι μόνο καθарές καλλιέργειες όλων των εξεταζόμενων μικροοργανισμών αλλά και συγκαλλιέργειες των στρεπτομυκήτων με τους μύκητες-στόχους, ώστε να εκτιμηθεί η αντιμυκητιακή ικανότητα των πρώτων στις παραπάνω συνθήκες.

2.6. ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ

Στη δοκιμασία αυτή έγινε προσπάθεια προσδιορισμού της ενεργότητας τριών ενζύμων, της κυτταρινάσης, της ξυλανάσης και της χιτινάσης στο υπερκείμενο υγρής καλλιέργειας στρεπτομυκήτων που επιλέχθηκαν λόγω της ισχυρής ικανότητάς τους να αναστέλλουν την ανάπτυξη των εξεταζόμενων φυτοπαθογόνων μυκήτων. Για τον σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκε μια τεχνική διάχυσης σε στερεό θρεπτικό υλικό. Αναλυτικότερα, το υπερκείμενο υγρής καλλιέργειας των στρεπτομυκήτων, σε θρεπτικό υλικό SAB ελήφθη μετά από φυγοκέντρωση στις 9000 στροφές ανά λεπτό για 10 λεπτά. Το υπερκείμενο υγρό που συλλέχθηκε αποτέλεσε το δείγμα, στο οποίο προσδιορίστηκε η ενεργότητα της κυτταρίνης, της ξυλανάσης και της χιτινάσης. Παρασκευάστηκε μια σειρά τρυβλίων Petri, που περιείχαν 1,5 % (βάρος κατ' όγκον) άγαρ και 2 % (βάρος κατ' όγκον) καρβοξυμεθυλο-κυτταρίνη σε απεσταγμένο νερό, μια σειρά τρυβλίων Petri, που περιείχαν 1,5 % (βάρος κατ' όγκον) άγαρ και 2 % (βάρος κατ' όγκον) ξυλάνης σε απεσταγμένο νερό και μια σειρά τρυβλίων Petri που περιείχαν 1,5 % (βάρος κατ' όγκον) άγαρ και 2 % (βάρος κατ' όγκον) χιτίνης σε απεσταγμένο νερό. Στο στερεό υλικό που προετοιμάστηκε σχηματίστηκαν φρεάτια διαμέτρου 0,8 cm και σε αυτά τοποθετήθηκε όγκος από το εκάστοτε δείγμα

(υπερκείμενο υγρής καλλιέργειας στρεπτομυκήτων) ίσος με 20 μl. Ως αρνητικός μάρτυρας, στο φρεάτιο τοποθετήθηκε ίσος όγκος απεσταγμένου και αποστειρωμένου νερού. Ακολούθησε επώαση στους 28 °C για 4 ημέρες. Η ενεργότητα του κάθε ενζύμου προσδιορίστηκε μέσω της διαμέτρου της διαυγούς ζώνης, που σχηματίζεται γύρω από τα φρεάτια, μετά από χρώση των στερεών υλικών με 1 % διαλύματος ερυθρού του Κονγκό (Congo Red) για 10 λεπτά και έκπληση αρκετές φορές με 1 M NaCl (Shoseyon και Doi, 1990). Η παρουσία των διαυγών ζωνών γύρω από τα εμβολιασμένα φρεάτια των αντίστοιχων στερεών υλικών υποδεικνύουν την ενεργότητα των ενζύμων κυτταρινάσης, ξυλανάσης και χιτινάσης, ενώ το μέγεθος της ενεργότητας υπολογίστηκε με μέτρηση της διαμέτρου των ζωνών αυτών.

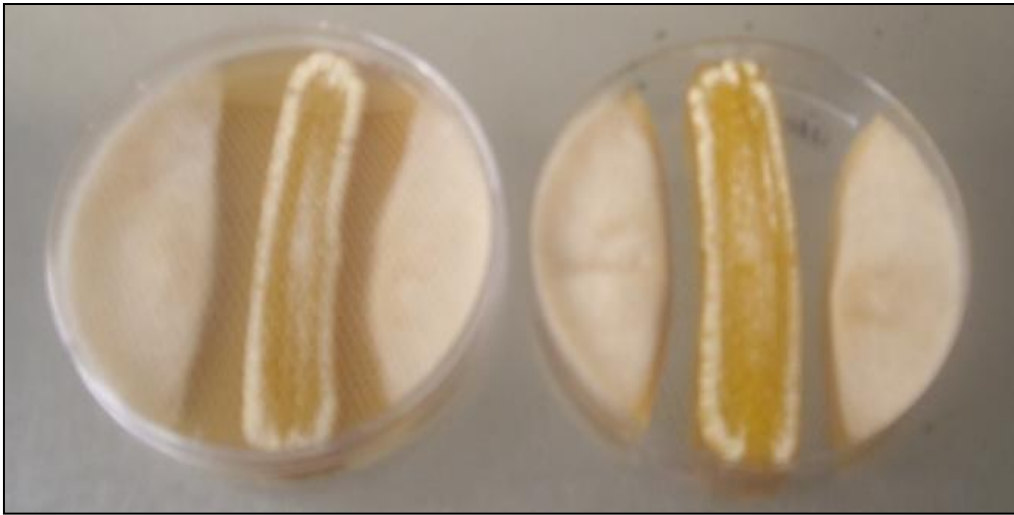
2.7. ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ ΑΠΟ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΤΩΝ ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΣΤΡΕΠΤΟΜΥΚΗΤΩΝ

Με σκοπό την εξέταση της χημικής φύσης της ικανότητας των επιλεγμένων στρεπτομυκήτων να αναστέλλουν την ανάπτυξη των εξεταζόμενων φυτοπαθογόνων μυκήτων, πραγματοποιήθηκε εκχύλιση των μεταβολιτών που παράγουν σε διάφορες συνθήκες, όπως περιγράφεται στις παραγράφους που ακολουθούν.

2.7.1. Εκχύλιση μεταβολιτών από υγρές και στερεές καλλιέργειες των επιλεγμένων στελεχών στρεπτομυκήτων, σε υδατικό διάλυμα

Τα στελέχη των στρεπτομυκήτων, που επιλέχθηκαν με κριτήριο την ισχυρή ανασταλτική δράση τους στην ανάπτυξη των δύο μυκήτων, καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα SAB, δεδομένου ότι αυτό επιλέχθηκε ως το άριστο υπόστρωμα για τη μέγιστη αντιμυκητιακή δράση των επιλεγμένων στρεπτομυκήτων. Οι καλλιέργειες έγιναν σε κωνικές φιάλες 1000 ml, που περιείχαν 500 ml SAB (§2.2.5) και οι οποίες εμβολιάστηκαν με 500 μl διαλύματος σπορίων στρεπτομυκήτων συγκέντρωσης 10^8 σπορίων ανά ml. Οι καλλιέργειες επώαστηκαν στους 28 °C (άριστη θερμοκρασία για μέγιστη αντιμυκητιακή δράση) για 7 ημέρες υπό ανάδευση (180 στροφές ανά λεπτό). Στη συνέχεια, οι καλλιέργειες φυγοκεντρήθηκαν (Biofuge

28RS Heraeus) στα 9000 g για 20 λεπτά. Το υπερκείμενο υγρό που συλλέχθηκε συμπυκνώθηκε με λυοφιλίωση (100:1) και αποστειρώθηκε με χρήση ηθμού διαμέτρου πόρου 20 μm . 200 μl από το τελικό προϊόν μεταφέρθηκαν σε φρεάτια διαμέτρου 1 cm που δημιουργήθηκαν σε τρυβλία με στερεό θρεπτικό υπόστρωμα SAA (§2.3.4), το οποίο είχε εμβολιαστεί με τους μύκητες-στόχους, προκειμένου να εξεταστεί η αντιμυκητιακή τους δραστηριότητα.



Εικόνα 2.2. Τρυβλία στερεής καλλιέργειας, από τα οποία έχει αποκοπεί το τμήμα της ζώνης αναστολής

Επιπρόσθετα, έγινε εκχύλιση μεταβολιτών από στερεές συγκαλλιέργειες των επιλεγμένων στρεπτομυκήτων με τους εξεταζόμενους μύκητες, σύμφωνα με τη μέθοδο των Buynitzky και συνεργατών (1979), τροποποιημένη ως εξής: Το τμήμα του στερεού θρεπτικού υλικού, στο οποίο σχηματίζεται η ζώνη αναστολής της αύξησης του κάθε μύκητα, αποκόπηκε (Εικόνα 2.2) και ομογενοποιήθηκε για 3 λεπτά. Το ομογενοποιημένο υλικό φυγοκεντρήθηκε στα 4000 g για 60 λεπτά και συλλέχθηκε το υπερκείμενο υγρό το οποίο στη συνέχεια συμπυκνώθηκε και αποστειρώθηκε με χρήση ηθμού διαμέτρου πόρου 20 μm . 200 μl από το τελικό προϊόν μεταφέρθηκαν σε φρεάτια διαμέτρου 1 cm που δημιουργήθηκαν σε τρυβλία με στερεό θρεπτικό υπόστρωμα SAA, το οποίο είχε εμβολιαστεί με τους μύκητες-στόχους, προκειμένου να εξεταστεί η αντιμυκητιακή τους δραστηριότητα.

Η διαδικασία επαναλήφθηκε, με σκοπό την εκχύλιση μεταβολιτών από καθαρές στερεές καλλιέργειες των επιλεγμένων στρεπτομυκήτων. Τμήμα του στερεού θρεπτικού υποστρώματος περιφερειακά της περιοχής ανάπτυξης του εκάστοτε

στρεπτομύκητα αποκόπηκε. Το μέγεθος του τμήματος αυτού αντιστοιχούσε στο μέγεθος της ζώνης αναστολής της ανάπτυξης του μύκητα που σχηματίζεται όταν οι ανταγωνιστές μικροοργανισμοί συγκαλλιεργούνται.

2.7.2. Κλασμάτωση μίγματος μεταβολιτών

Στα δείγματα που συλλέχθηκαν πραγματοποιήθηκε διαχωρισμός των συστατικών τους με χρωματογραφία μοριακής διήθησης. Η βασική αρχή της μεθόδου είναι ο διαφορετικός χρόνος έκλουσης των μακρομορίων ενός μίγματος κατά το πέρασμά τους από μία σταθερή φάση. Τα μακρομόρια που το μέγεθός τους είναι μεγαλύτερο από αυτό των πόρων δεν εισέρχονται στη στατική φάση και εκλούνται στα πρώτα κλάσματα, εν αντιθέσει με τα μικρού μεγέθους των οποίων η ροή είναι χαμηλότερης ταχύτητας (Εικόνα 2.2).

Για το σκοπό αυτό, η στήλη της συσκευής χρωματογραφίας φορτώθηκε με 2,5 ml δείγματος. Το πρώτο κλάσμα, όγκου 3,5 ml, περιείχε τα μεγάλα μοριακού βάρους συστατικά του μίγματος, ενώ το δεύτερο κλάσμα, όγκου 6 ml, περιείχε τα μικρομοριακά συστατικά. Σε κάθε περίπτωση, και τα δύο κλάσματα συμπυκνώθηκαν με λυοφιλίωση και τα συμπυκνωμένα κλάσματα ελέγχθηκαν για την αντιμυκητιακή τους δράση (βλ. §2.7).

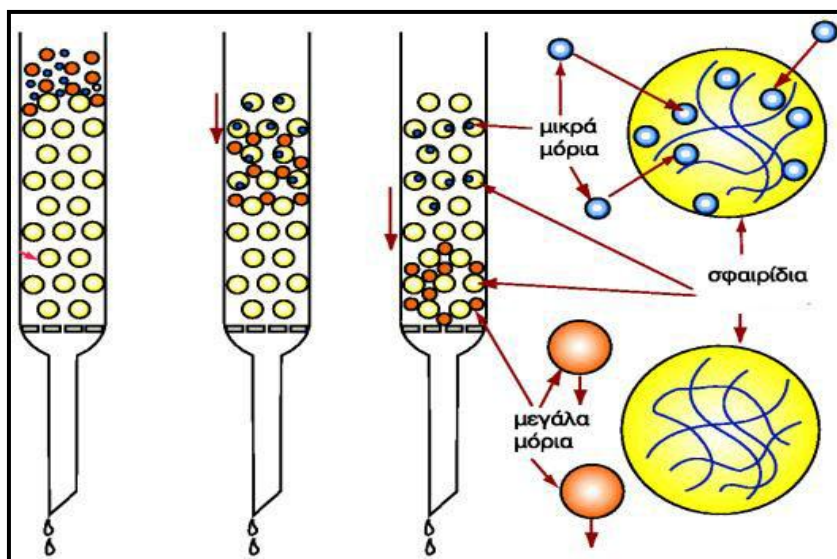
2.7.3. Εκχύλιση μεταβολιτών από στερεές καλλιέργειες των επιλεγμένων στελεχών στρεπτομυκήτων, σε οξικό αιθυλεστέρα

Το υπερκείμενο υγρό που συλλέχτηκε μετά τη φυγοκέντρηση (9000 rpm για 30 λεπτά) ομογενοποιημένου τμήματος στερεού θρεπτικού υποστρώματος, στο οποίο σχηματίζεται η ζώνη αναστολής της αύξησης του κάθε μύκητα (Εικόνα 2.2), αναμίχτηκε με ίσο όγκο οξικού αιθυλεστέρα και αναδεύτηκε έντονα για 2 ώρες. Το μίγμα μεταφέρθηκε σε διαχωριστική χοάνη απ' όπου συλλέχθηκαν σε προζυγισμένα δοχεία τόσο η υδατική όσο και η οργανική φάση. Ο διαλύτης κάθε κλάσματος (νερό στο υδατικό κλάσμα και οξικός αιθυλεστέρας στο οργανικό) εξατμίστηκε και το ίζημα αναδιαλύθηκε σε υποδεκαπλάσιο όγκο από τον κάθε διαλύτη. Χάρτινα δισκία εμποτίστηκαν με 100 μl από το κάθε δείγμα και τοποθετήθηκαν σε τρυβλία με στερεό

θρεπτικό υπόστρωμα SAA, το οποίο είχε εμβολιαστεί με τους μύκητες-στόχους, προκειμένου να εξεταστεί η αντιμυκητιακή τους δραστηριότητα.

2.7.4. Εκχύλιση μεταβολιτών από στερεές καλλιέργειες των επιλεγμένων στελεχών στρεπτομυκήτων, σε μεθανόλη

Σε 10 ml υπερκείμενου υγρού που συλλέχθηκε μετά τη φυγοκέντρηση (9000 rpm για 30 λεπτά) ομογενοποιημένου τμήματος στερεού θρεπτικού υποστρώματος, στο οποίο σχηματίζεται η ζώνη αναστολής της αύξησης του κάθε μύκητα (Εικόνα 2.2), ρυθμίστηκε το pH στην τιμή 3 με τη χρήση διαλύματος οξικού οξέος 3 M. Το μίγμα φυγοκεντρήθηκε (10000 rpm για 25 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου) και, μετά την απομάκρυνση του υπερκείμενου, το ίζημα αναδιαλύθηκε σε 1 ml μεθανόλης. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 12000 rpm για 15 λεπτά. Το υπερκείμενο (φάση μεθανόλης) συλλέχθηκε, ενώ το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 1 ml μεθανόλης και επαναλήφθηκε η διαδικασία άλλες τρεις φορές, οπότε αθροιστικά συλλέχθηκαν 4 ml εκχυλίσματος μεθανόλης. Η συνολική ποσότητα εκχυλίσματος μεθανόλης που συλλέχθηκε μετά από επαναλήψεις της παραπάνω διαδικασίας συμπυκνώθηκε 10 φορές με εξάτμιση. Χάρτινα δισκία εμποτίστηκαν με 100 μl από το κάθε δείγμα και τοποθετήθηκαν σε τρυβλία με στερεό θρεπτικό υπόστρωμα SAA, το οποίο είχε εμβολιαστεί με τους μύκητες-στόχους, προκειμένου να εξεταστεί η αντιμυκητιακή τους δραστηριότητα.



Εικόνα 2.3. Χρωματογραφία Μοριακής Διήθησης (www.nutr.teithe.gr)

2.7.5. Έλεγχος της αντιμικροβιακής δράσης των βιοενεργών υδατικών εκχυλίσμάτων έναντι κοινών μικροβιακών δεικτών

Όγκος εκχυλίσματος από στερεή καλλιέργεια στρεπτομυκήτων ίσος με 200 ml τοποθετήθηκε σε φρεάτια διαμέτρου 1 cm, που σχηματίστηκαν σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα εμβολιασμένο με *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas fluorescence* και *Saccharomyces cerevisiae*. Η ζώνη αναστολής της ανάπτυξης κάθε μικροοργανισμού δείκτη παρατηρήθηκε και υπολογίστηκε η διάμετρος της.

2.8. ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ ΤΗΣ ΑΥΞΗΣΗΣ ΤΩΝ ΦΥΤΟΠΑΘΟΓΟΝΩΝ ΜΥΚΗΤΩΝ ΑΠΟ ΣΤΕΛΕΧΗ ΣΤΡΕΠΤΟΜΥΚΗΤΩΝ *IN VIVO*

Η ικανότητα των επιλεγμένων στελεχών στρεπτομυκήτων να αναστέλλουν την ανάπτυξη των μυκήτων *Rhizoctonia solani* και *Fusarium oxysporum* σε *in vivo* πειράματα ανταγωνισμού μελετήθηκε με τη χρήση του φυτού της φασολιάς και του φυτού της τομάτας ως φυτών-στόχων αντίστοιχα.

2.8.1. Επιλογή των φυτών στόχων

Τα φυτά που χρησιμοποιήθηκαν ως στόχοι των φυτοπαθογόνων μυκήτων επιλέχθηκαν μέσα από την ποικιλία των φυτών που περικλείει το φάσμα της παθογένειας τόσο του *Rhizoctonia solani* όσο και του *Fusarium oxysporum* και με επιπλέον κριτήριο τη συχνότητα καλλιέργειάς τους στην Ελλάδα, που αντανακλάται στο ενδιαφέρον που παρουσιάζουν στην αγροτική οικονομία.

Στη μελέτη της *in vivo* ανταγωνιστικής δράσης των στρεπτομυκήτων έναντι της ανάπτυξης του φυτοπαθογόνου μύκητα *Rhizoctonia solani* χρησιμοποιήθηκε το φυτό της φασολιάς (*Phaseolous vulgaris*), του οποίου τα σπέρματα προσβάλλει ο μύκητας, εμποδίζοντας την φύτευσή τους ή προκαλεί καρκινώματα στους αναδυόμενους βλαστούς. Για τη μελέτη της *in vivo* ανταγωνιστικής δράσης των στρεπτομυκήτων έναντι της ανάπτυξης του *Fusarium oxysporum* χρησιμοποιήθηκε το φυτό της τομάτας

(*Lycopersicon esculentum*), του οποίου τις ρίζες προσβάλλει ο μύκητας, προκαλώντας συμπτώματα μαρασμού στο φυτό. Και τα δύο επιλεγμένα φυτά ανήκουν στα ευρύτατα καλλιεργούμενα στον ελλαδικό χώρο και η καλλιέργειά τους είναι μεγάλης οικονομικής σημασίας.

2.8.2. Προετοιμασία χώματος

Στα *in vivo* πειράματα ανταγωνισμού χρησιμοποιήθηκε αμμώδες αργιλοπηλώδες έδαφος (ASTM κατάταξη) με pH 7,9, που προέρχεται από μια περιοχή του Μαραθώνα (42 km ΒΑ από το κέντρο της Αθήνας) (Κατσίφας, ΔΔ), με έντονη γεωργική δραστηριότητα. Πριν από τη χρήση του το έδαφος ξηραίνεται στον αέρα υπό συνθήκες έλλειψης φωτισμού στους 22 °C για τουλάχιστον 3 μήνες. Στη συνέχεια, διέρχεται μέσω ηθμού διαμέτρου πόρου 2 mm.

Κατά τις δοκιμασίες που απαιτούσαν αποστειρωμένο χώμα, αυτό αποστειρώθηκε σε αυτόκαυστο για μία ώρα στους 121 °C και μετά την αποστείρωση επώαστηκε για 24 ώρες στους 28 °C. Μετά το πέρας της επώασης το χώμα αποστειρώθηκε για ακόμα μία ώρα στους 121 °C.

2.8.3. Προετοιμασία των σπόρων των εξεταζόμενων φυτών

Δεδομένου ότι για τις *in vivo* δοκιμασίες ανταγωνισμού χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικά φυτά, το φυτό της φασολιάς (*Phaseolous vulgaris*) και το φυτό της τομάτας (*Lycopersicon esculentum*), η προετοιμασία του καθενός από αυτά για τα συγκεκριμένα πειράματα διαφέρει και παρατίθεται αμέσως παρακάτω.

2.8.3.1. Προετοιμασία σπόρων φασολιού

Οι σπόροι της φασολιάς αποστειρώθηκαν κατόπιν επεξεργασίας τους με υδατικό διάλυμα υποχλωριώδους νατρίου (διάλυμα χλωρίνης) 20% όγκου κατ' όγκον για 30 min (Εικόνα 2.4). Οι σπόροι, αφού εκπλύθηκαν με απεσταγμένο και αποστειρωμένο νερό για τουλάχιστον 10 φορές, αφέθηκαν να στεγνώσουν υπό ασηπτικές συνθήκες σε αποστειρωμένο διηθητικό χαρτί.



Εικόνα 2.4. Σπόροι φασιολιάς αποστειρώνονται κατόπιν επεξεργασίας τους με υδατικό διάλυμα υποχλωριώδους νατρίου (διάλυμα χλωρίνης) 20% όγκου κατ' όγκον

2.8.3.2. Προετοιμασία σπόρων τομάτας

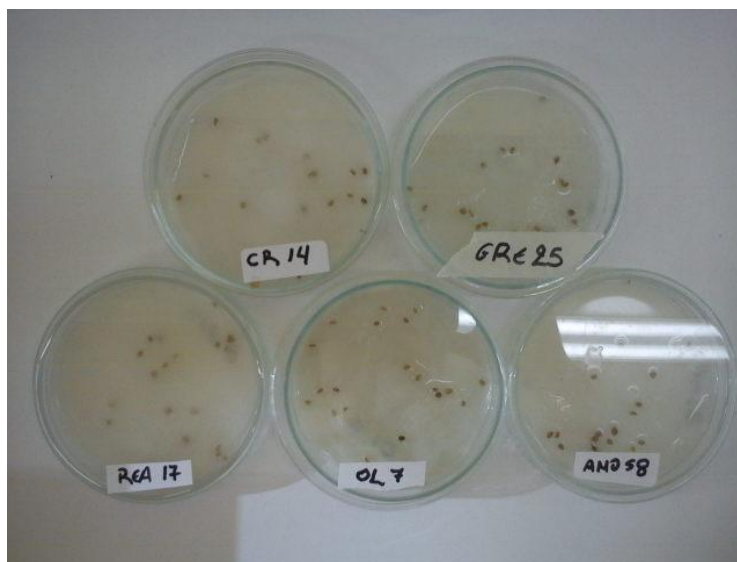
Οι σπόροι τομάτας απολυμαίνονται επιφανειακά για 1 min με ψεκάσμο με υδατικό διάλυμα αιθανόλης 70 % όγκου κατ' όγκον. Ακολούθησε έκπλυση των σπόρων με απεσταγμένο και αποστειρωμένο νερό σε πέντε επαναλήψεις. Στη συνέχεια, οι σπόροι εμβαπτίσθηκαν σε διάλυμα υποχλωριώδους νατρίου (διάλυμα χλωρίνης) 0,5 % όγκου κατ' όγκον για 5 min και, αφού εκπλύθηκαν τουλάχιστον 10 φορές με απεσταγμένο και αποστειρωμένο νερό, μεταφέρθηκαν σε αποστειρωμένα γυάλινα τρυβλία, όπου είχαν τοποθετηθεί φύλλα διηθητικού χαρτιού εμποτισμένα με 5,5 ml απεσταγμένου και αποστειρωμένου νερού. Κατόπιν, επώστηκαν για 3 ημέρες στους 28 °C, σε σκοτεινό θάλαμο επώασης, υπό ασηπτικές συνθήκες μέχρι να βλαστήσουν (Εικόνα 2.5.).

2.8.4. Καλλιέργειες μικροοργανισμών

2.8.4.1. Καλλιέργειες μυκήτων για τη μόλυνση του χόματος

Μικρό τμήμα μυκηλίου τόσο από τον φυτοπαθογόνο μύκητα *Rhizoctonia solani* DSM843 όσο και από τον φυτοπαθογόνο μύκητα *Fusarium oxysporum* DSM62059

τοποθετήθηκαν ξεχωριστά σε υγρό θρεπτικό υλικό NB (§2.2.2) και επώαστηκαν για 5 ημέρες στους 25 °C σε παλινδρομικό αναδευτήρα Orbital Shaker S03 (Stuart Scientific Ltd), στις 180 στροφές ανά λεπτό. Η βιομάζα του κάθε μύκητα συλλέχθηκε με διήθηση υπό κενό και εκπλύθηκε 2 φορές με διπλάσιο όγκο απεσταγμένου και αποστειρωμένου νερού. Το επιπλέον νερό απομακρύνθηκε με πίεση διαμέσου ηθμού και μετρήθηκε το νωπό βάρος του μυκηλίου καθενός από τους μύκητες. Για τις δοκιμασίες στις οποίες απαιτούνταν χόμα μολυσμένο με τον εκάστοτε μύκητα ζυγίστηκε μάζα νωπού μυκηλίου ίση με 3 g και επαναδιαλύθηκε σε 100 ml απεσταγμένου και αποστειρωμένου νερού. Το νερό αυτό αναμίχθηκε με 1 kg χόματος.



Εικόνα 2.4. Σπόροι τομάτας τοποθετημένοι σε τρυβλία μέσα στο θάλαμο επώασης για να επιταχυνθεί η βλάστησή τους

2.8.4.2. Καλλιέργειες στρεπτομυκήτων για την κάλυψη των σπόρων των φυτών στόχων

Τόσο για την κάλυψη των σπόρων του φασολιού και της τομάτας με σπόρια των επιλεγμένων στελεχών στρεπτομυκήτων όσο και για την εφαρμογή των τελευταίων απευθείας στο έδαφος, ώστε να ελεγχθεί η ικανότητά τους να αναστείλουν την παθογόνο δράση των εξεταζόμενων μυκήτων, παρασκευάστηκαν τα αντίστοιχα εναιωρήματα σπορίων των μικροοργανισμών.

Πραγματοποιήθηκαν καθαρές καλλιέργειες κάθε στρεπτομύκητα σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα AGS (§ 2.2.1). Μετά από 10 ημέρες επώασης στους 28 °C συλλέχθηκαν

υπό ασηπτικές συνθήκες τα σπόρια των μικροοργανισμών εναιωρούμενα σε διάλυμα Ringer's ¼ (§ 2.2.11). Η συγκέντρωση του εναιωρήματος καθενός από τα επιλεγμένα στελέχη στρεπτομυκήτων υπολογίστηκε (αριθμός σπορίων ανά ml εναιωρήματος) με τη χρήση κυτταρομέτρου και ακολούθησαν οι απαραίτητες διορθωτικές ενέργειες (αραιώσεις), ώστε κάθε εναιώρημα να έχει τελική συγκέντρωση 10^9 σπόρια ανά ml (Leclere και συνεργάτες, 2005).

2.8.5. Επεξεργασία των σπόρων των φυτών φασολιού και τομάτας με σπόρια των επιλεγμένων στρεπτομυκήτων

Στο πλαίσιο της μελέτης της αντιμυκητιακής δράσης των επιλεγμένων στρεπτομυκήτων *in vivo* για την προστασία φυτών στόχων, οι εξεταζόμενοι παράγοντες βιοελέγχου εφαρμόστηκαν απευθείας στους σπόρους των φυτών.

2.8.5.1. Επεξεργασία των σπόρων των φυτών φασολιού με σπόρια των επιλεγμένων στρεπτομυκήτων

Αποστειρωμένοι σπόροι φασολιού εμβαπτίστηκαν σε εναιώρημα σπορίων των επιλεγμένων στρεπτομυκήτων τελικής συγκέντρωσης 10^9 σπόρια ανά ml και παρέμειναν σε αυτό για 30 min. Στη συνέχεια, οι σπόροι αφαιρέθηκαν από το εναιώρημα και αφέθηκαν να στεγνώσουν υπό ασηπτικές συνθήκες πάνω σε αποστειρωμένο διηθητικό χαρτί (Lu και συνεργάτες, 2004, Sivan και Chet, 1989).

2.8.5.2. Επεξεργασία των σπόρων των φυτών τομάτας με σπόρια των επιλεγμένων στρεπτομυκήτων

Αποστειρωμένοι σπόροι τομάτας, οι οποίοι επωάζονταν με σκοπό τη βλάστησή τους για 3 ημέρες στους 28 °C, κατά το δεύτερο εικοσιτετράωρο της επώασης μεταφέρθηκαν σε αποστειρωμένα γυάλινα τρυβλία, όπου είχαν τοποθετηθεί φύλλα διηθητικού χαρτιού, εμποτισμένα με 5,5 ml εναιωρήματος σπορίων, τελικής συγκέντρωσης 10^9 σπόρια ανά ml, καθενός από τους επιλεγμένους στρεπτομυκήτες και η επώασή τους συνεχίστηκε για 48 ακόμα ώρες, σε σκοτεινό θάλαμο επώασης σε θερμοκρασία 28 °C.

2.8.6. Έλεγχος της *in vivo* ανταγωνιστικής ικανότητας των στρεπτομυκήτων κατά των φυτοπαθογόνων μυκήτων *Rhizoctonia solani* DSM843 και *Fusarium oxysporum* DSM62059

Τα πειράματα ελέγχου του ανταγωνισμού μεταξύ των επιλεγμένων μικροοργανισμών *in vivo* κατηγοριοποιήθηκαν ως ακολούθως:

Πειράματα σε μη αποστειρωμένο χώμα:

A. Σπόροι των φυτών-στόχων επεξεργασμένοι με σπόρια των επιλεγμένων στρεπτομυκήτων φυτεύτηκαν σε μη αποστειρωμένο χώμα μολυσμένο με καθέναν από τους εξεταζόμενους φυτοπαθογόνους μύκητες.

Μη επεξεργασμένοι σπόροι των φυτών-στόχων φυτεύτηκαν σε μη αποστειρωμένο χώμα μολυσμένο με καθέναν από τους εξεταζόμενους φυτοπαθογόνους μύκητες, στο οποίο είχε τοποθετηθεί εμβόλιο των επιλεγμένων στελεχών στρεπτομυκήτων. Το εμβόλιο των στρεπτομυκήτων είχε όγκο 15 ml, προερχόταν από το εναιώρημά τους, που είχε παρασκευαστεί με τελική συγκέντρωση 10^9 σπόρια ανά ml και τοποθετήθηκε στο ήδη μολυσμένο με τον εκάστοτε μύκητα χώμα.

Μη επεξεργασμένοι σπόροι των φυτών-στόχων (αποστειρωμένοι) φυτεύτηκαν σε μη αποστειρωμένο χώμα μολυσμένο με καθέναν από τους εξεταζόμενους μύκητες, ώστε να χρησιμοποιηθούν ως αρνητικός μάρτυρας.

Μη επεξεργασμένοι σπόροι των φυτών στόχων (αποστειρωμένοι) φυτεύτηκαν σε μη αποστειρωμένο χώμα, το οποίο δεν είχε μολυνθεί με κανέναν από τους εξεταζόμενους μύκητες, ώστε να χρησιμοποιηθούν ως θετικός μάρτυρας.

Η παραπάνω σειρά πειραμάτων αποσκοπούσε στην εκτίμηση της δυνατότητας των επιλεγμένων στρεπτομυκήτων να ελέγξουν τη φυτοπαθογόνο δράση των *Rhizoctonia solani* DSM843 και *Fusarium oxysporum* DSM62059 στα φυτά της φασολιάς και της τομάτας αντίστοιχα.

B. Σπόροι των φυτών-στόχων επεξεργασμένοι με σπόρια των επιλεγμένων στρεπτομυκήτων φυτεύτηκαν σε μη αποστειρωμένο χώμα, το οποίο δεν είχε μολυνθεί με κανέναν από τους εξεταζόμενους μύκητες.

Μη επεξεργασμένοι σπόροι των φυτών στόχων (αποστειρωμένοι) φυτεύτηκαν σε μη αποστειρωμένο χώμα, το οποίο δεν είχε μολυνθεί με κανέναν από τους εξεταζόμενους μύκητες, ώστε να χρησιμοποιηθούν ως μάρτυρας.

Η παραπάνω σειρά πειραμάτων αποσκοπούσε στην εκτίμηση της δυνατότητας των επιλεγμένων στρεπτομυκήτων να προωθήσουν την ανάπτυξη των φυτών στόχων, δρώντας ως αυξητικοί παράγοντες.

Πειράματα σε μη αποστειρωμένο χώμα:

Όλες οι παραπάνω πειραματικές σειρές (A, B) επαναλήφθηκαν με τη διαφορά ότι η φύτευση έγινε σε χώμα που πριν τη χρήση του στις δοκιμασίες είχε αποστειρωθεί (§ 2.8.2.).

2.8.6.1. Πρωτόκολλο φύτευσης και επώασης

Όλες οι δοκιμασίες ελέγχου της *in vivo* ανταγωνιστικής ικανότητας των επιλεγμένων στρεπτομυκήτων κατά των φυτοπαθογόνων μυκήτων *Rhizoctonia solani* DSM843 και *Fusarium oxysporum* DSM62059 πραγματοποιήθηκαν σε δοχεία φύτευσης διαστάσεων [6 cm Π × 6 cm Μ × 8 cm Υ]. Τα δοχεία πριν τη χρήση τους ψεκάστηκαν εσωτερικά με διάλυμα αιθανόλης 70 % όγκου κατ' όγκον (§ 2.2.18) και στέγνωσαν υπό υπεριώδη ακτινοβολία για 20 min, με σκοπό την αποστείρωση των επιφανειών στις οποίες θα τοποθετούνταν το χώμα. Σε κάθε δοχείο τοποθετήθηκε χώμα, αποστειρωμένο ή μη, μολυσμένο με μύκητες ή μη, εμπλουτισμένο με διάλυμα σπορίων στρεπτομύκητα ή μη, όπως καθόριζε η εκάστοτε δοκιμασία, μέχρι το ύψος των 6 cm. Οι σπόροι των φυτών, επεξεργασμένοι με τα σπόρια των στρεπτομυκήτων ή μη, όπως υπαγόρευε το κάθε πρωτόκολλο, φυτεύτηκαν σε βάθος 3 cm. Σε κάθε δοχείο τοποθετήθηκαν 3 σπόροι του εξεταζόμενου φυτού και για κάθε σειρά πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν 8 δοχεία. Η κάθε πειραματική διαδικασία που εξέταζε τη συμπεριφορά συνολικά 24 φυτικών σπόρων υπό τις καθορισμένες συνθήκες επαναλήφθηκε τρεις φορές σε ανεξάρτητες χρονικές περιόδους.

Οι καλλιέργειες των σπόρων φασολιού και τομάτας διήρκησαν 25 ημέρες και η υγρασία ελεγχόταν καθημερινά και με αποστειρωμένο νερό βρύσης, ώστε η υγρασία να έχει τελική τιμή 40 % (Simon και συνεργάτες, 2001). Η θερμοκρασία επώασης

καθορίστηκε στους 28 °C, ενώ η φωτοπερίοδος ρυθμίστηκε στις 16 ώρες με φως φθορισμού και 8 ώρες σε σκοτάδι.

2.8.6.2. Παράμετροι φύτευσης

Η εκτίμηση τόσο της αντιμυκητιακής δράσης των επιλεγμένων στρεπτομυκίτων *in vivo* όσο και για τον έλεγχο της ικανότητάς τους να δρουν ως αυξητικοί παράγοντες, προωθώντας την φύτευση και την αύξηση των φυτών-στόχων πραγματοποιήθηκε μέσω της καταγραφής του αριθμού των σπόρων που φύτευσαν και του υπολογισμού του ποσοστού φύτευσης ως προς το σύνολο των σπόρων που φυτεύτηκαν, της μέτρησης του ύψους (cm) και του βάρους (g) των φυτών μετά το πέρας της επώασής τους, σύμφωνα με το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε (§ 2.8.6.1.), ενώ σημειώθηκαν μακροσκοπικά ευρήματα παθογένειας (κακώσεις, αλλοιώσεις, παραμορφώσεις, δυσχρωματισμοί) στους ιστούς των φυτών.

2.8.6.3. Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων

Η στατιστική ανάλυση των διαφόρων συνόλων δεδομένων πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο ANOVA One-Way (με post-hoc πολλαπλές συγκρίσεις κατά ζεύγη σύμφωνα με τη μέθοδο Holm-Sidak), καθώς και την εφαρμογή απλών t - tests με τη χρήση του λογισμικού SigmaStat / Plot (Έκδοση 12.0, Systat Software Inc.). Σε όλες τις αναλύσεις το επίπεδο σημαντικότητας καθορίστηκε σε τιμή <0,05.

3

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1. IN VITRO ΑΝΤΙΜΥΚΗΤΙΑΚΗ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΕΝΔΗΜΙΚΩΝ ΣΤΡΕΠΤΟΜΥΚΗΤΩΝ

Τα 606 στελέχη στρεπτομυκήτων που επιλέχθηκαν από τη συλλογή βακτηρίων του Εργαστηρίου έχουν απομονωθεί από δώδεκα διαφορετικά ενδιαιτήματα του ελλαδικού χώρου, τα οποία χαρακτηρίζονται από ιδιαίτερα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά (Πίνακας 3.1.). Στο πλαίσιο της διερεύνησης της βιοτεχνολογικής αξιοποίησης αυτών των μικροοργανισμών εξετάστηκε η ικανότητά τους να αναστέλλουν την αύξηση καθενός από τους φυτοπαθογόνους μύκητες *Rhizoctonia solani* DSM843 και *Fusarium oxysporum* DSM62059.

Πίνακας 3.1. Αριθμητική κατανομή απομονωθέντων στρεπτομυκήτων στις διαφορετικές περιοχές δειγματοληψίας

ΠΕΡΙΟΧΕΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑΣ	Αριθμός στελεχών
Δείγματα εδάφους από τη ριζόσφαιρα συγκεκριμένων φυτών του ελλαδικού χώρου	
1. Ριζόσφαιρα του ενδημικού φυτού <i>Ebenus siphthorpii</i>	38
2. Ριζόσφαιρα του φυτού <i>Ceratonia siliqua</i>	47
3. Ριζόσφαιρα του φυτού <i>Olea europea</i>	75
4. Ριζόσφαιρα του ενδημικού φυτού <i>Abies cefalonica</i>	20
5. Ριζόσφαιρα του φυτού <i>Pinus brutia</i> (ενδημικό φυτό της Κρήτης)	24
Δείγματα εδάφους από τη ριζόσφαιρα φυτών σε διάφορες περιοχές του ελλαδικού χώρου	
6. Ριζόσφαιρα αείφυλλων θάμνων αυτοφυών σε νησί του Αιγαίου	22
7. Ριζόσφαιρα αείφυλλων θάμνων αυτοφυών σε νησί του Ιονίου	30
8. Ριζόσφαιρα κωνοφόρων δέντρων	100
Δείγματα από περιοχές ή οικοσυστήματα του ελλαδικού χώρου με ιδιαίζουσες περιβαλλοντικές συνθήκες	
9. Δείγμα νερού και ιζήματος από τις θερμοπηγές των Θερμοπυλών	5
10. Δείγμα από θαλάσσιο ηφαιστειακό ιζήμα	30
11. Εδαφικό δείγμα από διαταραγμένη καλλιεργήσιμη έκταση	188
12. Εδαφικό δείγμα από προστατευόμενη φυσική δασική περιοχή	27

Το μεγαλύτερο ποσοστό των εξεταζόμενων στρεπτομυκήτων (περίπου το 58 % του συνόλου των απομονωθέντων) προερχόταν από δείγμα ριζόσφαιρας είτε συγκεκριμένων φυτών του ελλαδικού χώρου (204 στελέχη) είτε διάφορων φυτών σε διάφορες περιοχές της Ελλάδας (152 στελέχη). Οι υπόλοιποι στρεπτομύκητες, που εξετάστηκαν ως προς την αντιμυκητιακή τους δράση (250 στελέχη, που αντιστοιχούν στο 42 % του συνόλου των απομονωθέντων), προέρχονταν από μη ριζοσφαιρικά

δείγματα αλλά από Δείγματα από περιοχές ή οικοσυστήματα του ελλαδικού χώρου με ιδιαίζουσες περιβαλλοντικές συνθήκες, όπως τις θερμοπηγές των Θερμοπυλών, ίζημα από το ηφαίστειο της Σαντορίνης, διαταραγμένη καλλιεργήσιμη έκταση του Μαραθώνα Αττικής και προστατευόμενη φυσική δασική περιοχή στην Καισαριανή Αττικής.

3.1.1. *In vitro* αντιμυκητιακή δραστηριότητα των ενδημικών στρεπτομυκήτων εναντίον του φυτοπαθογόνου μύκητα *Rhizoctonia solani* DSM843

Ένα σύνολο 213 στελεχών στρεπτομυκήτων, που αντιστοιχεί στο 35,2 % επί του συνόλου των στελεχών που εξετάστηκαν παρουσίασε την ικανότητα να αναστέλλει την ανάπτυξη του *Rhizoctonia solani* DSM843 (§2.3.1.).

Κανένας στρεπτομύκητας απομονωμένος από τη ριζόσφαιρα του *Abies cefalonica* ή από τη ριζόσφαιρα αειθαλών θάμνων νησιού του Ιονίου δεν είχε τη δυνατότητα να εμποδίσει την ανάπτυξη αυτού του μύκητα. Επιπλέον, όσα στελέχη είχαν απομονωθεί από τη θαλάσσια περιοχή της Σαντορίνης εμφάνισαν ελάχιστη αντιμυκητιακή δράση και μόνο ένα στέλεχος από τα τριάντα εξεταζόμενα ανέστειλλε τον *Rhizoctonia solani* DSM843 (Πίνακας 3.2.). Οι στρεπτομύκητες που απομονώθηκαν από δείγμα νερού και ιζήματος από τις θερμοπηγές των Θερμοπυλών ήταν λίγοι (μόλις πέντε στελέχη) αλλά όλοι τους (100 %) εκδήλωσαν αντιμυκητιακή δράση (Πίνακας 3.2.).

3.1.1.1. Ποσοτικοποίηση της *in vitro* ανταγωνιστικής δράσης των απομονωμένων στρεπτομυκήτων εναντίον του φυτοπαθογόνου μύκητα *Rhizoctonia solani* DSM843

Όσα από τα εξεταζόμενα απομονωμένα στελέχη στρεπτομυκήτων έδειξαν να είναι ικανά να παρεμποδίζουν την ανάπτυξη του μύκητα *Rhizoctonia solani* DSM843, προσδιορίστηκε η αντιμυκητιακή τους ικανότητα με μέτρο το πηλίκο του εμβαδού της ζώνης αναστολής της ανάπτυξης του μύκητα που σχηματίστηκε γύρω από την αποικία του εκάστοτε εξεταζόμενου στρεπτομύκητα προς το εμβαδόν της αποικίας του Στρεπτομύκητα ($\pi R_{ζ.αν.}^2 / \pi R_{σπ.}^2$) (§2.3.2.). Τα αποτελέσματα αναφέρονται σε συνάρτηση με την περιοχή δειγματοληψίας και παρουσιάζονται αναλυτικά στους Πίνακες 3.3-3.12.

Πίνακας 3.2. Ποσοστό στρεπτομυκήτων με ικανότητα αναστολής του μύκητα *Rhizoctonia solani* DSM843, ανά περιοχή δειγματοληψίας

Περιοχές Δειγματοληψίας	Ποσοστό απομονωθέντων στρεπτομυκήτων με ανασταλτική δράση έναντι του <i>Rhizoctonia solani</i> DSM843 επί του συνόλου των απομονωθέντων ανά περιοχή
Δείγματα εδάφους από τη ριζόσφαιρα συγκεκριμένων φυτών του ελλαδικού χώρου	
1	26,3 %
2	19,1 %
3	33,3 %
4	0,0 %
5	50,0 %
Δείγματα εδάφους από τη ριζόσφαιρα φυτών σε διάφορες περιοχές του ελλαδικού χώρου	
6	59,1 %
7	0,0 %
8	26,0 %
Δείγματα από περιοχές ή οικοσυστήματα του ελλαδικού χώρου με ιδιαίζουσες περιβαλλοντικές συνθήκες	
9	100,0 %
10	3,3 %
11	53,7 %
12	44,4 %

Πίνακας 3.3. Μέγεθος της ανταγωνιστικής δράσης των θετικών ως την ικανότητά τους να αναστέλλουν τον μύκητα *Rhizoctonia solani* DSM843 στρεπτομυκήτων, που απομονώθηκαν από τη ριζόσφαιρα του ενδημικού φυτού *Ebenus siphthorii*

Στέλεχος	Μέτρο αντιμυκητιακής δράσης έναντι <i>Rhizoctonia solani</i> DSM843
REA 17	7,44
REA 47/1	6,02
REA 47	1,21
REA 64	7,44
REA Σ4	4,31
REA 67	4,90
REA 68	3,70
REA 75	3,31
REA 76	2,93
REA 83	3,64

Ο αριθμός των στελεχών, που απομονώθηκαν από τη ριζόσφαιρα του ενδημικού φυτού *Ebenus siphthorpii* και δείχθηκε να αναστέλλουν την ανάπτυξη του *Rhizoctonia solani* DSM843 (Πίνακας 3.3), ανήλθε στα 10, που αντιστοιχεί σε ποσοστό της τάξης του 25 % του συνόλου των απομονωθέντων. Ο μέσος όρος της αντιμυκητιακής τους δράσης υπολογίστηκε στο 4,5, ενώ δύο στελέχη (REA 17, REA 64) εξέφρασαν αρκετά έντονο αντιμυκητιακό χαρακτήρα (7, 44) (§2.3.2.).

Πίνακας 3.4. Μέγεθος της ανταγωνιστικής δράσης των θετικών ως προς την ικανότητά τους να αναστέλλουν τον μύκητα *Rhizoctonia solani* DSM843 στρεπτομυκήτων, που απομονώθηκαν από τη ριζόσφαιρα του φυτού *Ceratonia siliqua*

Στέλεχος	Μέτρο αντιμυκητιακής δράσης έναντι <i>Rhizoctonia solani</i> DSM843
CA 12	4,25
CA 23	5,44
CA 29	2,44
CA 35	1,32
CA 44	1,56
CA 45	1,75
CA 55	2,77
XAP 2	2,86
XAP 3	1,56

Από την περιοχή της ριζόσφαιρας του φυτού *Ceratonia siliqua* (Πίνακας 3.4) απομονώθηκαν συνολικά 47 βακτήρια που ανήκαν στο γένος των Στρεπτομυκήτων, εκ των οποίων τα 9 (ποσοστό ίσο με 19,1 %) εκδήλωσαν ανταγωνιστικότητα απέναντι στον μύκητα *Rhizoctonia solani* DSM843. Η μέγιστη τιμή της έντασης της αντιμυκητιακής δράσης συγκρίνεται με τη μέση τιμή άλλων περιοχών. Προκύπτει έτσι ότι τόσο ποσοτικά όσο και ποιοτικά η συγκεκριμένη περιοχή δειγματοληψίας δεν κατατάσσεται στις περιοχές μεγάλου ενδιαφέροντος για την ανεύρεση ικανών υποψήφιων παραγόντων βιοελέγχου του φυτοπαθογόνου μύκητα.

Τα στελέχη στρεπτομυκήτων που απομονώθηκαν από τη ριζόσφαιρα του φυτού *Olea europa* (Πίνακας 3.5) ήταν πολλά με αρκετά υψηλό ποσοστό τους να παρεμποδίζει την ανάπτυξη του φυτοπαθογόνου μύκητα που εξετάστηκε. Συνεπώς, αρκετά μεγάλος αριθμός στελεχών αξιολογήθηκε ως προς την ένταση της αντιμυκητιακής δράσης τους, η οποία υπολογίστηκε σε αρκετά υψηλά επίπεδα (11,6, τιμή που εντάσσεται στις υψηλότερες που προσδιορίστηκαν σε όλα τα στελέχη όλων των περιοχών

δειγματοληψίας). Έτσι, το συγκεκριμένο ενδιαίτημα αποτέλεσε πηγή επιλογής στρεπτομυκήτων για τη συνέχιση της έρευνας.

Πίνακας 3.5. Μέγεθος της ανταγωνιστικής δράσης των θετικών, ως προς την ικανότητά τους να αναστέλλουν τον μύκητα *Rhizoctonia solani* DSM843 στρεπτομυκήτων, που απομονώθηκαν από τη ριζόσφαιρα του φυτού *Olea europaea*

Στέλεχος	Μέτρο αντιμυκητιακής δράσης έναντι <i>Rhizoctonia solani</i> DSM843	Στέλεχος	Μέτρο αντιμυκητιακής δράσης έναντι <i>Rhizoctonia solani</i> DSM843
OL 3	5,06	OL 50	4,27
OL 6	1,59	OL 52	1,56
OL 7	8,20	OL 54	4,51
OL 12	6,34	OL 56	3,45
OL 13	9,00	OL 58	1,96
OL 17	2,73	OL 63	1,93
OL 20	1,63	OL 66	4,00
OL 30	5,76	OL 67	2,80
OL 31	2,85	OL 75	1,89
OL 37	6,60	OL 78	1,47
OL 41	2,44	OL 80	11,56
OL 44	4,38	ΕΛΙΑ 8	1,156
OL 48	5,06		

Πίνακας 3.6. Μέγεθος της ανταγωνιστικής δράσης των θετικών ως προς την ικανότητά τους να αναστέλλουν τον μύκητα *Rhizoctonia solani* DSM843 στρεπτομυκήτων, που απομονώθηκαν από τη ριζόσφαιρα του φυτού *Pinus brutia* (ενδημικό φυτό της Κρήτης)

Στέλεχος	Μέτρο αντιμυκητιακής δράσης έναντι <i>Rhizoctonia solani</i> DSM843
GRE 34	1,88
GRE 20	2,70
GRE 19	2,92
GRE 24/1κοκ	3,4
GRE 24/1Λ	9,0
GRE 24/3B	5,06
GRE 1/1	3,54
GRE 22	5,58
GRE 14	2,56
GRE 3	3,52
GRE 25	9,68
GRE 10	4,39

Αν και ο αριθμός των στελεχών, που προέρχονται από τη ριζόσφαιρα του φυτού *Pinus brutia*, το οποίο αποτελεί ενδημικό φυτικό είδος της Κρήτης, και τα οποία κρίθηκαν ικανά να αναστείλουν την ανάπτυξη του *Rhizoctonia solani* DSM843 in

in vitro ήταν μικρός (Πίνακας 3.6), ωστόσο αντιστοιχεί στο 50 % των στελεχών στρεπτομυκήτων που εποικούν αυτόν τον βιότοπο. Γενικά, ο αντιμυκητικός χαρακτήρας, που εξέφρασαν αυτά τα 12 στελέχη ήταν ισχυρός, αφού υπολογίστηκε σε ένα εύρος τιμών μεταξύ 1,9 και 9,7 περίπου, με τον μέσο όρο να ανέρχεται στο 4,5.

Πίνακας 3.7. Μέγεθος της ανταγωνιστικής δράσης των θετικών, ως προς την ικανότητά τους να αναστέλλουν τον μύκητα *Rhizoctonia solani* DSM843 στρεπτομυκήτων, που απομονώθηκαν από τη ριζόσφαιρα αείφυλλων θάμνων αυτοφυών σε νησί του Αιγαίου

Στέλεχος	Μέτρο αντιμυκητιακής δράσης έναντι <i>Rhizoctonia solani</i> DSM843
AMO 38	4,97
AMO 43	6,25
AMO 44	5,55
AMO 45	3,76
AMO 47	2,77
AMO 48	4,80
AMO 49	1,21
AMO 51	3,30
AMO 55	3,73
AMO 57	2,62
AMO 58	12,56
AMO 60	2,86
AMO 64	6,61

Από τους στρεπτομύκητες, που απομονώθηκαν από τη ριζόσφαιρα αείφυλλων θάμνων αυτοφυών στη Σάμο (νησί του Ανατολικού Αιγαίου) (Πίνακας 3.7), ένα σύνολο 13 στελεχών (ποσοστό ίσο με το 59 % των απομονωθέντων από το συγκεκριμένο ενδιαίτημα) έδρασε ανταγωνιστικά έναντι του φυτοπαθογόνου μύκητα *Rhizoctonia solani* DSM843. Η ισχύς της αντιμυκητιακής δράσης αυτών των στελεχών ήταν πολύ μεγάλη, καθώς μεταξύ αυτών των στελεχών καταγράφηκε η υψηλότερη τιμή που υπολογίστηκε μεταξύ όλων των εξεταζόμενων στρεπτομυκήτων, απ' όλες τις περιοχές δειγματοληψίας (AMO58: 12,56). Ο μέσος όρος της αντιμυκητιακής ισχύος ήταν επίσης υψηλός (τιμή ίση με 5).

Από τα 100 στελέχη, που απομονώθηκαν από τη ριζόσφαιρα κονωφόρων δένδρων και οι οποίοι κατόπιν ταυτοποίησης ταξινομήθηκαν στο γένος των Στρεπτομυκήτων, το 26 % αυτών κρίθηκε ικανό να αναστείλει την ανάπτυξη του μυκηλίου του *Rhizoctonia solani* DSM843 σε *in vitro* δοκιμασία ανταγωνισμού. Η ισχύς της προσδιορίσιμης αντιμυκητιακής ικανότητας υπολογίστηκε σε μέτρια επίπεδα, καθώς

η υψηλότερη τιμή δεν ξεπέρασε το 7,6, ενώ η μέση τιμή ήταν 3,6. Σημειώνεται ότι στην πλειοψηφία των 26 στελεχών που εξετάστηκαν η ένταση της αντιμυκητιακής ικανότητάς του ήταν πολύ κοντά στον μέσο όρο, ενώ πολύ λίγα έφτασαν τις υψηλότερες και χαμηλότερες τιμές που προσδιορίστηκαν.

Πίνακας 3.8. Μέγεθος της ανταγωνιστικής δράσης των θετικών, ως προς την ικανότητά τους να αναστέλλουν τον μύκητα *Rhizoctonia solani* DSM843 στρεπτομυκήτων, που απομονώθηκαν από τη ριζόσφαιρα κωνοφόρων δένδρων

Στέλεχος	Μέτρο αντιμυκητιακής δράσης έναντι <i>Rhizoctonia solani</i> DSM843	Στέλεχος	Μέτρο αντιμυκητιακής δράσης έναντι <i>Rhizoctonia solani</i> DSM843
CR13	5,35	CR78	2,04
CR14	5,55	CR81	4,72
CR28	3,19	CR83	7,56
CR38	2,66	CR84	6,10
CR47	7,36	CR85	3,13
CR53	2,77	CR86	1,36
CR63	2,73	CR92	7,60
CR65	1,90	CR94	2,15
CR69	2,18	CR97	1,71
CR73	2,37	CR80	7,11
CR74	3,13	CR59	2,56
CR76	3,06	CR68	1,54
CR77	3,72	CR82	3,83

Πίνακας 3.9. Μέγεθος της ανταγωνιστικής δράσης των θετικών, ως προς την ικανότητά τους να αναστέλλουν τον μύκητα *Rhizoctonia solani* DSM843 στρεπτομυκήτων, που απομονώθηκαν από δείγμα νερού και ιζήματος από τις θερμοπηγές των Θερμοπυλών

Στέλεχος	Μέτρο αντιμυκητιακής δράσης έναντι <i>Rhizoctonia solani</i> DSM843
THS 14	6,10
THS 15	6,98
THS 22	2,19
THS 23	4,00
THW 2	6,25

Αν και οι Στρεπτομύκητες, που απομονώθηκαν τόσο από νερό όσο και από ίζημα των θερμοπηγών της περιοχής των Θερμοπυλών ήταν πολύ μικρός, δεδομένου ότι μόνο 5 στελέχη εξετάστηκαν, παρόλα αυτά και οι 5 μικροοργανισμοί είχαν την ικανότητα να αναστέλλουν την ανάπτυξη του *Rhizoctonia solani* DSM843. Αυτή η αντιμυκητιακή δράση ήταν αρκετά έντονη στους 3 από τους 5 Στρεπτομύκητες, αφού κυμάνθηκε μεταξύ της τιμής 6 και της τιμής 7, ενώ ακόμα και η χαμηλότερη τιμή που μετρήθηκε

στο στέλεχος THS22 ήταν σημαντικά υψηλότερη από τις ελάχιστες τιμές που προσδιορίστηκαν στο σύνολο των περιοχών δειγματοληψίας που εξετάστηκαν.

Πίνακας 3.10. Μέγεθος της ανταγωνιστικής δράσης των θετικών, ως προς την ικανότητά τους να αναστέλλουν τον μύκητα *Rhizoctonia solani* DSM843 στρεπτομυκήτων, που απομονώθηκαν από δείγμα, που προερχόταν από θαλάσσιο ηφαιστειακό ίζημα

Στέλεχος	Μέτρο αντιμυκητιακής δράσης έναντι <i>Rhizoctonia solani</i> DSM843
VOL 4	5,58

Από το δείγμα θαλάσσιου ηφαιστειακού ιζήματος (ηφαίστειο Σαντορίνης) απομονώθηκαν πολύ λίγοι στρεπτομύκητες και μόλις ένας από αυτούς είχε την ικανότητα να παρεμποδίσει την εξάπλωση του μυκηλίου του *Rhizoctonia solani* DSM843 *in vitro*. Η αντιμυκητιακή του ικανότητα χαρακτηρίστηκε ως μέτριας έντασης, καθώς η ισχύς της υπολογίστηκε ίση με την τιμή 5,58.

Το εδαφικό δείγμα από διαταραγμένη καλλιεργήσιμη έκταση (Μαραθόνας Αττικής) ήταν πολύ πλούσιο σε στρεπτομύκητες, αφού απομονώθηκαν από αυτό 188 στελέχη. Ο αριθμός αυτός είναι ο μεγαλύτερος που καταγράφηκε από όλα τα ενδιαιτήματα που εξετάστηκαν. Το αποτέλεσμα αυτό, σε συνδυασμό και με το υψηλό ποσοστό θετικών (53,8 %) ως προς την αντιμυκητιακή τους ικανότητα στρεπτομυκήτων, οδήγησαν στο μεγαλύτερο πλήθος στελεχών-υποψηφίων παραγόντων βιοελέγχου που εξετάστηκαν από κάθε περιοχή δειγματοληψίας. Τα 101 στελέχη, των οποίων η ανταγωνιστική συμπεριφορά έναντι του *Rhizoctonia solani* DSM843 ποσοτικοποιήθηκε, χαρακτηρίστηκαν, σύμφωνα με τα αποτελέσματα, ως ήπια ανταγωνιστικά, αφού η μέγιστη τιμή που καταγράφηκε ήταν 9,2. Ο μέσος όρος της ισχύος της αντιμυκητιακής δράσης που εξέφρασαν ήταν 3,9. Η τιμή αυτή οφείλεται στο ότι οι περισσότεροι στρεπτομύκητες είχαν χαμηλή έως μέτρια αντιμυκητιακή ισχύ, ενώ σε πολύ λιγότερους η τιμή που υπολογίστηκε ήταν κοντά στη μέγιστη.

Τέλος, το εδαφικό δείγμα από προστατευόμενη φυσική δασική περιοχή (Καισαριανή Αττικής) παρείχε 27 στρεπτομύκητες προς εξέταση σε σχέση με την ικανότητά τους να ανταγωνίζονται τον φυτοπαθογόνο μύκητα *Rhizoctonia solani* DSM843. Το 44,4 % αυτών καταγράφηκαν θετικοί ως προς την παραπάνω ικανότητα. Από τα αποτελέσματα της ποσοτικοποίησης αυτής της ικανότητάς τους δεν προέκυψε πολύ υψηλή μέγιστη τιμή στην ισχύ της αντιμυκητιακής τους δράσης αλλά όχι και πολύ

χαμηλή ελάχιστη τιμή. Στην πλειονότητα των στελεχών η αντιμυκητιακή δυναμική ήταν μέτρια.

Πίνακας 3.11 (α) Μέγεθος της ανταγωνιστικής δράσης των θετικών, ως προς την ικανότητά τους να αναστέλλουν τον μύκητα *Rhizoctonia solani* DSM843 στρεπτομυκήτων, που απομονώθηκαν από εδαφικό δείγμα από διαταραγμένη καλλιεργήσιμη έκταση

Στέλεχος	Μέτρο αντιμυκητιακής δράσης έναντι <i>Rhizoctonia solani</i> DSM843	Στέλεχος	Μέτρο αντιμυκητιακής δράσης έναντι <i>Rhizoctonia solani</i> DSM843
S 2	5,35	CAG 25	5,94
S 14/1	2,15	CAG 25thior	4,13
S 16	2,04	CAG 25/2	7,24
S 17	5,64	CAG 26	2,88
S 24/1	2,44	M 5	8,10
S 24/2	3,09	M 7	7,40
S 27/2	1,73	M 10	2,77
S 35	2,60	M 16	2,30
S 38	3,74	M 17	4,73
S 45	4,28	M 18	4,30
S 47	6,57	M 23	3,06
S 63	5,14	M 25	3,73
S 64	5,81	M 26	4,78
S 65	3,53	M 27	4,25
S 81	4,00	M 33	6,92
S 85	6,44	M 39	1,56
S 152	7,47	M 42	3,45
S 165	4,78	M 44	1,93
S MS	5,34	M 46	1,89
S 8	5,22	M 47	1,33
CAG 1	3,62	M 48	5,68
CAG 2/1	3,21	M 49	2,36
CAG 2/2	2,15	M 51	2,15
CAG 4/1	5,53	M 53	5,44
CAG 5thior	2,71	M 57	2,80
CAG 9/2	4,22	M 58	5,06
CAG 10	1,22	M 59	2,77
CAG 13/1	1,67	M 60	5,16
CAG 13/2	6,08	M 61	7,34
CAG 17Rif	3,62	M 62	2,73
CAG 19	4,22	M 63	2,70
CAG 21	4,20	M 64	4,30
CAG 23	4,45	M 65	5,14

Πίνακας 3.11 (β) Μέγεθος της ανταγωνιστικής δράσης των θετικών, ως προς την ικανότητά τους να αναστέλλουν τον μύκητα *Rhizoctonia solani* DSM843 στρεπτομυκήτων, που απομονώθηκαν από εδαφικό δείγμα από διαταραγμένη καλλιεργήσιμη έκταση

Στέλεχος	Μέτρο αντιμυκητιακής δράσης έναντι <i>Rhizoctonia solani</i> DSM843	Στέλεχος	Μέτρο αντιμυκητιακής δράσης έναντι <i>Rhizoctonia solani</i> DSM843
M 67	5,06	M 98	5,94
M 68	6,76	M 100	4,00
M 71	6,66	M 103	3,90
M 74	2,11	M 104	2,74
M 75	7,44	M 105	4,74
M 81	2,70	M 107	6,02
M 84	3,16	M 108	2,97
M 85	1,36	M 110	3,24
M 86	2,82	M 111	2,86
M 88	1,56	M 112	3,45
M 90	2,07	M 114	2,25
M 43γ	9,24	M 115	4,00
M 91	4,23	M 121	3,13
M 92	2,25	M 123	2,25
M 94	3,42	M 124	1,64
M 95	4,27	M 126	2,20
M 96	1,38	M 127	1,29
M 97	2,25		

Πίνακας 3.12. Μέγεθος της ανταγωνιστικής δράσης των θετικών ως προς την ικανότητά τους να αναστέλλουν τον μύκητα *Rhizoctonia solani* DSM843 στρεπτομυκήτων, που απομονώθηκαν από εδαφικό δείγμα από προστατευόμενη φυσική δασική έκταση

Στέλεχος	Μέτρο αντιμυκητιακής δράσης έναντι <i>Rhizoctonia solani</i> DSM843
K 3	3,13
K 7	2,48
K 14	3,88
K 17	3,54
K 23	6,08
K 47	9,63
ASE 9	6,76
ASE 10	4,31
ASE 11	4,50
ASE 19	7,11
ASE 20	5,76
ASE 22	7,50

Τα παραπάνω αποτελέσματα συγκεντρώνονται στον Πίνακα 3.13, όπου παρουσιάζονται κατά σειρά η υψηλότερη τιμή, η χαμηλότερη τιμή και ο μέσος όρος του μεγέθους της αντιμυκητιακής ικανότητας *in vitro* όσων στρεπτομυκήτων την επέδειξαν σε κάθε περιοχή δειγματοληψίας. Έτσι παρέχεται μια συγκεντρωτική εικόνα της δυναμικής των περιοχών δειγματοληψίας να φιλοξενούν μικροοργανισμούς με έντονη ή λιγότερο έντονη ανταγωνιστική δράση ενάντια στον φυτοπαθογόνο μύκητα *Rhizoctonia solani* DSM843.

Πίνακας 3.13. Μέγιστη και ελάχιστη τιμή αλλά και μέσος όρος τιμής της ανταγωνιστικής δράσης των θετικών ως προς την ικανότητά τους να αναστέλλουν τον μύκητα *Rhizoctonia solani* DSM843 στρεπτομυκήτων, που απομονώθηκαν τις εξεταζόμενες περιοχές δειγματοληψίας

Περιοχές Δειγματοληψίας	Μέγεθος ανασταλτικής δράσης των απομονωμένων στρεπτομυκήτων έναντι του <i>Rhizoctonia solani</i> DSM843 ($\pi R_{ζαν.}^2 / \pi R_{στρ}^2$) {υψηλότερος – χαμηλότερος – μέσος όρος}
Δείγματα εδάφους από τη ριζόσφαιρα συγκεκριμένων φυτών του ελλαδικού χώρου	
1	7,4 – 1,3 – 4,5
2	5,4 – 1,3 – 2,8
3	11,6 – 1,3 – 4,1
5	9,7 – 1,9 – 4,5
Δείγματα εδάφους από τη ριζόσφαιρα φυτών σε διάφορες περιοχές του ελλαδικού χώρου	
6	12,5 – 1,3 – 5,0
8	7,6 – 1,4 – 3,7
Δείγματα από περιοχές ή οικοσυστήματα του ελλαδικού χώρου με ιδιαίζουσες περιβαλλοντικές συνθήκες	
9	7,0 – 2,2 – 5,1
10	5,6 – 5,6 – 5,6
11	9,2 – 1,3 – 3,9
12	9,6 – 2,5 – 5,4

Όπως παρουσιάζεται στον πίνακα Πίνακα 3.13, οι μεγαλύτερες τιμές στην ανταγωνιστική ικανότητα εναντίον του φυτοπαθογόνου μύκητα *Rhizoctonia solani* DSM843 μετρήθηκαν από στρεπτομύκητες, που απομονώθηκαν από τη ριζόσφαιρα του φυτού *Olea europaea*, καθώς και από τη ριζόσφαιρα αείφυλλων θάμνων αυτοφυών σε νησί του Αιγαίου. Σε αντίθεση με το πρώτο, το δεύτερο ενδιαίτημα περιλαμβάνεται, μαζί με το δείγμα νερού και ιζήματος από τις θερμοπηγές των Θερμοπυλών και το δείγμα από θαλάσσιο ηφαιστειακό ίζημα, στα οικοσυστήματα,

από τα οποία απομονώθηκαν οι στρεπτομύκητες, οι οποίοι εκδήλωσαν κατά μέσο όρο την ισχυρότερη αντυμυκητιακή ικανότητα.

3.1.2. *In vitro* αντιμυκητιακή δραστηριότητα των ενδημικών στρεπτομυκήτων εναντίον του φυτοπαθογόνου μύκητα *Fusarium oxysporum* DSM62059

Από το σύνολο των εξεταζόμενων στρεπτομυκήτων, 39 στελέχη εμφάνισαν αντιμυκητιακή δράση έναντι του φυτοπαθογόνου μύκητα *Fusarium oxysporum* DSM62059. Αυτό σημαίνει ότι ποσοστό που μόλις άγγιζε το 7 % του συνόλου των εξεταζόμενων στρεπτομυκήτων μπορούσε να σταματήσει την αύξηση του μύκητα, ώστε να χρησιμοποιηθούν ως πιθανοί παράγοντες βιοελέγχου.

Το ενδιαίτημα το οποίο έδωσε το μεγαλύτερο ποσοστό στελεχών που μπορούσαν να αναστείλουν τον *F. oxysporum* DSM62059 *in vitro* ήταν η ριζόσφαιρα αείφυλλων θάμνων αυτοφυών σε νησί του Αιγαίου, ενώ στελέχη που απομονώθηκαν από τη ριζόσφαιρα αείφυλλων θάμνων αυτοφυών σε νησί του Ιονίου δεν παρουσίασαν τέτοια δυνατότητα (Πίνακας 3.14.).

Πίνακας 3.14. Ποσοστό στρεπτομυκήτων με ικανότητα αναστολής του μύκητα *Fusarium oxysporum* DSM62059, ανά περιοχή δειγματοληψίας

Περιοχές Δειγματοληψίας	Ποσοστό απομονωθέντων στρεπτομυκήτων με ανασταλτική δράση έναντι του <i>Fusarium oxysporum</i> DSM62059
Δείγματα εδάφους από τη ριζόσφαιρα συγκεκριμένων φυτών του ελλαδικού χώρου	
1	10,7 %
2	2,4 %
3	8,2 %
4	0,0 %
5	15,0 %
Δείγματα εδάφους από τη ριζόσφαιρα φυτών σε διάφορες περιοχές του ελλαδικού χώρου	
6	23,8 %
7	0,0 %
8	7,1 %
Δείγματα από περιοχές ή οικοσυστήματα του ελλαδικού χώρου με ιδιαίζουσες περιβαλλοντικές συνθήκες	
9	9,1 %
10	20,0 %
11	5,6 %
12	7,7 %

3.1.2.1. Ποσοτικοποίηση της *in vitro* ανταγωνιστικής δράσης των απομονωμένων στρεπτομυκήτων εναντίον του φυτοπαθογόνου μύκητα *Fusarium oxysporum* DSM62059

Όσα από τα εξεταζόμενα απομονωμένα στελέχη στρεπτομυκήτων αποδείχθηκαν ικανά να παρεμποδίζουν την ανάπτυξη του μύκητα *Fusarium oxysporum* DSM62059, χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της αντιμυκητιακής τους ικανότητας με μέτρο το πηλίκο του εμβαδού της ζώνης αναστολής της ανάπτυξης του μύκητα που σχηματίστηκε γύρω από την αποικία του εξεταζόμενου στρεπτομύκητα προς το εμβαδόν της αποικίας του στρεπτομύκητα ($\pi R_{ζ.αν.}^2 / \pi R_{στρ.}^2$) (§2.3.2.).

Γενικά, οι τιμές της αντιμυκητιακής ισχύος των εξεταζόμενων μικροοργανισμών έναντι του *Fusarium oxysporum* DSM62059 ήταν μικρότερες συγκριτικά με τις αντίστοιχες, που καταγράφηκαν έναντι του *Rhizoctonia solani* DSM843. Ωστόσο, και από αυτά τα αποτελέσματα ήταν εύκολα διακριτά τα στελέχη που αναστέλλουν έντονα την ανάπτυξη του εξεταζόμενου μύκητα και τα οποία θα εξεταστούν περαιτέρω ως υποψήφιοι παράγοντες βιοελέγχου του.

Τα αποτελέσματα αναφέρονται σε συνάρτηση με την περιοχή δειγματοληψίας και παρουσιάζονται αναλυτικά στους Πίνακες 3.15 - 3.24.

Πίνακας 3.15. Μέγεθος της ανταγωνιστικής δράσης των θετικών, ως προς την ικανότητά τους να αναστέλλουν τον μύκητα *Fusarium oxysporum* DSM62059 στρεπτομυκήτων, που απομονώθηκαν από τη ριζόσφαιρα του ενδημικού φυτού *Ebenus siphthorpii*

Στέλεχος	Μέτρο αντιμυκητιακής δράσης έναντι <i>F. oxysporum</i> DSM62059
REA 47/1	1,50
REA 17	2,25
REA 64	2,36

Μόνο 3 από τα στελέχη στρεπτομυκήτων, που απομονώθηκαν από τη ριζόσφαιρα του ενδημικού φυτού *Ebenus siphthorpii* είχαν τη δυνατότητα να αναστείλουν την ανάπτυξη του *Fusarium oxysporum* DSM62059. Η ένταση της αντιμυκητιακής τους ικανότητας ήταν μέτρια και η μέγιστη τιμή προέκυψε από το στέλεχος REA64 (2,36) (Πίνακας 3.15).

Από τα στελέχη που απομονώθηκαν από τη ριζόσφαιρα του φυτού *Ceratonia siliqua* μόνο ένα μπορούσε να παρεμποδίσει την ανάπτυξη του *Fusarium oxysporum* DSM62059, και μάλιστα με αρκετά χαμηλή απόδοση (Πίνακας 3.16.).

Πίνακας 3.16. Μέγεθος της ανταγωνιστικής δράσης των θετικών, ως προς την ικανότητά τους να αναστέλλουν τον μύκητα *Fusarium oxysporum* DSM62059 στρεπτομυκήτων, που απομονώθηκαν από τη ριζόσφαιρα του φυτού *Ceratonia siliqua*

Στέλεχος	Μέτρο αντιμυκητιακής δράσης έναντι <i>F. oxysporum</i> DSM62059
CA 12	1,96

Πίνακας 3.17. Μέγεθος της ανταγωνιστικής δράσης των θετικών, ως προς την ικανότητά τους να αναστέλλουν τον μύκητα *Fusarium oxysporum* DSM62059 στρεπτομυκήτων, που απομονώθηκαν από τη ριζόσφαιρα του φυτού *Olea europaea*

Στέλεχος	Μέτρο αντιμυκητιακής δράσης έναντι <i>F. oxysporum</i> DSM62059
OL 13	2,55
OL 18	1,47
OL 28	2,57
OL 48	1,34
OL 80	2,46
OL 7	2,13

Από τη ριζόσφαιρα του φυτού *Olea europaea* το 8,21 % των στρεπτομυκήτων, που απομονώθηκαν και εξετάστηκαν, εκδήλωσε ανταγωνιστική συμπεριφορά εναντίον του *Fusarium oxysporum* DSM62059. Κατά την ποσοτικοποίηση αυτής της συμπεριφοράς δεν προέκυψαν υψηλές αποδόσεις, καθώς η αντιμυκητιακή ισχύς περιορίστηκε μεταξύ των τιμών 2,57 (μέγιστη τιμή) και 1,34 (ελάχιστη τιμή) (Πίνακας 3.17).

Πίνακας 3.18. Μέγεθος της ανταγωνιστικής δράσης των θετικών, ως προς την ικανότητά τους να αναστέλλουν τον μύκητα *Fusarium oxysporum* DSM62059 στρεπτομυκήτων, που απομονώθηκαν από τη ριζόσφαιρα του φυτού *Pinus brutia* (ενδογενές φυτό της Κρήτης)

Στέλεχος	Μέτρο αντιμυκητιακής δράσης έναντι <i>F. oxysporum</i> DSM62059
GRE 1/1	1,56
GRE 24/1Λ	4,84
GRE 25	3,40

Τρεις στρεπτομύκητες, που απομονώθηκαν από τη ριζόσφαιρα του φυτού *Pinus brutia*, το οποίο ανήκει στα ενδημικά φυτά της Κρήτης, ανέστειλε την ικανότητα του φυτοπαθογόνου μύκητα *Fusarium oxysporum* DSM62059. Τα στελέχη GRE 24/1Λ και GRE 25 επέδειξαν πολύ ισχυρή αντιμυκητιακή δράση, καθώς η τιμή της υπολογίστηκε στο 4,84 και 3,40 αντίστοιχα, ενώ για το στέλεχος GRE 1/1 η τιμή ήταν 1,56, η οποία χαρακτηρίζεται ως χαμηλή (Πίνακας 3.18).

Πίνακας 3.19. Μέγεθος της ανταγωνιστικής δράσης των θετικών, ως προς την ικανότητά τους να αναστέλλουν τον μύκητα *Fusarium oxysporum* DSM62059 στρεπτομυκήτων, που απομονώθηκαν από τη ριζόσφαιρα αείφυλλων θάμνων αυτοφυών σε νησί του Αιγαίου

Στέλεχος	Μέτρο αντιμυκητιακής δράσης έναντι <i>F. oxysporum</i> DSM62059
AMO 43	1,83
AMO 44	1,47
AMO 58	2,69
AMO 61	1,49
AMO 64	1,89

Το 23,8 % των στρεπτομυκήτων που απομονώθηκαν από τη ριζόσφαιρα αείφυλλων θάμνων, αυτοφυών σε νησί του Ανατολικού Αιγαίου (Σάμος), δείχθηκε ότι είναι ικανό να αποτρέπει την εξάπλωση του μυκηλίου του *Fusarium oxysporum* DSM62059 σε στερεές καλλιέργειες. Το στέλεχος AMO58 επέδειξε την πιο ισχυρή αντιμυκητιακή ικανότητα, καθώς η τιμή αυτής υπολογίστηκε στο 2,69. Η αντίστοιχη τιμή για τους υπόλοιπους 4 στρεπτομύκητες, που εξετάστηκαν από το συγκεκριμένο ενδιαίτημα, δεν ξεπέρασε την τιμή 2 (Πίνακας 3.19).

Πίνακας 3.20. Μέγεθος της ανταγωνιστικής δράσης των θετικών, ως προς την ικανότητά τους να αναστέλλουν τον μύκητα *Fusarium oxysporum* DSM62059 στρεπτομυκήτων, που απομονώθηκαν από τη ριζόσφαιρα κωνοφόρων δένδρων

Στέλεχος	Μέτρο αντιμυκητιακής δράσης έναντι <i>F. oxysporum</i> DSM62059
CR 13	1,56
CR 14	2,91
CR 46	1,60
CR 75	1,90
CR 76	2,77
CR 83	1,59

Στρεπτομύκητες σε ποσοστό 7,14 % επί του συνόλου εκείνων που απομονώθηκαν από τη ριζόσφαιρα κωνοφόρων δένδρων, εξέφρασε αντιμυκητιακή δράση έναντι του *Fusarium oxysporum* DSM62059. Ο ισχυρότερος ανταγωνιστής του μύκητα ήταν το στέλεχος με την κωδική ονομασία CR14 (τιμή αντιμυκητιακής ισχύος = 2,91), ενώ δεύτερο στην κλίμακα κατάταξής τους, σύμφωνα με την αντιμυκητιακή τους ισχύ, ήταν το στέλεχος CR76 (τιμή αντιμυκητιακής ισχύος = 2,77) (Πίνακας 3.20).

Τα στελέχη THS 10 και THS 19, που προέρχονται από δείγματα νερού και ιζήματος των θερμοπηγών της περιοχής των Θερμοπυλών, ανέστειλλαν την ανάπτυξη του εξεταζόμενου φυτοπαθογόνου μύκητα. Η αντιμυκητιακή ενεργότητα και των δύο

στελεχών ήταν χαμηλή και ίση με 1,63 για τον στρεπτομύκητα THS10 και μόλις 1,28 για τον στρεπτομύκητα THS19 (Πίνακας 3.21).

Πίνακας 3.21. Μέγεθος της ανταγωνιστικής δράσης των θετικών, ως προς την ικανότητά τους να αναστέλλουν τον μύκητα *Fusarium oxysporum* DSM62059 στρεπτομυκήτων, που απομονώθηκαν από δείγμα νερού και ιζήματος από τις θερμοπηγές των Θερμοπυλών

Στέλεχος	Μέτρο αντιμυκητιακής δράσης έναντι <i>F. oxysporum</i> DSM62059
THS 10	1,63
THS 19	1,28

Πίνακας 3.22. Μέγεθος της ανταγωνιστικής δράσης των θετικών, ως προς την ικανότητά τους να αναστέλλουν τον μύκητα *Fusarium oxysporum* DSM62059 στρεπτομυκήτων, που απομονώθηκαν από δείγμα θαλάσσιου ηφαιστειακού ιζήματος

Στέλεχος	Μέτρο αντιμυκητιακής δράσης έναντι <i>F. oxysporum</i> DSM62059
VOL 1	1,30

Σχετικά με τους στρεπτομύκητες, που απομονώθηκαν από θαλάσσιο ιζήμα του ηφαιστείου της Σαντορίνης, μόνο ένας εξ αυτών εκδήλωσε αντιμυκητιακή δράση έναντι του *Fusarium oxysporum* DSM62059, η οποία χαρακτηρίζεται ισχνή και ίση με 1,3 (Πίνακας 3.22).

Πίνακας 3.23. Μέγεθος της ανταγωνιστικής δράσης των θετικών ως προς την ικανότητά τους να αναστέλλουν τον μύκητα *Fusarium oxysporum* DSM62059 στρεπτομυκήτων, που απομονώθηκαν από εδαφικό δείγμα από διαταραγμένη καλλιεργήσιμη έκταση

Στέλεχος	Μέτρο αντιμυκητιακής δράσης έναντι <i>F. oxysporum</i> DSM62059
S 8	1,41
S 85	1,67
M 5	2,25
M 7	2,04
M 18	1,77
M 26	1,67
M 33	2,25
M 42	1,60
CAG 23	1,25
CAG 25	1,25

Το ποσοστό των στελεχών, που είχαν τη δυνατότητα να αποτρέψουν την εξάπλωση του μυκηλίου του *Fusarium oxysporum* DSM62059 σε πειράματα *in vitro* ανταγωνισμού, άγγιξε μόλις το 5,6 % του συνόλου των στρεπτομυκήτων που απομονώθηκαν από δείγμα εδάφους που προέρχεται από διαταραγμένη

καλλιεργήσιμη έκταση του Μαραθώνα Αττικής. Από αυτούς, τα στελέχη με την κωδική ονομασία M5 και M33 εκδήλωσαν ισχυρή αντιμυκητιακή ικανότητα. Η ποσοτικοποίηση της ικανότητάς τους αυτής έδειξε τιμή ίση με 2,25 και για τα δύο στελέχη, ενώ για ένα τρίτο στέλεχος, η τιμή ήταν μεγαλύτερη του 2 (M7: 2,04). Στους υπόλοιπους 7 στρεπτομύκητες του συγκεκριμένου ενδιαιτήματος η ένταση της αντιμυκητιακής ικανότητας περιορίστηκε σε τιμές αρκετά χαμηλότερες του 2 (Πίνακας 3.23).

Πίνακας 3.24. Μέγεθος της ανταγωνιστικής δράσης των θετικών, ως προς την ικανότητά τους να αναστέλλουν τον μύκητα *Fusarium oxysporum* DSM62059 στρεπτομυκήτων, που απομονώθηκαν από εδαφικό δείγμα από προστατευόμενη φυσική δασική περιοχή

Στέλεχος	Μέτρο αντιμυκητιακής δράσης έναντι <i>F. oxysporum</i> DSM62059
K 14	1,34
K 17	1,39

Τέλος, εξετάζοντας το εδαφικό φορτίο του εδαφικού δείγματος από προστατευόμενη, φυσική δασική περιοχή, στην Καισαριανή Αττικής, προέκυψε ότι από το σύνολο των 27 στρεπτομυκήτων, που εποικούσαν αυτό το έδαφος, μόνο οι δύο έδειξαν την ικανότητα να αναστέλλουν *in vitro* την ανάπτυξη του φυτοπαθογόνου μύκητα *Fusarium oxysporum* DSM62059. Από τα αποτελέσματα της ποσοτικοποίησης αυτής τους της ικανότητας προέκυψε ότι η τελευταία έχει πολύ μικρή ισχύ, αφού, όπως φαίνεται και στον Πίνακα 3.24, της αποδόθηκε τιμή μικρότερη από 1,5.

Συγκεντρωτικά, τα αποτελέσματα του προσδιορισμού της αντιμυκητιακής δράσης παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.25, όπου εμφανίζονται κατά σειρά η μεγαλύτερη τιμή, η μικρότερη τιμή και ο μέσος όρος του μεγέθους της αντιμυκητιακής ικανότητας *in vitro* όσων στρεπτομυκήτων την επέδειξαν σε κάθε περιοχή δειγματοληψίας. Έτσι, παρέχεται η δυνατότητα σύγκρισης των περιοχών δειγματοληψίας σε σχέση με την ένταση της ανταγωνιστικής δράσης της μικροχλωρίδας τους ενάντια στον φυτοπαθογόνο μύκητα *Fusarium oxysporum* DSM62059.

Από τα στοιχεία του Πίνακα 3.25, προκύπτει ότι η ισχυρότερη ικανότητα αναστολής της ανάπτυξης του φυτοπαθογόνου μύκητα *Fusarium oxysporum* DSM62059 μετρήθηκε από στρεπτομύκητες, που απομονώθηκαν από το εδαφικό δείγμα από διαταραγμένη καλλιεργήσιμη έκταση. Επίσης, συνολικά εντονότερη αντιμυκητιακή συμπεριφορά επέδειξαν οι στρεπτομύκητες, που απομονώθηκαν:

α) από το εδαφικό δείγμα από προστατευόμενη φυσική δασική περιοχή, β) από το δείγμα νερού και ιζήματος από τις θερμοπηγές των Θερμοπυλών, γ) από το δείγμα της ριζόσφαιρας του φυτού *Olea europaea* και δ) από το δείγμα της ριζόσφαιρας κωνοφόρων δένδρων, αφού σε αυτούς προσδιορίστηκαν κατά μέσο οι μεγαλύτερες τιμές στην ανταγωνιστική δράση τους σε σχέση με τον μύκητα.

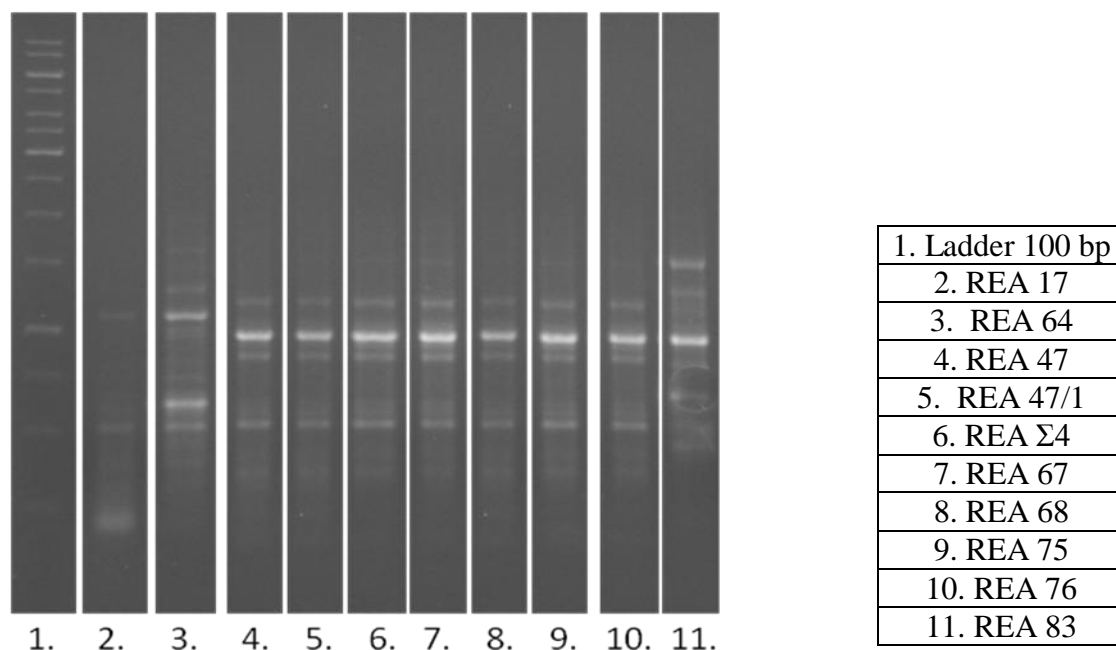
Πίνακας 3.25. Μέγιστη και ελάχιστη τιμή αλλά και μέσος όρος τιμής της ανταγωνιστικής δράσης των θετικών ως προς την ικανότητά τους να αναστέλλουν τον μύκητα *Fusarium oxysporum* DSM62059 στρεπτομυκήτων, που απομονώθηκαν τις εξεταζόμενες περιοχές δειγματοληψίας

Περιοχές Δειγματοληψίας	Μέγεθος ανασταλτικής δράσης των απομονωμένων στρεπτομυκήτων έναντι του <i>Fusarium oxysporum</i> ($\pi R_{ζ.αν.}^2 / \pi R_{στρ.}^2$) {υψηλότερος – χαμηλότερος – μέσος όρος}
Δείγματα εδάφους από τη ριζόσφαιρα συγκεκριμένων φυτών του ελλαδικού χώρου	
1	2,40 – 1,30 – 1,50
2	1,96 – 1,96 – 1,96
3	2,57 – 1,34 – 2,13
5	4,84 - 1,56 – 3,27
Δείγματα εδάφους από τη ριζόσφαιρα φυτών σε διάφορες περιοχές του ελλαδικού χώρου	
6	2,69 – 1,47 – 1,87
8	2,91 – 1,56 – 2,10
Δείγματα από περιοχές ή οικοσυστήματα του ελλαδικού χώρου με ιδιαίζουσες περιβαλλοντικές συνθήκες	
9	1,63 – 1,28 – 1,46
10	1,30 - 1,30 - 1,30
11	2,25 – 1,25 – 1,72
12	1,34 – 1,39 – 1,37

3.2. ΟΜΑΔΟΠΟΙΗΣΗ ΣΕ ΕΠΙΠΕΔΟ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ ΤΩΝ ΣΤΡΕΠΤΟΜΥΚΗΤΩΝ ΠΟΥ ΕΚΔΗΛΩΣΑΝ ΑΝΤΙΜΥΚΗΤΙΑΚΗ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ

Τα αποτυπώματα BOX PCR καταγράφηκαν για τα στελέχη των στρεπτομυκήτων, που είχαν τη δυνατότητα αναστολής της ανάπτυξης των δύο εξεταζόμενων φυτοπαθογόνων μυκήτων (Εικόνες 3.1 – 3.20).

3.2.1. Ομαδοποίηση σε επίπεδο στελέχους των στρεπτομυκήτων με ικανότητα αναστολής της ανάπτυξης του φυτοπαθογόνου μύκητα *Rhizoctonia solani* DSM843 ανά περιοχή δειγματοληψίας

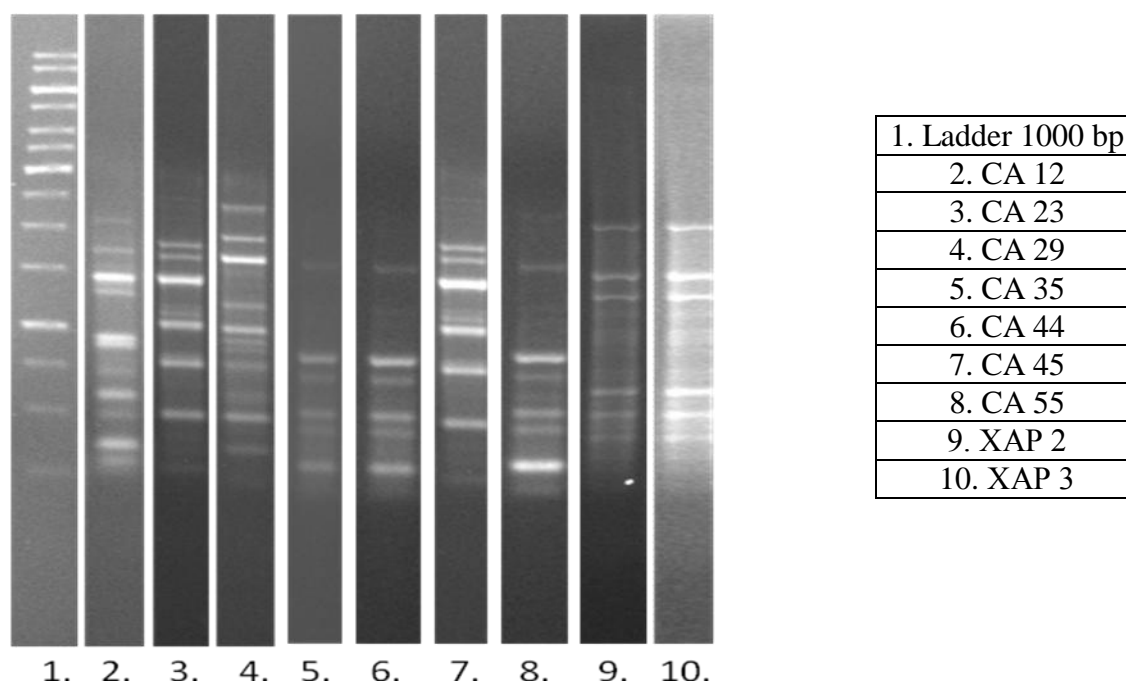


Εικόνα 3.1. Πρότυπο ζωνών BOX PCR στρεπτομυκήτων με ικανότητα αναστολής του *Rhizoctonia solani* DSM843, απομονωμένων από τη ριζόσφαιρα του ενδημικού φυτού *Ebenus siphthorpii*

Όπως προκύπτει από την ανάλυση του προτύπου ζωνών BOX καθενός από τους εξεταζόμενους στρεπτομύκητες, που απομονώθηκαν από τη ριζόσφαιρα του ενδημικού φυτού *Ebenus siphthorpii* και οι οποίοι αναστέλλουν την ανάπτυξη του μύκητα *Rhizoctonia solani* DSM843, τα στελέχη REA47, REA 47/1, REA Σ4, REA 67, REA 68, REA 75 και REA 76 παρουσίασαν το ίδιο προφίλ και ομαδοποιήθηκαν στο ίδιο στέλεχος (Εικόνα 3.1). Τα στελέχη REA17 και REA64 απέδωσαν διαφορετικό πρότυπο ζωνών τόσο μεταξύ τους όσο και με τους υπόλοιπους στρεπτομύκητες. Σημειώνεται ότι οι δύο αυτοί μικροοργανισμοί έδειξαν και την εντονότερη αντιμυκητιακή δράση σε σχέση με τους υπόλοιπους που εξετάστηκαν από την ίδια περιοχή (Εικόνα 3.1).

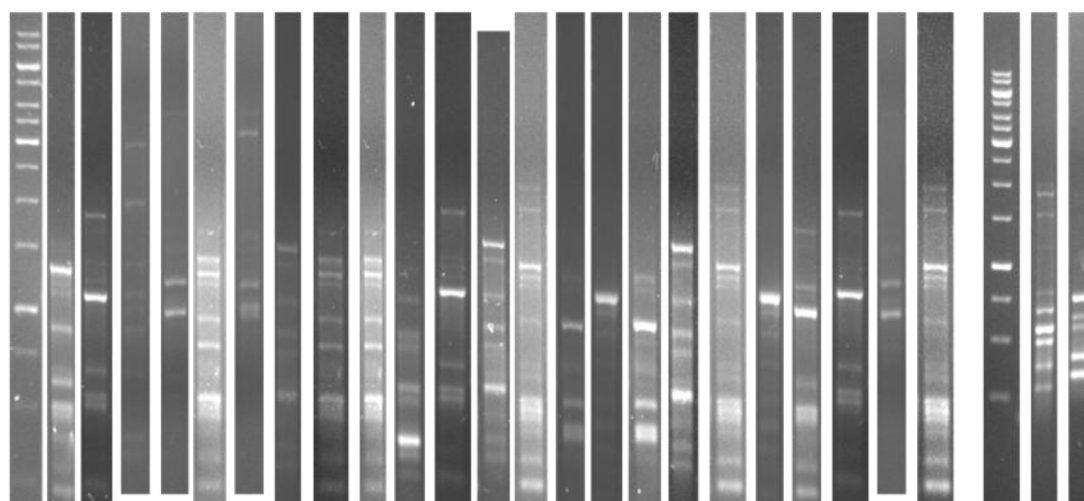
Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της αντίδρασης BOX PCR, οι στρεπτομύκητες που απομονώθηκαν από τη ριζόσφαιρα του φυτού *Ceratonia siliqua* και είχαν τη δυνατότητα αναστολής της ανάπτυξης του μυκηλίου του *Rhizoctonia solani* DSM843 *in vitro* εμφάνισαν συνολικά 5 διαφορετικά πρότυπα ζωνών, με αποτέλεσμα να ομαδοποιούνται σε ισάριθμες ομάδες. Οι στρεπτομύκητες CA12 και CA29 ήταν

μοναδικά και διαφορετικά στελέχη. Οι στρεπτομύκητες CA23 και CA45 συγκροτούν μια τρίτη ομάδα, οι CA35, CA44 και CA55 είναι ίδιοι, συγκρινόμενοι σε επίπεδο στελέχους, ενώ οι XAP2 και XAP3 ανήκουν επίσης στην ίδια ομάδα (Εικόνα 3.2).



Εικόνα 3.2. Πρότυπο ζωνών BOX RCR στρεπτομυκήτων με ικανότητα αναστολής του *Rhizoctonia solani* DSM843, απομονωμένων από τη ριζόσφαιρα του ενδημικού φυτού *Ceratonia siliqua*

Η ανάλυση των προτύπων ζωνών, που προέκυψαν από την αντίδραση BOX PCR των 25 στρεπτομυκήτων που απομονώθηκαν από τη ριζόσφαιρα του φυτού *Olea europaea* και ήταν ικανοί να παρεμποδίζουν την ανάπτυξη του εξεταζόμενου φυτοπαθογόνου μύκητα, οδήγησε στην ομαδοποίησή τους σε επίπεδο στελέχους σε 13 ομάδες. Οι στρεπτομύκητες OL 3, OL 7, OL 44, OL 75, OL 20, OL 12 και OL 31 ανήκουν ο καθένας σε μονομελή ομάδα. Διμελής ομάδες συγκρότησαν ανά ζεύγη οι μικροοργανισμοί OL 13 και OL 80, OL 56 και OL 67, καθώς και οι OL 54 και OL 58. Όμοιο ραβδωτό κώδικα εμφάνισαν και οι στρεπτομύκητες OL 6, OL 48 και OL 78 και οι OL 30, OL 63 και OL 50, οι οποίοι ομαδοποιήθηκαν σε δύο τριμελείς ομάδες αντίστοιχα (Εικόνα 3.3). Η μεγαλύτερη ομάδα στρεπτομυκήτων, που από την ανάλυση του αποτελέσματος της αντίδρασης BOX PCR φαίνεται να ανήκουν στο ίδιο στέλεχος, περιλαμβάνει τα στελέχη με την κωδική ονομασία OL 17, OL 37, OL 41, OL 66, OL 52 και ΕΛΙΑ 8 (Εικόνα 3.3).

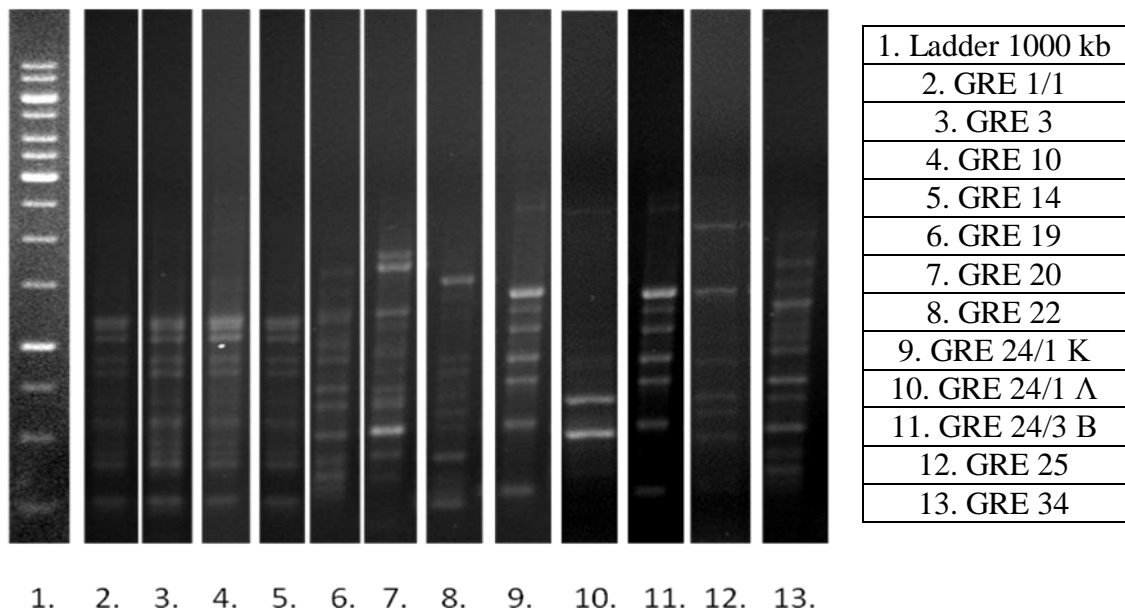


1. 2. 3. 4. 5. 6. 7. 8. 9. 10. 11. 12. 13. 14. 15. 16. 17. 18. 19. 20. 21. 22. 23. 24. 25. 26. 27.

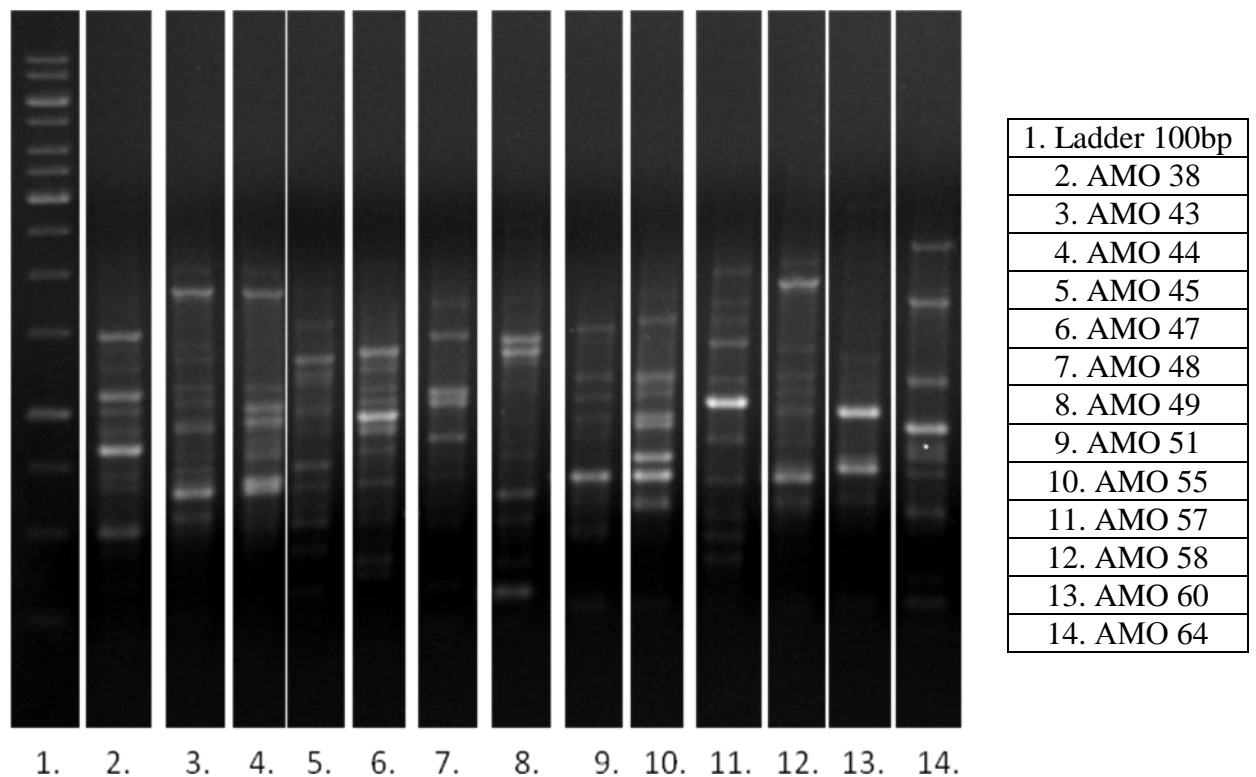
Εικόνα 3.3. Πρότυπο ζωνών BOX RCR στρεπτομυκήτων με ικανότητα αναστολής του *Rhizoctonia solani* DSM843, απομονωμένων από τη ριζόσφαιρα του φυτού *Olea europea*

| | | | | |
|------------------|-----------|-----------|------------|------------|
| 1. Ladder 1000bp | 7. OL 20 | 13. OL 50 | 19. OL 66 | 25. Ladder |
| 2. OL 3 | 8. OL 30 | 14. OL 52 | 20. OL 67 | 26. OL 12 |
| 3. OL 6 | 9. OL 37 | 15. OL 54 | 21. OL 75 | 27. OL 31 |
| 4. OL 7 | 10. OL 41 | 16. OL 56 | 22. OL 78 | |
| 5. OL 13 | 11. OL 44 | 17. OL 58 | 23. OL 80 | |
| 6. OL 17 | 12. OL 48 | 18. OL 63 | 24. ELIA 8 | |

Οι στρεπτομυκήτες που απομονώθηκαν από τη ριζόσφαιρα του ενδογενούς φυτού της Κρήτης, που ονομάζεται *Pinus brutia*, και οι οποίοι κρίθηκαν ικανοί να δρουν ανταγωνιστικά έναντι του *Rhizoctonia solani* DSM843 σε *in vivo* πειράματα ανταγωνισμού, ομαδοποιήθηκαν σε επίπεδο στελέχους σε 7 ομάδες. Από αυτές οι 4 είχαν μόνο έναν αντιπρόσωπο, σε καθεμιά από τις οποίες ανήκουν οι στρεπτομυκήτες GRE 20, GRE 22, GRE 24/1 Α και GRE 25 αντίστοιχα. Τα υπόλοιπα στελέχη ομαδοποιήθηκαν σε μεγαλύτερες ομάδες ως εξής: Οι GRE 1/1, GRE 3, GRE 10 και GRE 14 ανήκουν στην ίδια ομάδα, οι GRE 19 και GRE 34 συγκροτούν μια διμελή ομάδα, όπως και οι GRE 24/1 Κ και GRE 24/3 Β (Εικόνα 3.4).

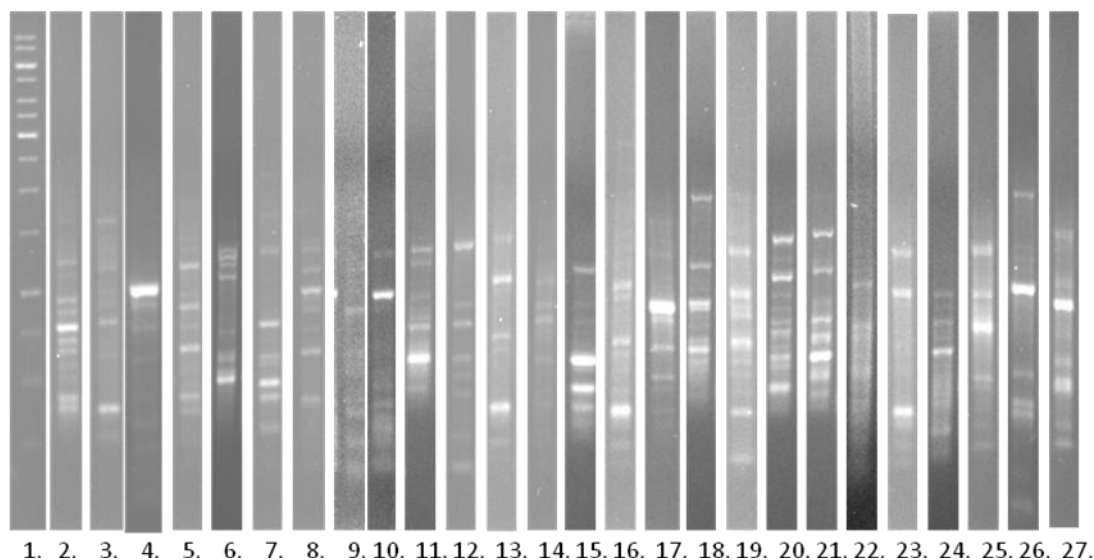


Εικόνα 3.4. Πρότυπο ζωνών BOX RCR στρεπτομυκήτων με ικανότητα αναστολής του *Rhizoctonia solani* DSM843, απομονωμένων από τη ριζόσφαιρα του φυτού *Pinus brutia* (ενδογενές φυτό της Κρήτης)



Εικόνα 3.5. Πρότυπο ζωνών BOX RCR στρεπτομυκήτων με ικανότητα αναστολής του *Rhizoctonia solani* DSM843, απομονωμένων από τη ριζόσφαιρα αείφυλλων θάμνων αυτοφυών σε νησί του Αιγαίου

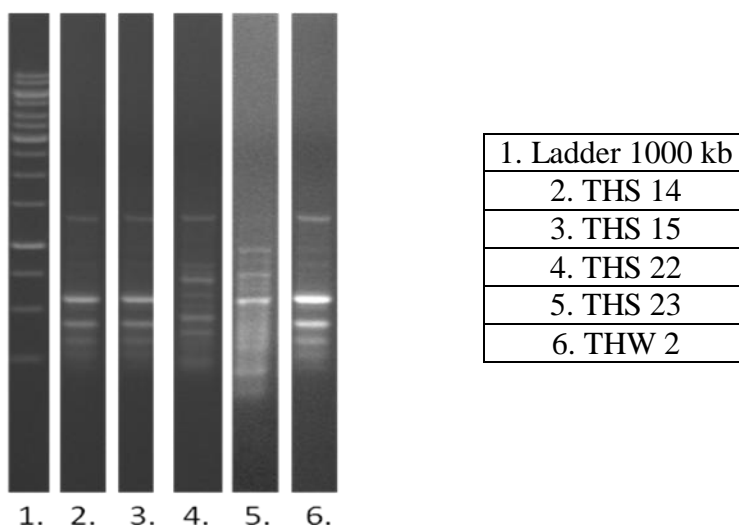
Με εξαίρεση δύο στρεπτομύκητες, οι οποίοι έδειξαν ίδιο πρότυπο ζωνών μετά την ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης του προϊόντος τους μετά από την αντίδραση BOX PCR, και άρα ομαδοποιήθηκαν μαζί (AMO 43 και AMO 58), οι υπόλοιποι 11 μικροοργανισμοί, που απομονώθηκαν από τη ριζόσφαιρα αείφυλλων θάμνων αυτοφυών σε νησί του Αιγαίου και επέδειξαν αντιμυκητιακή δράση έναντι του *Rhizoctonia solani* DSM843, ήταν οι μοναδικοί αντιπρόσωποι ισάριθμων ομάδων, δηλαδή ήταν διαφορετικά στελέχη (Εικόνα 3.5).



| | | |
|------------------|-----------|-----------|
| 1. Ladder 1000bp | 10. CR 65 | 19. CR 81 |
| 2. CR 13 | 11. CR 68 | 20. CR 82 |
| 3. CR 14 | 12. CR 69 | 21. CR 83 |
| 4. CR 28 | 13. CR 73 | 22. CR 84 |
| 5. CR 38 | 14. CR 74 | 23. CR 85 |
| 6. CR 47 | 15. CR 76 | 24. CR 86 |
| 7. CR 53 | 16. CR 77 | 25. CR 92 |
| 8. CR 59 | 17. CR 78 | 26. CR 94 |
| 9. CR 63 | 18. CR 80 | 27. CR 97 |

Εικόνα 3.6. Πρότυπο ζωνών BOX PCR στρεπτομυκήτων με ικανότητα αναστολής του *Rhizoctonia solani* DSM843, απομονωμένων από τη ριζόσφαιρα κωνοφόρων δέντρων

Αν και οι στρεπτομύκητες, που απομονώθηκαν από τη ριζόσφαιρα κωνοφόρων δένδρων και είχαν την ικανότητα να αναστέλλουν τον εξεταζόμενο φυτοπαθογόνο μύκητα ήταν πολλοί, όλοι είχαν μοναδικό και ιδιαίτερο ραβδωτό κώδικα, με βάση την αντίδραση BOX PCR τους. Επομένως δεν ήταν δυνατό να ομαδοποιηθούν και άρα αποτελούν διαφορετικά στελέχη. (Εικόνα 3.6).

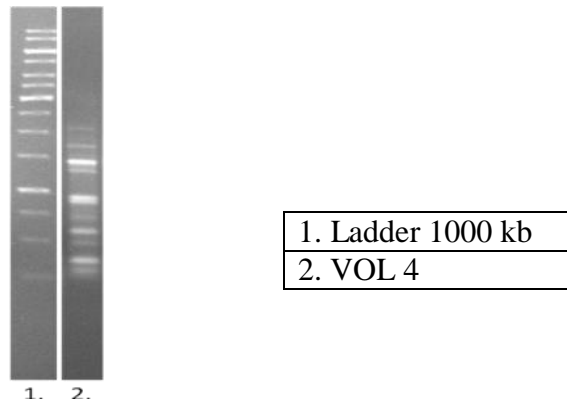


Εικόνα 3.7. Πρότυπο ζωνών BOX RCR στρεπτομυκήτων με ικανότητα αναστολής του *Rhizoctonia solani* DSM843, απομονωμένων από δείγμα νερού και ιζήματος από τις θερμοπηγές των Θερμοπυλών

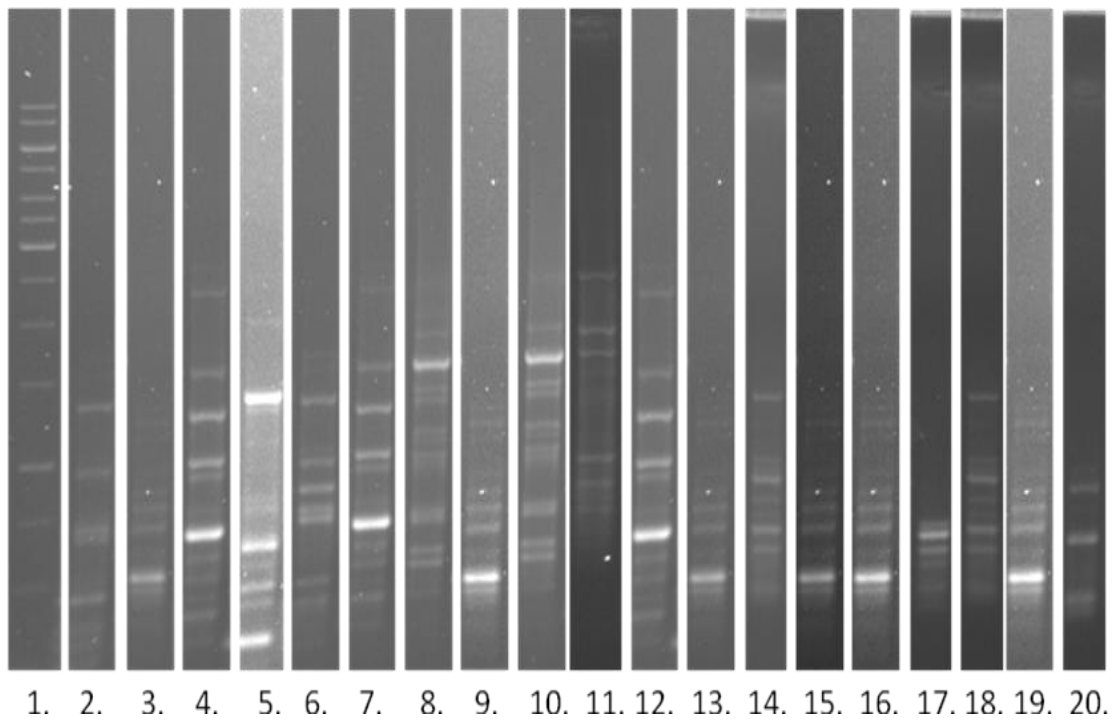
Οι θετικοί στρεπτομύκητες ως προς την ικανότητά τους να ανταγωνίζονται *in vitro* τον φυτοπαθογόνο μύκητα *Rhizoctonia solani* DSM843, οι οποίοι απομονώθηκαν από νερό και ιζήμα των θερμοπηγών των Θερμοπυλών, βάσει του προτύπου ζωνών που προκύπτει από την αντίδραση BOX PCR ομαδοποιούνται σε 4 ομάδες εκ των οποίων οι 3 έχουν μόνο έναν αντιπρόσωπο και η τέταρτη μόλις 2 αντιπροσώπους. Αναλυτικότερα, οι μονομελείς ομάδες που προέκυψαν περιλάμβαναν τους στρεπτομύκητες THS 22, THS 23 και THW 2 αντίστοιχα, ενώ η τέταρτη ομάδα περιλαμβάνει τους THS 14 και THS 15 (Εικόνα 3.7).

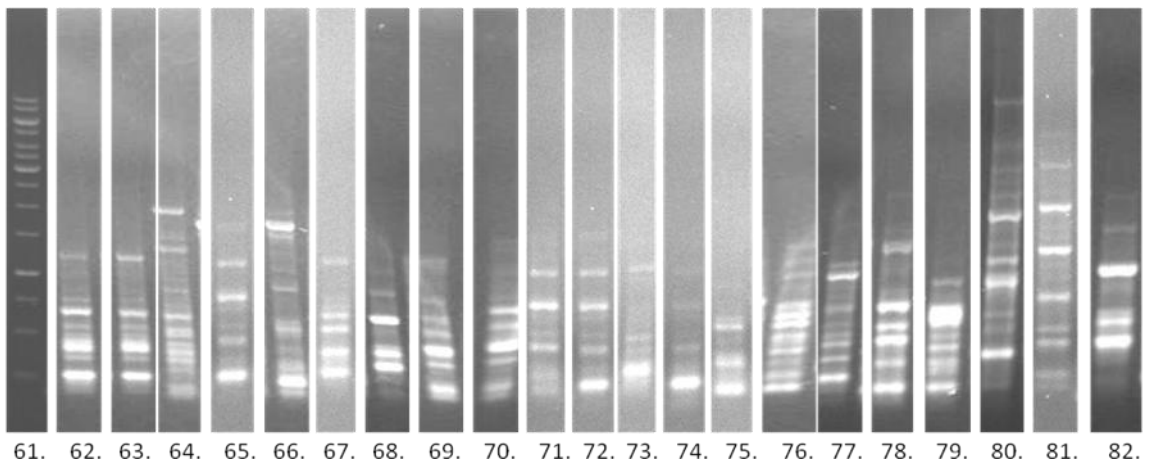
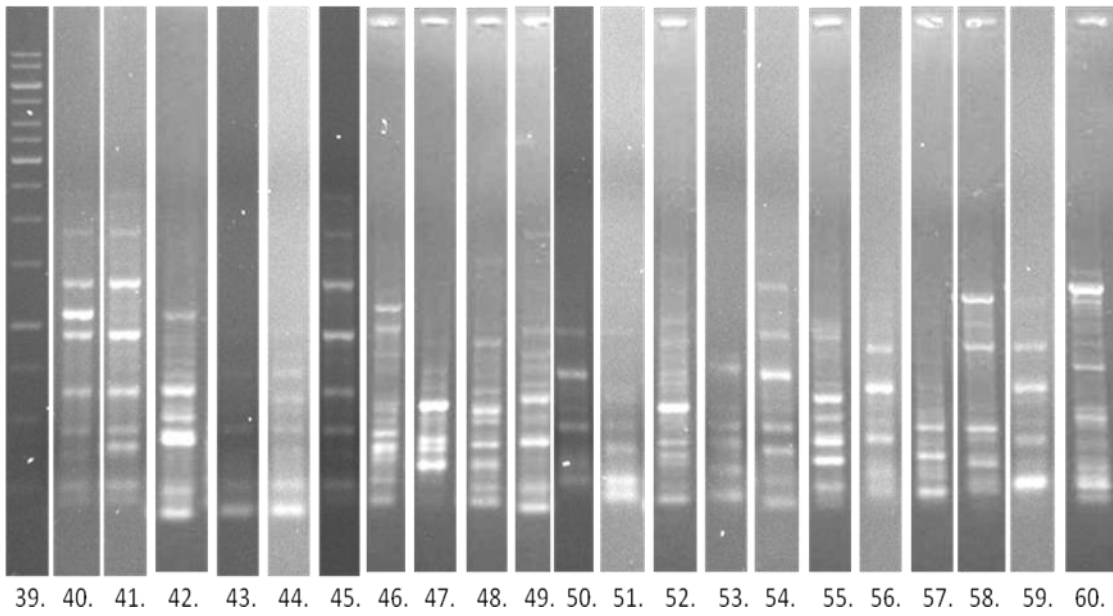
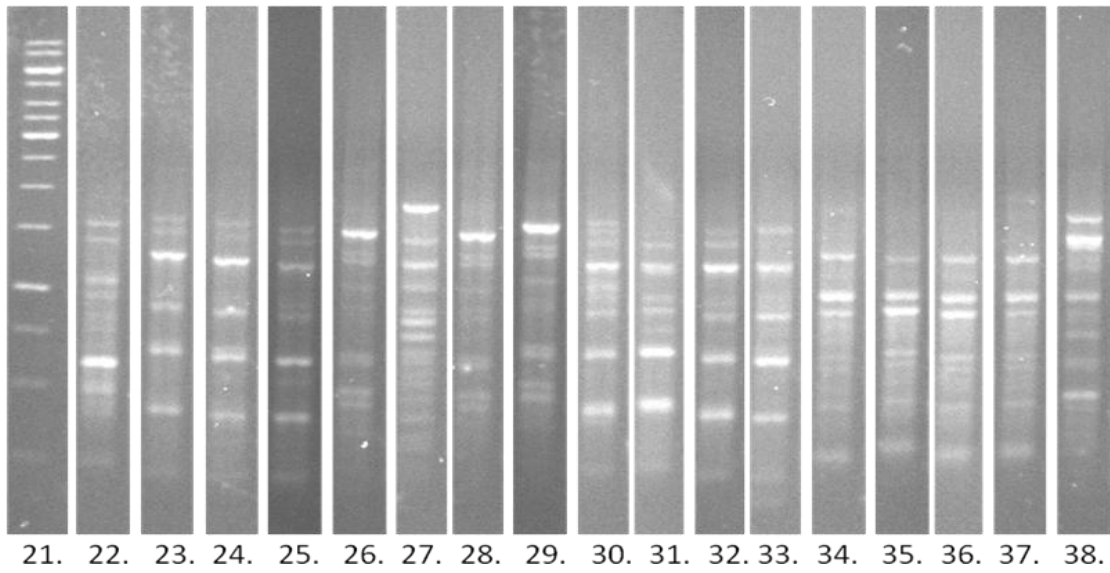
Οι στρεπτομύκητες, που είχαν την ικανότητα να αναστέλλουν την ανάπτυξη του φυτοπαθογόνου μύκητα *Rhizoctonia solani* DSM843 και οι οποίοι προέρχονταν από εδαφικό δείγμα από διαταραγμένη καλλιεργήσιμη έκταση της περιοχής του Μαραθώνα Αττικής εμφάνισαν μεγάλη ποικιλομορφία προτύπων ζωνών από την αντίδραση BOX PCR. Τα πρότυπα ζωνών των περισσότερων στρεπτομυκήτων, που εξετάστηκαν ήταν μοναδικά και από το σύνολο των σχεδόν εκατό μικροοργανισμών μόνο 13 ολιγομελείς ομάδες καθορίστηκαν λόγω κοινού προτύπου ζωνών. Η πιο μεγάλη ομάδα περιλάμβανε τα στελέχη CAG 2/1, CAG 2/2, CAG 4/1, CAG 13/2, CAG 17Rif, CAG 19, CAG 21 και M 107 ενώ μικρότερες ομάδες συγκροτούσαν οι S 14/1, S 24/1, S 45 και CAG 1, οι S 64, S 65, S 47, S 152/2 και S 27/2, οι M 104 και M 105, οι S 63 και S 85, οι CAG 23, CAG 25, CAG 25thior και CAG 25/2, οι M 59, M

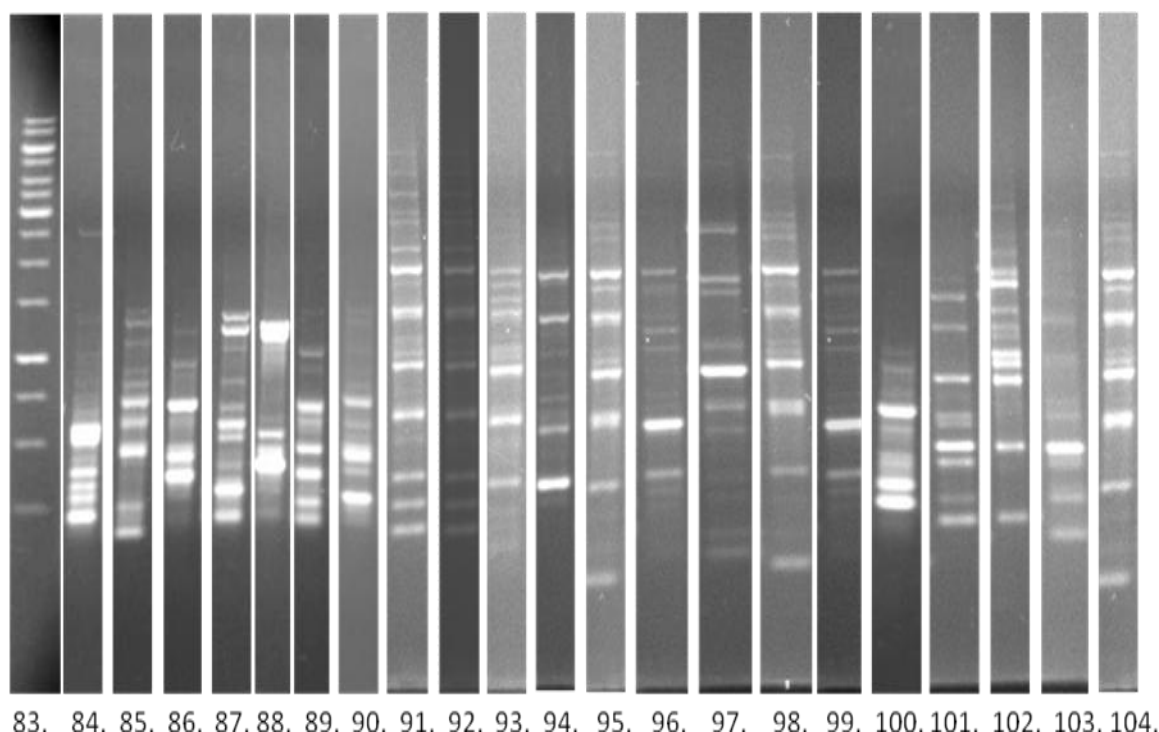
60 και M 103, οι M 110, M 114 και M 127, οι M 111 και M 115, οι M 85, M 90 και M 94 και οι M 96 και M 121 (Εικόνα 3.9).



Εικόνα 3.8. Πρότυπο ζωνών BOX RCR στρεπτομύκητα με ικανότητα αναστολής του *Rhizoctonia solani* DSM843, απομονωμένου από δείγμα θαλάσσιου ηφαιστειακού ιζήματος

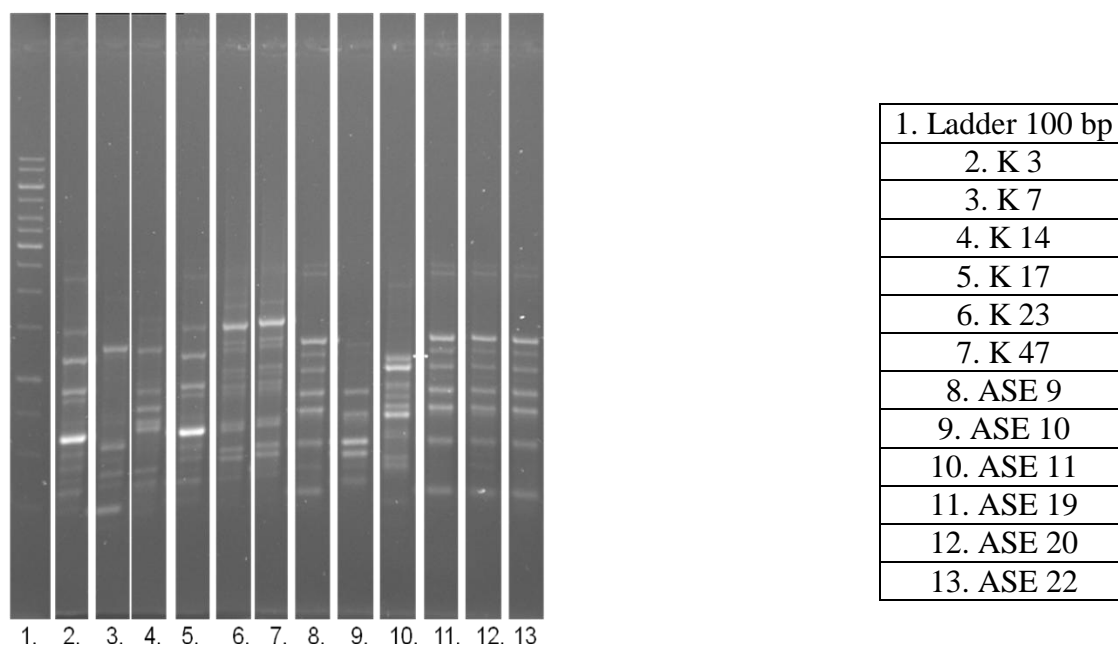






| | | | | |
|------------------|-------------------|----------|-----------|------------|
| 1. Ladder 100 bp | 22. Ladder 100bp | 43. M 10 | 64. M 60 | 85. M 95 |
| 2. S 2 | 23. CAG 1 | 44. M 16 | 65. M 61 | 86. M 96 |
| 3. S 8 | 24. CAG 2/1 | 45. M 17 | 66. M 62 | 87. M 97 |
| 4. S 14/1 | 25. CAG 2/2 | 46. M 18 | 67. M 63 | 88. M 98 |
| 5. S 16 | 26. CAG 4/1 | 47. M 23 | 68. M 64 | 89. M 100 |
| 6. S 17 | 27. CAG 5thior | 48. M 25 | 69. M 65 | 90. M 103 |
| 7. S 24/1 | 28. CAG 9/2 | 49. M 26 | 70. M 67 | 91. M 104 |
| 8. S 24/2 | 29. CAG 10 | 50. M 27 | 71. M 68 | 92. M 105 |
| 9. S 27/2 | 30. CAG 13/1 | 51. M 33 | 72. M 71 | 93. M 107 |
| 10. S 35 | 31. CAG 13/2 | 52. M 39 | 73. M 74 | 94. M 108 |
| 11. S 38 | 32. CAG 17Rif | 53. M 42 | 74. M 75 | 95. M 110 |
| 12. S 45 | 33. CAG 19 | 54. M 44 | 75. M 81 | 96. M 111 |
| 13. S 47 | 34. CAG 21 | 55. M 46 | 76. M 84 | 97. M 112 |
| 14. S 63 | 35. CAG 23 | 56. M 47 | 77. M 85 | 98. M 114 |
| 15. S 64 | 36. CAG 25 | 57. M 48 | 78. M 86 | 99. M 115 |
| 16. S 65 | 37. CAG 25thior | 58. M 49 | 79. M 88 | 100. M 121 |
| 17. S 81 | 38. CAG 25/2 | 59. M 51 | 80. M 90 | 101. M 123 |
| 18. S 85 | 39. CAG 26 | 60. M 53 | 81. M 43γ | 102. M 124 |
| 19. S 152/2 | 40. Ladder 100 bp | 61. M 57 | 82. M 91 | 103. M 126 |
| 20. S 165 | 41. M 5 | 62. M 58 | 83. M 92 | 104. M 127 |
| 21. S MS | 42. M 7 | 63. M 59 | 84. M 94 | |

Εικόνα 3.9. Πρότυπο ζωνών BOX RCR στρεπτομυκίτων με ικανότητα αναστολής του *Rhizoctonia solani* DSM843, απομονωμένων από εδαφικό δείγμα από διαταραγμένη καλλιεργήσιμη έκταση της περιοχής του Μαραθώνα Αττικής



Εικόνα 3.10. Πρότυπο ζωνών BOX RCR στρεπτομυκήτων με ικανότητα αναστολής του *Rhizoctonia solani* DSM843, απομονωμένων από εδαφικό δείγμα από προστατευόμενη φυσική δασική περιοχή

Οι θετικοί στρεπτομύκητες ως προς την ικανότητά τους να ανταγωνίζονται *in vitro* τον φυτοπαθογόνο μύκητα *Rhizoctonia solani* DSM843, οι οποίοι απομονώθηκαν από εδαφικό δείγμα από προστατευόμενη δασική περιοχή, βάσει του προτύπου ζωνών που προκύπτει από την αντίδραση BOX PCR προέκυψε ότι δίνουν 8 διαφορετικά ραβδωτά πρότυπα. Τα έξι από αυτά ανήκαν σε έξι διαφορετικά στελέχη, το έβδομο το μοιράζονταν τα στελέχη με την κωδική ονομασία ASE 9, ASE 19, ASE 20 και ASE 22 ενώ το όγδοο το επέδειξαν τα στελέχη K 23 και K 47 (Εικόνα 3.10).

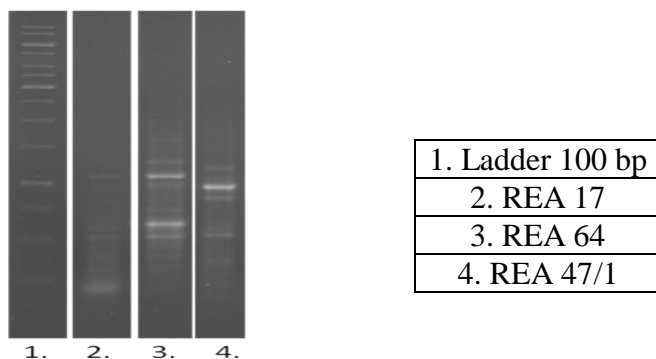
3.2.2. Ομαδοποίηση σε επίπεδο στελέχους των στρεπτομυκήτων με ικανότητα αναστολής της ανάπτυξης του φυτοπαθογόνου μύκητα *Fusarium oxysporum* DSM62059 ανά περιοχή δειγματοληψίας

Όπως προκύπτει από την ανάλυση του προτύπου ζωνών BOX PCR από τους στρεπτομύκητες που απομονώθηκαν από τη ριζόσφαιρα του ενδημικού φυτού *Ebenus siphthorpii* και οι οποίοι αναστέλλουν την ανάπτυξη του μύκητα *Fusarium oxysporum* DSM62059, τα στελέχη REA 17, REA 47/1 και REA 64 παρουσιάζουν διαφορετικό προφίλ και ανήκουν σε ισάριθμες ομάδες σε επίπεδο στελέχους (Εικόνα 3.11).

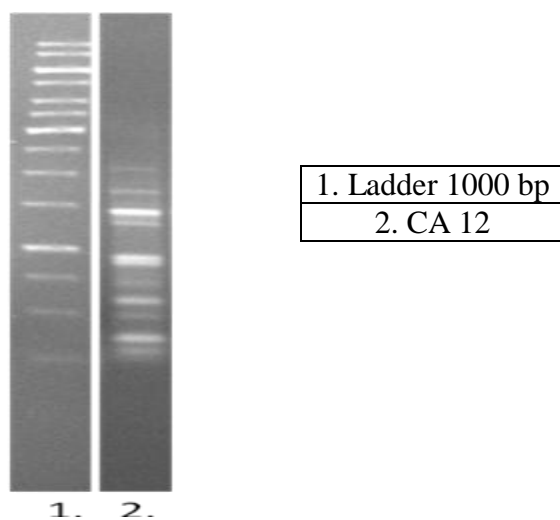
Μόνο ο στρεπτομύκητας με την κωδική ονομασία CA12 που απομονώθηκε από τη ριζόσφαιρα του ενδημικού φυτού *Ceratonia siliqua* ήταν σε θέση να αναστείλει την ανάπτυξη του μύκητα *Fusarium oxysporum* DSM62059. Το πρότυπο ζωνών που προέκυψε από την αντίδραση BOX PCR παρουσιάζεται στην Εικόνα 3.12.

Αναλύοντας τα πρότυπα ζωνών BOX PCR των 6 στρεπτομυκήτων, που απομονώθηκαν από δείγματα ριζόσφαιρας του φυτού *Olea europea* και τα οποία, μετά από *in vitro* δοκιμασίες δείχθηκε να διαθέτουν ικανότητα αναστολής της ανάπτυξης του μύκητα *Fusarium oxysporum* DSM62059, προέκυψε ότι οι τέσσερις από αυτούς (OL 7, OL 13, OL 18 και OL 48) αποτελούσαν διαφορετικά στελέχη ενώ τα στελέχη OL 28 και OL 80 είναι ίδια. (Εικόνα 3.13). Σημειώνεται ότι οι δύο τελευταίοι μικροοργανισμοί έχουν επιλεγεί για περαιτέρω πειράματα ελέγχου της ικανότητάς τους να δρουν ως παράγοντες βιοελέγχου φυτοπαθογόνων μυκήτων, χάρη στην πολύ έντονη αντιμυκητιακή ικανότητα που επέδειξαν *in vitro*.

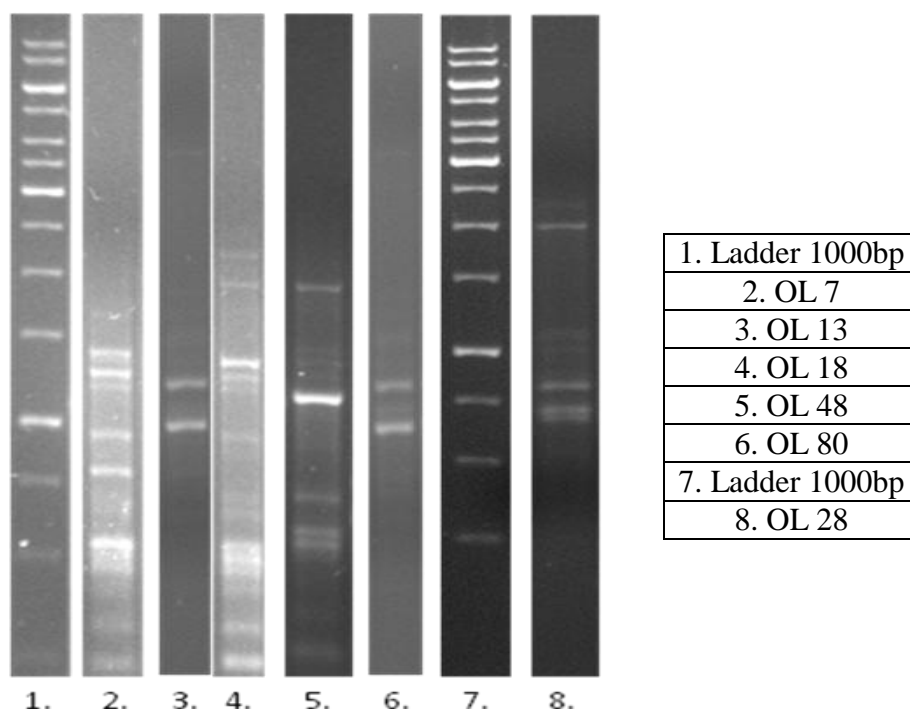
Οι στρεπτομύκητες που απομονώθηκαν από τη ριζόσφαιρα του φυτού *Pinus brutia*, που είναι ενδημικό φυτό της Κρήτης, και οι οποίοι εκδήλωσαν ανταγωνιστική δράση έναντι του *Fusarium oxysporum* DSM62059, μετά την ανάλυση του προτύπου ζωνών της αντίδρασης BOX PCR, προέκυψε ότι αποτελούν διαφορετικά στελέχη. Ομαδοποιούνται σε επίπεδο στελέχους σε 7 ομάδες, εκ των οποίων οι 4 έχουν μόνο έναν αντιπρόσωπο· δηλαδή τα στελέχη GRE 1/1, GRE 24/1 Λ και GRE 25 εντάσσονται σε ανεξάρτητες ομάδες στελεχών στρεπτομυκήτων (Εικόνα 3.14).



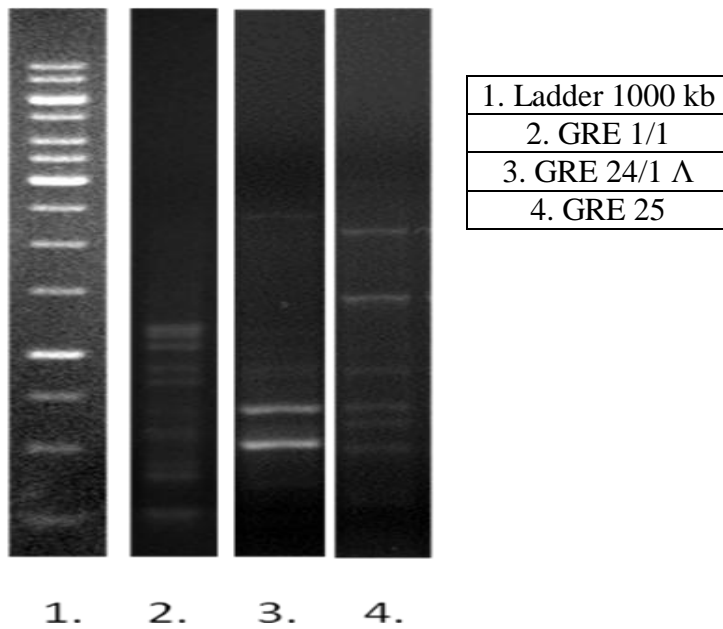
Εικόνα 3.11. Πρότυπο ζωνών BOX PCR στρεπτομυκήτων με ικανότητα αναστολής του *Fusarium oxysporum* DSM62059, απομονωμένων από τη ριζόσφαιρα του ενδημικού φυτού *Ebenus siphthorpii*



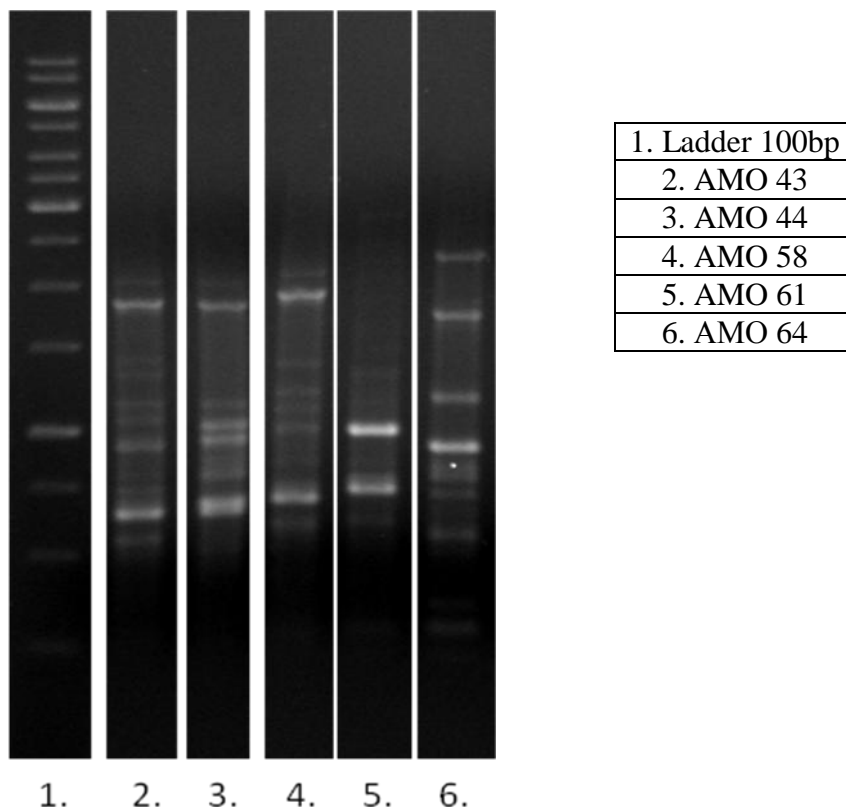
Εικόνα 3.12. Πρότυπο ζωνών BOX RCR στρεπτομύκητα με ικανότητα αναστολής του *Fusarium oxysporum* DSM62059, απομονωμένου από τη ριζόσφαιρα του ενδημικού φυτού *Ceratonia siliqua*



Εικόνα 3.13. Πρότυπο ζωνών BOX RCR στρεπτομυκήτων με ικανότητα αναστολής του *Fusarium oxysporum* DSM62059, απομονωμένων από τη ριζόσφαιρα του φυτού *Olea europea*

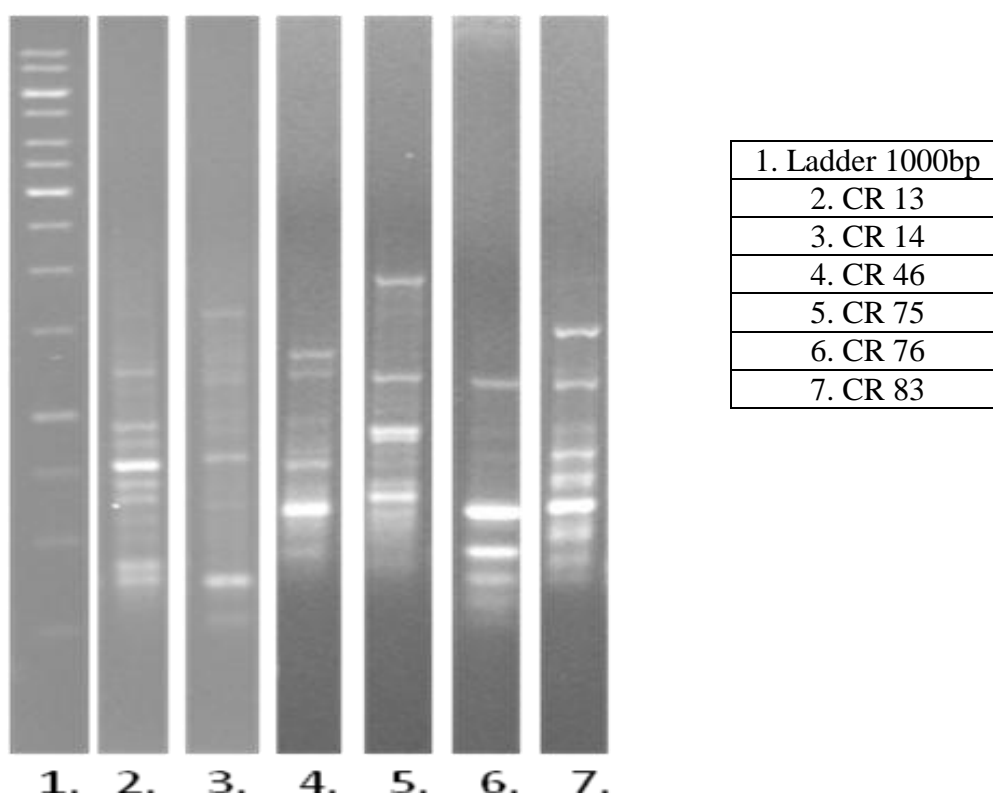


Εικόνα 3.14. Πρότυπο ζωνών BOX RCR στρεπτομυκήτων με ικανότητα αναστολής του *Fusarium oxysporum* DSM62059, απομονωμένων από τη ριζόσφαιρα του φυτού *Pinus brutia* (ενδογενές φυτό της Κρήτης)



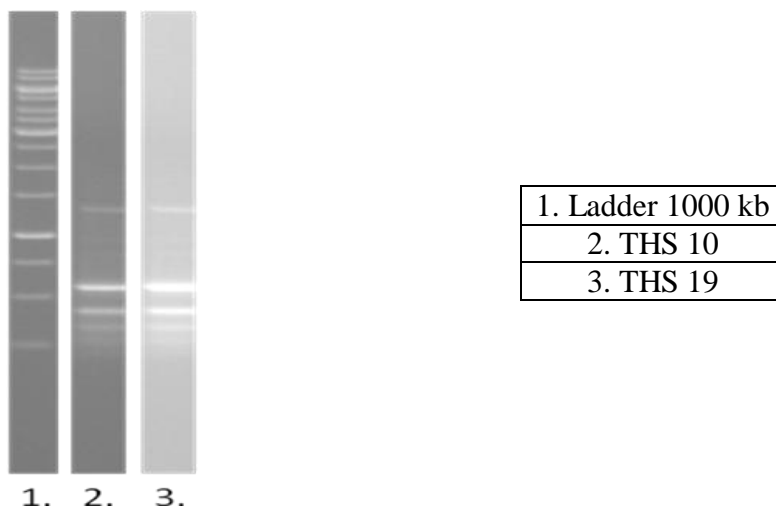
Εικόνα 3.15. Πρότυπο ζωνών BOX RCR στρεπτομυκήτων με ικανότητα αναστολής του *Fusarium oxysporum* DSM62059, απομονωμένων από τη ριζόσφαιρα αείφυλλων θάμνων αυτοφυών σε νησί του Αιγαίου

Από το σύνολο των 5 στρεπτομυκήτων, που απομονώθηκαν από τη ριζόσφαιρα αείφυλλων θάμνων αυτοφυών σε νησί του Αιγαίου και είχαν αντιμυκητιακή δράση εναντίον του *Fusarium oxysporum* DSM62059, με βάση το πρότυπο ζωνών της BOX PCR, διακρίνονται 4 ομάδες στελεχών. Οι στρεπτομύκητες AMO 43 και AMO 58 αποτελούν μέλη της μίας εξ αυτών, ενώ τα υπόλοιπα στελέχη (AMO 44, AMO 61 και AMO 64) είναι τα μέλη των υπόλοιπων 3 μονομελών ομάδων στελεχών (Εικόνα 3.15).



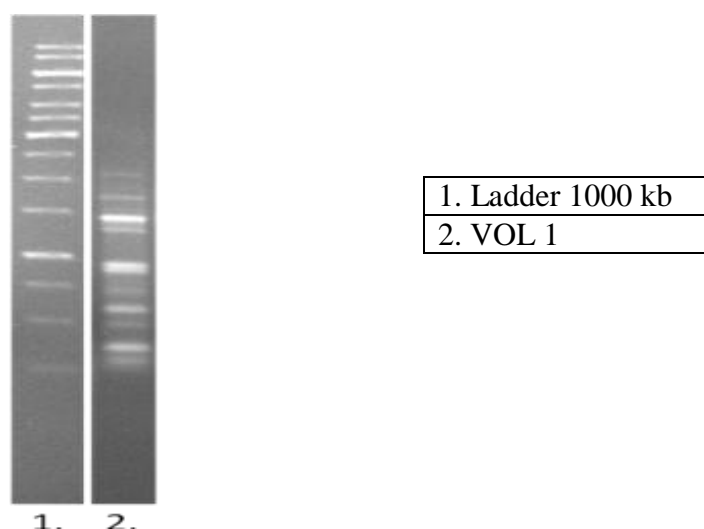
Εικόνα 3.16. Πρότυπο ζωνών BOX RCR στρεπτομυκήτων με ικανότητα αναστολής του *Fusarium oxysporum* DSM62059, απομονωμένων από τη ριζόσφαιρα κωνοφόρων δέντρων

Το ραβδωτό πρότυπο, το οποίο προέκυψε από την αντίδραση BOX PCR των στρεπτομυκήτων της ριζόσφαιρας κωνοφόρων δένδρων, οι οποίοι είχαν την ικανότητα να αναστέλλουν τον φυτοπαθογόνο μύκητα *Fusarium oxysporum* DSM62059, είναι διαφορετικό και για τους 6 μικροοργανισμούς (Εικόνα 3.16). Όλοι τους ανήκουν σε διαφορετικές ομάδες και αποτελούν διαφορετικά στελέχη.



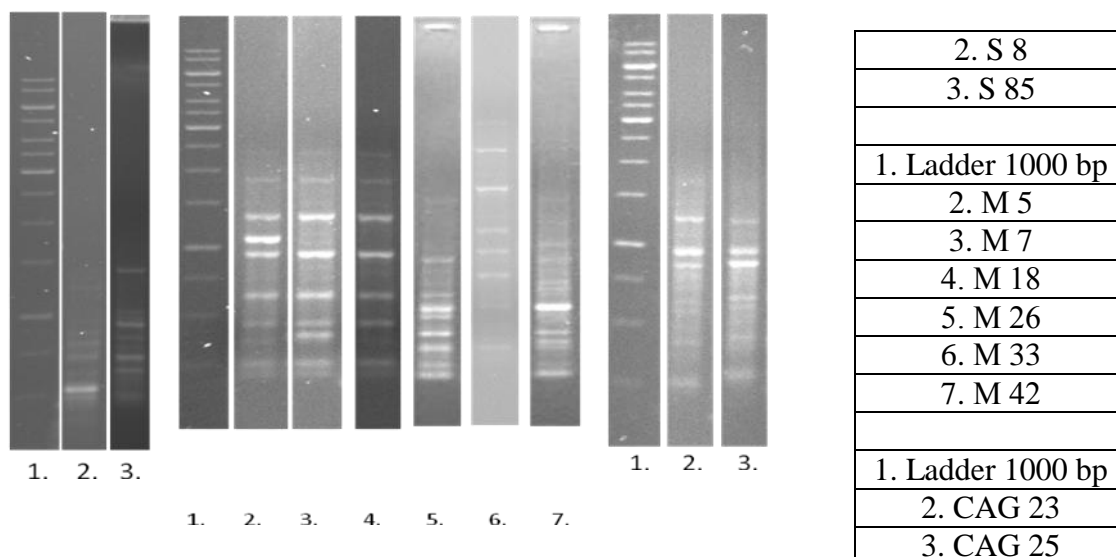
Εικόνα 3.17. Πρότυπο ζωνών BOX RCR στρεπτομυκήτων με ικανότητα αναστολής του *Fusarium oxysporum* DSM62059, απομονωμένων από δείγμα νερού και ιζήματος από τις θερμοπηγές των Θερμοπυλών

Οι στρεπτομυκήτες, οι οποίοι απομονώθηκαν από νερό και ίζημα των θερμοπηγών των Θερμοπυλών και οι οποίοι από την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων των *in vitro* δοκιμών ανταγωνισμού χαρακτηρίστηκαν θετικοί ως προς την ικανότητά τους να αναστέλλουν την ανάπτυξη του φυτοπαθογόνου μύκητα *Fusarium oxysporum* DSM62059, βάσει του προτύπου ζωνών που προκύπτει από την αντίδραση BOX PCR ομαδοποιούνται σε 1 ομάδα, καθώς επέδειξαν όμοιο πρότυπο ζωνών (Εικόνα 3.17).



Εικόνα 3.18. Πρότυπο ζωνών BOX RCR στρεπτομύκητα με ικανότητα αναστολής του *Fusarium oxysporum* DSM62059, απομονωμένου από δείγμα θαλάσσιου ηφαιστειακού ιζήματος

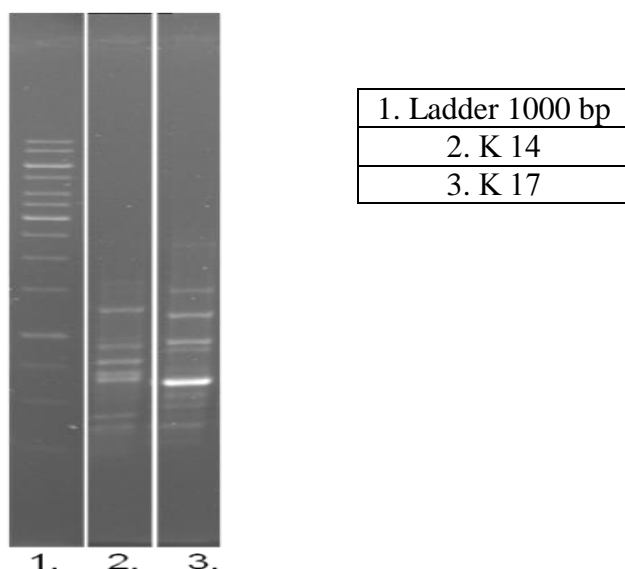
| |
|-------------------|
| 1. Ladder 1000 bp |
|-------------------|



Εικόνα 3.19. Πρότυπο ζωνών BOX RCR στρεπτομυκήτων με ικανότητα αναστολής του *Rhizoctonia solani* DSM843, απομονωμένων από εδαφικό δείγμα από διαταραγμένη καλλιεργήσιμη έκταση της περιοχής του Μαραθώνα Αττικής

Η ανάλυση του ραβδωτού προτύπου, που προέκυψε από την αντίδραση BOX PCR των στρεπτομυκήτων, που απομονώθηκαν από εδαφικό δείγμα διαταραγμένης καλλιεργήσιμης έκτασης της περιοχής του Μαραθώνα Αττικής και είχαν την ικανότητα να αναστέλλουν τον φυτοπαθογόνο μύκητα *Fusarium oxysporum* DSM62059, οδήγησε στην ομαδοποίηση των μικροοργανισμών σε 7 διαφορετικές ομάδες. Από αυτές, η μία περιλαμβάνει δύο μέλη (S 85 και M 26), η δεύτερη περιλαμβάνει επίσης δύο μέλη (M 7 και M 18), όπως και η τρίτη (CAG 23 και CAG 25), ενώ οι υπόλοιπες είναι μονομελείς, περιλαμβάνοντας τα στελέχη S 8, M 5, M 33 και M 42 αντίστοιχα (Εικόνα 3.19).

Οι στρεπτομύκητες, οι οποίοι απομονώθηκαν από εδαφικό δείγμα προστατευόμενης δασικής περιοχής και οι οποίοι αξιολογήθηκαν ως ικανοί να αναστέλλουν την ανάπτυξη του φυτοπαθογόνου μύκητα *Fusarium oxysporum* DSM62059, βάσει του προτύπου ζωνών που προκύπτει από την αντίδραση BOX PCR (Εικόνα 3.20), προέκυψε ότι είναι διαφορετικά στελέχη, καθώς καθένας τους επέδειξε διαφορετικό πρότυπο ζωνών.



Εικόνα 3.20. Πρότυπο ζωνών BOX RCR στρεπτομυκήτων με ικανότητα αναστολής του *Rhizoctonia solani* DSM843, απομονωμένων από εδαφικό δείγμα από προστατευόμενη φυσική δασική περιοχή

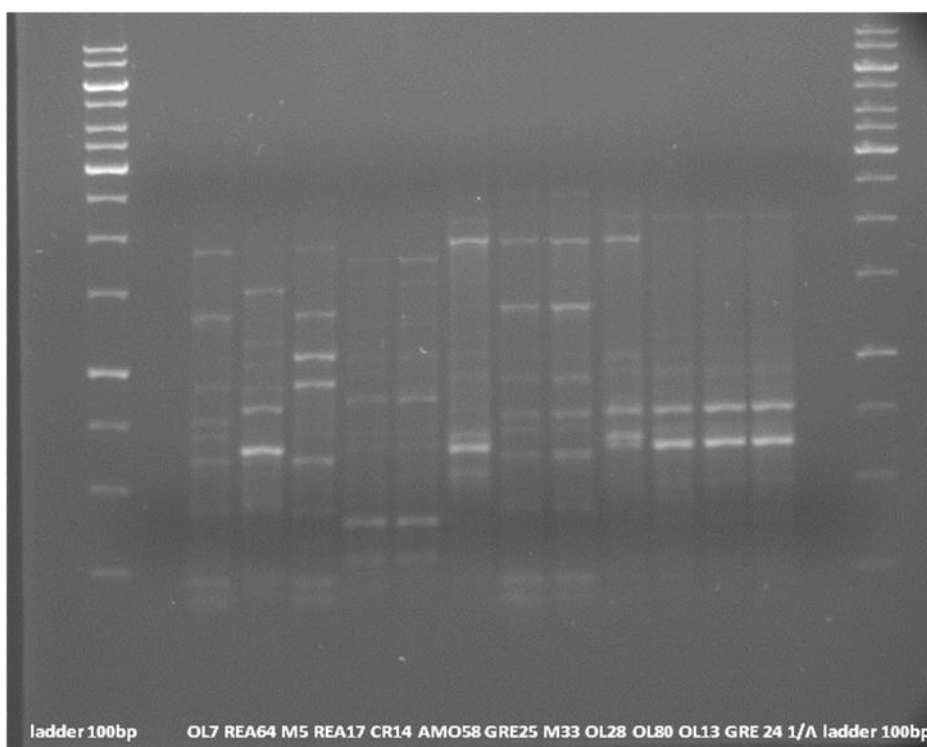
3.3. ΕΠΙΛΟΓΗ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΣΤΡΕΠΤΟΜΥΚΗΤΩΝ ΜΕ ΤΗΝ ΙΣΧΥΡΟΤΕΡΗ ΑΝΤΙΜΥΚΗΤΙΑΚΗ ΔΡΑΣΗ ΕΝΑΝΤΙΟΝ ΚΑΙ ΤΩΝ ΔΥΟ ΦΥΤΟΠΑΘΟΓΟΝΩΝ ΜΥΚΗΤΩΝ

Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων της εφαρμογής της μεθόδου που περιγράφηκε στην παράγραφο 2.2.3 του Κεφαλαίου 2 για τον προσδιορισμό του μεγέθους της αντιμυκητιακής ικανότητας των στρεπτομυκήτων που εξετάστηκαν εναντίον και των δύο φυτοπαθογόνων μυκήτων οδήγησε στην επιλογή δώδεκα στελεχών Στρεπτομυκήτων που παρουσίασαν ισχυρή ανασταλτική δράση στην ανάπτυξη τόσο του *Rhizoctonia solani* DSM843 όσο και του *Fusarium oxysporum* DSM62059 (Πίνακας 3.26).

3.3.1. Διάκριση των επιλεγμένων στελεχών στρεπτομυκήτων βάσει της αντίδρασης BOX PCR

Εξετάζοντας τα αποτυπώματα BOX PCR των δώδεκα επιλεγμένων στρεπτομυκήτων, παρατηρήθηκε πως στελέχη όπως τα REA 17 και CR 14, καθώς και τα GRE 25 και M

33 εμφάνιζαν ανά δύο όμοιο αποτύπωμα BOX PCR (Εικόνα 3.21), δηλαδή τα στελέχη REA 17 και CR 14 ήταν ίδια μεταξύ τους όπως και το στέλεχος GRE 25 με το M 33. Επίσης, τα στελέχη OL 80 και OL 28, που προέρχονταν από το ίδιο περιβάλλον (ριζόσφαιρα *Olea europaea*), συμφωνούσαν τόσο ως προς το BOX PCR αποτύπωμα όσο και ως προς την αντιμυκητιακή τους ικανότητα, ήταν δηλαδή ίδια στελέχη. Ίδιο στέλεχος με τα τελευταία ήταν και το GRE 24/1Λ, το οποίο προερχόταν από τη ριζόσφαιρα ενδημικού φυτού της Κρήτης. (Εικόνα 3.21). Όλα τα υπόλοιπα επιλεγμένα στελέχη M 5, OL 7, OL 13, AMO 58, REA 64 και ήταν διαφορετικά τόσο μεταξύ τους όσο και με τα προαναφερθέντα.



Εικόνα 3.21. BOX PCR αποτύπωμα των επιλεγμένων ως ισχυρότερων σχετικά με την αντιμυκητιακή τους ικανότητα στρεπτομυκήτων

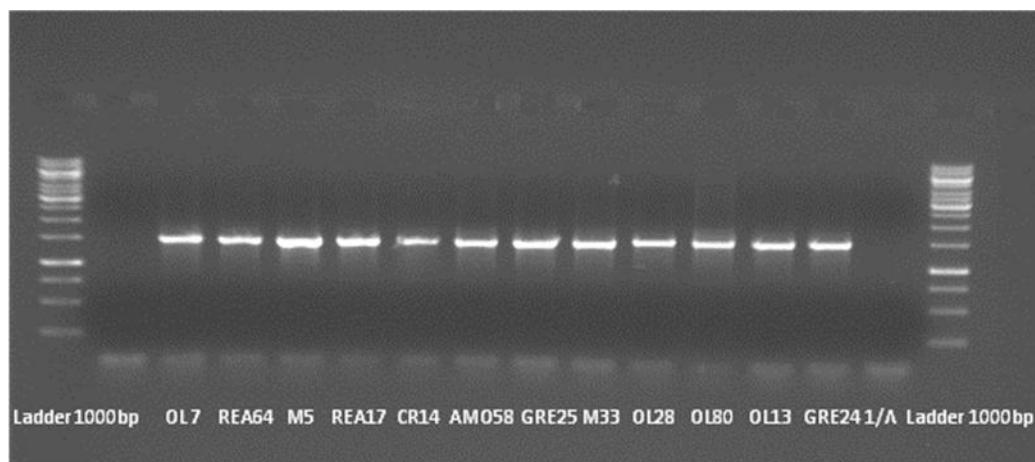
3.3.2. Ταυτοποίηση των επιλεγμένων στρεπτομυκήτων βάσει της ανάλυσης της αλληλουχίας του γονιδίου 16S rRNA

Η ανάλυση της αλληλουχίας του γονιδίου 16S rRNA (Εικόνα 3.22) και η σύγκρισή της με την αλληλουχία του ίδιου γονιδίου μικροοργανισμών προτύπων διεθνούς βάσης δεδομένων (αλγόριθμος BLAST) επιβεβαίωσε την κατάταξη των επιλεγμένων

στελεχών στο γένος των Στρεπτομυκήτων, ενώ επιπλέον εντοπίστηκε το στέλεχος με τη μεγαλύτερη ταυτότητα αλληλουχίας (Πίνακας 3.27).

Πίνακας 3.26. Αντιμυκητιακή ικανότητα επιλεγμένων στρεπτομυκήτων έναντι των φυτοπαθογόνων μυκήτων *Rhizoctonia solani* DSM843 και *Fusarium oxysporum* DSM62059

| Επιλεγμένα στελέχη στρεπτομυκήτων | Μέγεθος αναστολής έναντι του <i>Rhizoctonia solani</i> DSM843 | Μέγεθος αναστολής έναντι του <i>Fusarium oxysporum</i> DSM62059 |
|-----------------------------------|---|---|
| M 5 | 8,10 | 2,25 |
| M 33 | 6,92 | 2,25 |
| REA 17 | 7,44 | 2,25 |
| REA 64 | 7,44 | 2,36 |
| OL 7 | 8,20 | 2,13 |
| OL 13 | 6,34 | 2,55 |
| OL 28 | 9,80 | 2,57 |
| OL 80 | 11,56 | 2,46 |
| GRE 24/1 Α | 9,00 | 4,84 |
| GRE 25 | 9,68 | 3,40 |
| CR 14 | 5,55 | 2,91 |
| AMO 58 | 12,56 | 2,77 |



Εικόνα 3.22. PCR αντίδραση στα επιλεγμένα στελέχη με εκκινητές (primers) τα pA και R1492, με στόχο την ενίσχυση προς μελέτη της αλληλουχίας του τμήματος του γονιδίου 16s rRNA μεταξύ των βάσεων 8 και 1510 (αρίθμηση κατά *E.coli*)

3.4. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΩΝ ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ ΣΤΗΝ ΑΝΤΙΜΥΚΗΤΙΑΚΗ ΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΩΝ ΣΤΡΕΠΤΟΜΥΚΗΤΩΝ ΕΝΑΝΤΙΟΝ ΤΩΝ ΕΞΕΤΑΖΟΜΕΝΩΝ ΦΥΤΟΠΑΘΟΓΟΝΩΝ ΜΥΚΗΤΩΝ

Εξετάστηκε η επίδραση των διαφορετικών πηγών άνθρακα και αζώτου, τόσο ποσοτικά όσο και ποιοτικά, η επίδραση της θερμοκρασίας επώασης, καθώς και η τιμή

pH του στερεού θρεπτικού υποστρώματος στην αντιμυκητιακή δράση των επιλεγμένων στρεπτομυκήτων.

Πίνακας 3.27. Αποτελέσματα ανάλυσης της αλληλουχίας του γονιδίου 16S rRNA και σύγκρισής της με την αλληλουχία του ίδιου γονιδίου μικροοργανισμών προτύπων διεθνούς βάσης δεδομένων

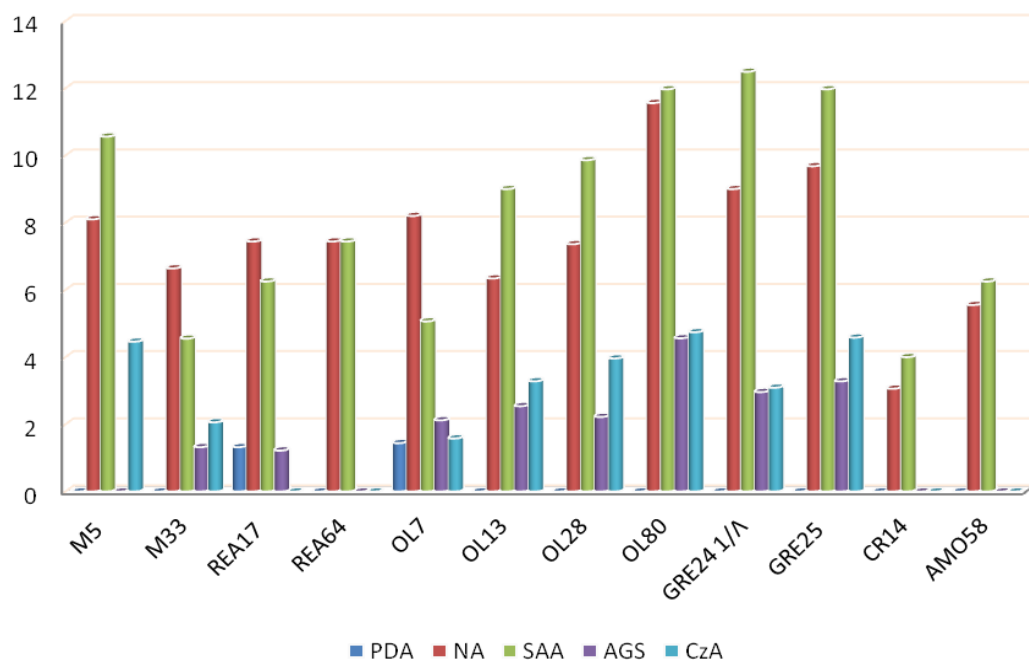
| Επιλεγμένα στελέχη στρεπτομυκήτων | Αποτελέσματα μοριακής ταυτοποίησης |
|-----------------------------------|--------------------------------------|
| M 5, M 33, GRE 25 | <i>Streptomyces rochei</i> |
| REA 17 | <i>Streptomyces spororaveus</i> |
| REA 64 | <i>Streptomyces tendae</i> |
| OL 7, OL 13, GRE 24/1 Λ, CR 14 | <i>Streptomyces sp.</i> |
| OL 28, OL 80 | <i>Streptomyces longisporoflavus</i> |
| AMO 58 | <i>Streptomyces avidinii</i> |

3.4.1. Επίδραση διαφορετικών πηγών θρεπτικών συστατικών στην αντιμυκητιακή δράση των επιλεγμένων στρεπτομυκήτων εναντίον των εξεταζόμενων φυτοπαθογόνων μυκήτων

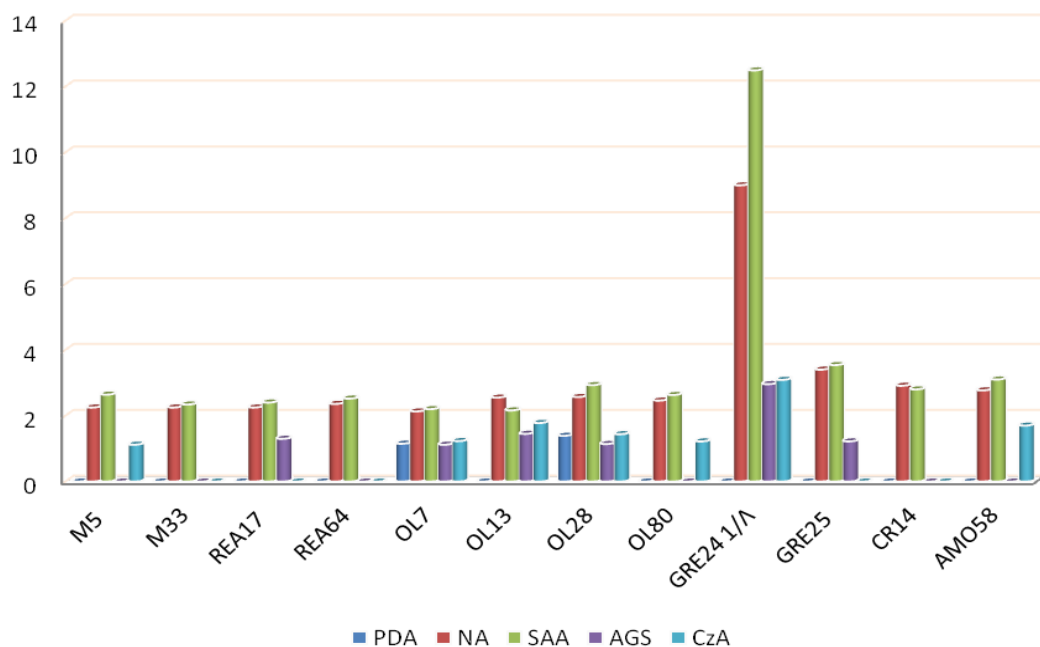
Ως άριστο θρεπτικό υπόστρωμα, το οποίο επιτρέπει στους εξεταζόμενους στρεπτομυκήτες να εκφράσουν με το μέγιστο της αντιμυκητιακής τους ικανότητας καθορίστηκε το SAA (§2.3.4) (Εικόνα 3.23), το οποίο διαθέτει ως πηγή άνθρακα τη γλυκόζη και ως πηγή αζώτου την πεπτόνη σόγιας.

Σε επόμενο στάδιο και, αφού η γλυκόζη καθορίστηκε ως η πηγή άνθρακα που οδηγούσε στην εντονότερη ανταγωνιστική συμπεριφορά μεταξύ των εξεταζόμενων στελεχών, πραγματοποιήθηκε μελέτη της αντιμυκητιακής συμπεριφοράς των στρεπτομυκήτων σε διαφορετικές συγκεντρώσεις γλυκόζης. Δεδομένου ότι το θρεπτικό υπόστρωμα που επιλέχθηκε (SAA, §2.3.4) διαθέτει γλυκόζη σε περιεκτικότητα 1,5 % βάρος κατ' όγκον, είναι δηλαδή αρκετά πλούσιο σε πηγή άνθρακα, ελέγχθηκε η αντιμυκητιακή συμπεριφορά των στρεπτομυκήτων σε μικρότερες συγκεντρώσεις (1 % και 0,5 % βάρος κατ' όγκον). Τα αποτελέσματα των προκαταρκτικών πειραμάτων, όπου πραγματοποιήθηκαν καθαρές καλλιέργειες των εξεταζόμενων μικροοργανισμών, ήταν θετικά, υπό την έννοια ότι όλα τα στελέχη αναπτύσσονταν επαρκώς στις καθορισμένες συνθήκες.

(A)



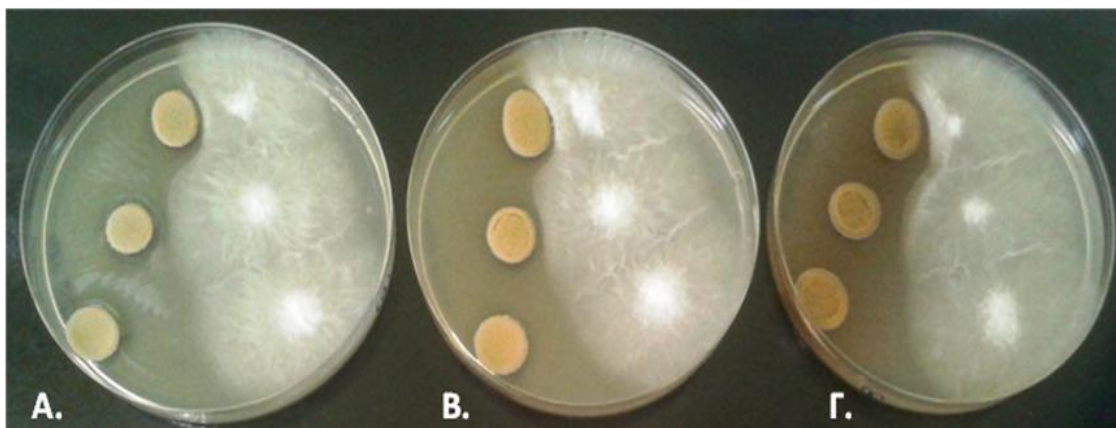
(B)



Εικόνα 3.23. Επίδραση διαφορετικών πηγών άνθρακα και αζώτου (PDA: πηγή άνθρακα: γλυκόζη, πηγή αζώτου: πρωτεΐνες, NA: πηγή άνθρακα: ποικιλία πολυσακχαριτών, πηγή αζώτου: αμινοξέα και πρωτεΐνες, SAA: πηγή άνθρακα: γλυκόζη, πηγή αζώτου: πεπτόνη σόγιας, AGS: πηγή άνθρακα: γλυκερόλη, πηγή αζώτου: αργινίνη, CzA: πηγή άνθρακα: σουκρόζη, πηγή αζώτου: NaNO₃) στο μέγεθος της αντιμυκητιακής δράσης έναντι του *Rhizoctonia solani* (A) και του *Fusarium oxysporum* (B)

Αναλυτικότερα, τα στελέχη GRE 24/1 Λ και OL 28 εξακολουθούν να αναστέλλουν ισχυρά τόσο τον *Rhizoctonia solani* DSM843 όσο και τον *Fusarium oxysporum* DSM62059 σε όλες τις συγκεντρώσεις γλυκόζης. Σε μικρή απόσταση του εμβολίου του στρεπτομύκητα από τον κάθε μύκητα (1,5 cm) η σχηματιζόμενη ζώνη αναστολής ήταν πολύ μικρή και αυξανόταν λίγο με τη μείωση της συγκέντρωσης της γλυκόζης. Στην ενδιάμεση απόσταση εμβολιασμού (3 cm) η ζώνη αναστολής ήταν ελαφρώς μεγαλύτερη και αυξανόταν και πάλι μειουμένης της περιεκτικότητας του θρεπτικού υποστρώματος σε γλυκόζη. Με τη μεγαλύτερη απόσταση εμβολιασμού (4,5 cm) και τη μικρότερη συγκέντρωση γλυκόζης, τα στελέχη GRE 24/1 Λ και OL 28 προκάλεσαν τη μεγαλύτερη αναστολή στην ανάπτυξη των μυκήτων-στόχων.

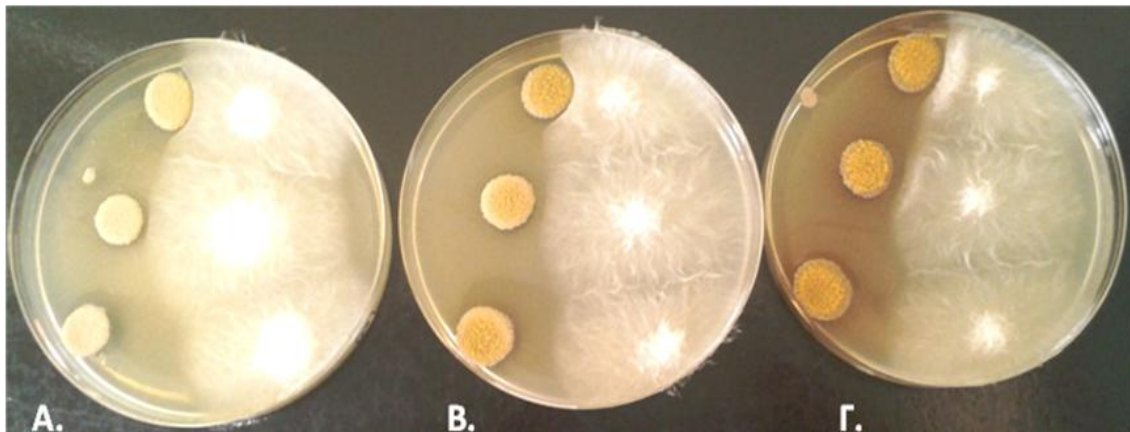
Επίσης, και οι δύο στρεπτομύκητες, αλλά εντονότερα το στέλεχος OL28, όσο μειωνόταν η συγκέντρωση της γλυκόζης, παρουσίαζαν αλλαγή στη μορφολογία της αποικίας τους, η οποία εμφανίστηκε σκουρότερη και περισσότερο σποριωμένη. Ακόμη, το θρεπτικό υπόστρωμα που περιείχε γλυκόζη 0,5 % βάρος κατ' όγκον χρωματίστηκε καφετί λόγω ουσιών που παρήγαγαν οι στρεπτομύκητες. Ενδεικτικά παρουσιάζονται οι Εικόνες 3.24 και 3.25.



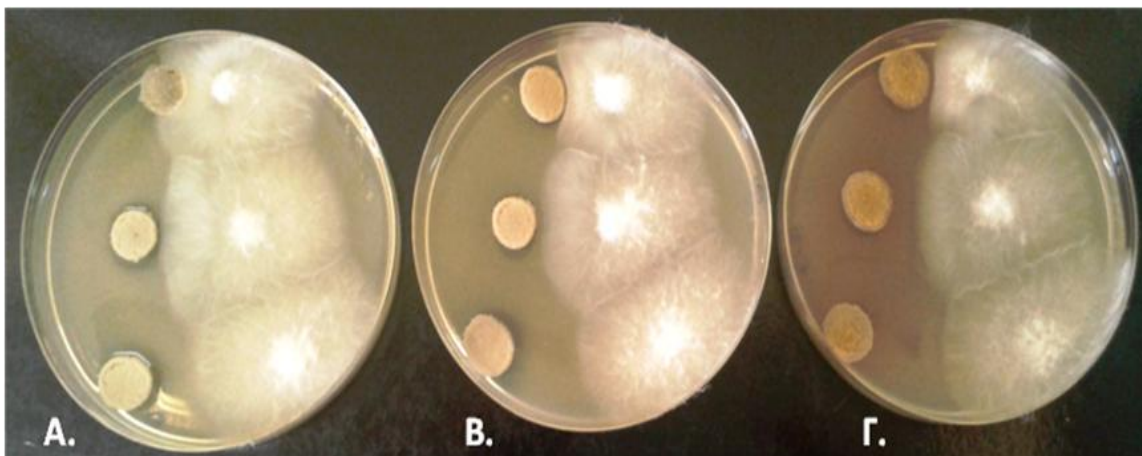
Εικόνα 3.24. Συγκαλλιέργεια του στρεπτομύκητα GRE 24/1 Λ και του μύκητα *Rhizoctonia solani* DSM843 σε θρεπτικό υπόστρωμα SAA που περιείχε γλυκόζη σε συγκέντρωση: **A.** 1,5 % βάρος κατ' όγκον, **B.** 1,0 % βάρος κατ' όγκον και **Γ.** 0,5 % βάρος κατ' όγκον

Οι υπόλοιποι στρεπτομύκητες (GRE 25, OL 7, AMO 58, OL 80, OL 13, M 5, CR 14, REA 64, REA 17, M 33) δεν ανέστειλλαν την ανάπτυξη κανενός από τους φυτοπαθογόνους μύκητες, όταν εμβολιάστηκαν πολύ κοντά σε αυτούς, και ειδικά όταν το θρεπτικό υπόστρωμα ήταν πλούσιο σε γλυκόζη. Όσο η συγκέντρωση της γλυκόζης μειωνόταν τόσο ο ανταγωνισμός γινόταν εντονότερος, ενώ, όταν οι

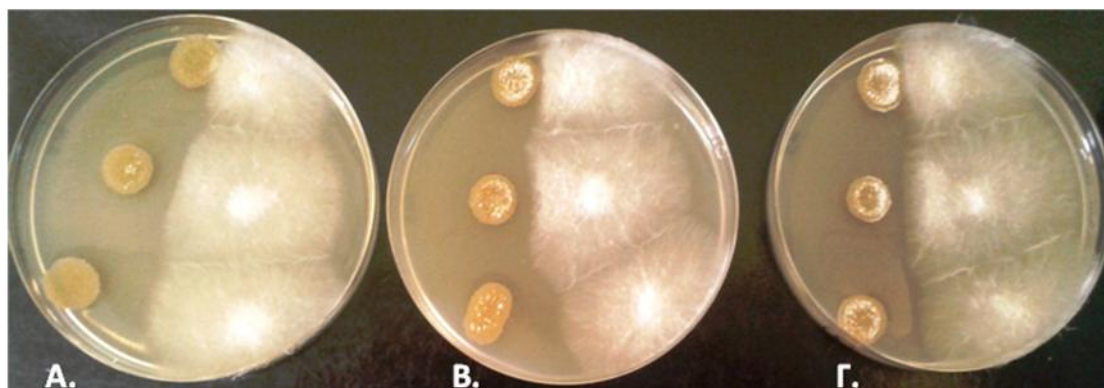
ανταγωνιστές μικροοργανισμοί εμβολιάζονταν σε μεγάλη απόσταση μεταξύ τους, η αναστολή των μυκήτων εμφάνιζε το μέγιστο βαθμό. Οι αποικίες των στρεπτομυκήτων εξακολουθούσαν να αλλάζουν μορφή όσο η γλυκόζη μειωνόταν, ενώ ειδικά τα στελέχη OL 7 και OL 13 σε συγκέντρωση γλυκόζης 0,5 % βάρος κατ' όγκον σπορίωνε έντονα, ειδικά στην πλευρά που βρισκόταν απέναντι από τον παθογόνο μύκητα. Ενδεικτικά παρουσιάζονται οι Εικόνες 3.26 και 3.27.



Εικόνα 3.25. Συγκαλλιέργεια του στρεπτομύκητα OL 28 και του μύκητα *Fusarium oxysporum* DSM62059 σε θρεπτικό υπόστρωμα SAA που περιείχε γλυκόζη σε συγκέντρωση: **A.** 1,5 % βάρος κατ' όγκον, **B.** 1,0 % βάρος κατ' όγκον και **Γ.** 0,5 % βάρος κατ' όγκον.



Εικόνα 3.26. Συγκαλλιέργεια του στρεπτομύκητα M 5 και του μύκητα *Fusarium oxysporum* DSM62059 σε θρεπτικό υπόστρωμα SAA που περιείχε γλυκόζη σε συγκέντρωση: **A.** 1,5 % βάρος κατ' όγκον, **B.** 1,0 % βάρος κατ' όγκον και **Γ.** 0,5 % βάρος κατ' όγκον

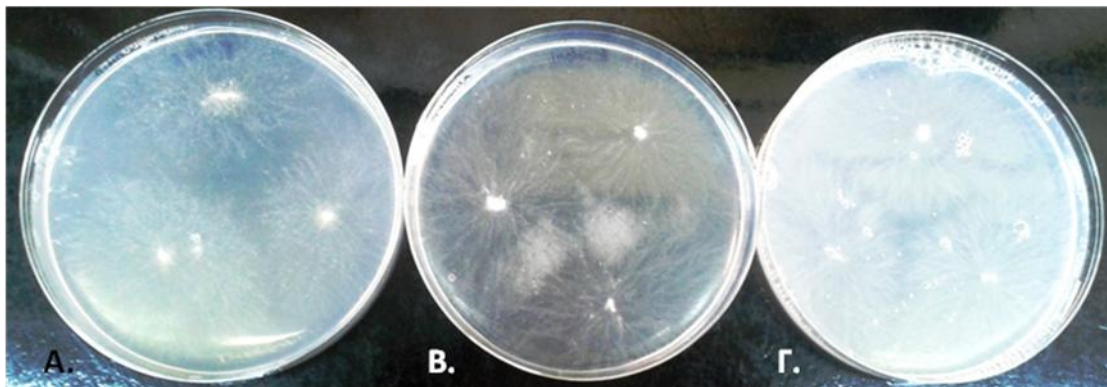


Εικόνα 3.27. Συγκαλλιέργεια του στρεπτομύκητα OL 13 και του μύκητα *Rhizoctonia solani* DSM843 σε θρεπτικό υπόστρωμα SAA που περιείχε γλυκόζη σε συγκέντρωση: **A.** 1,5 % βάρος κατ' όγκον, **B.** 1,0 % βάρος κατ' όγκον και **Γ.** 0,5 % βάρος κατ' όγκον.

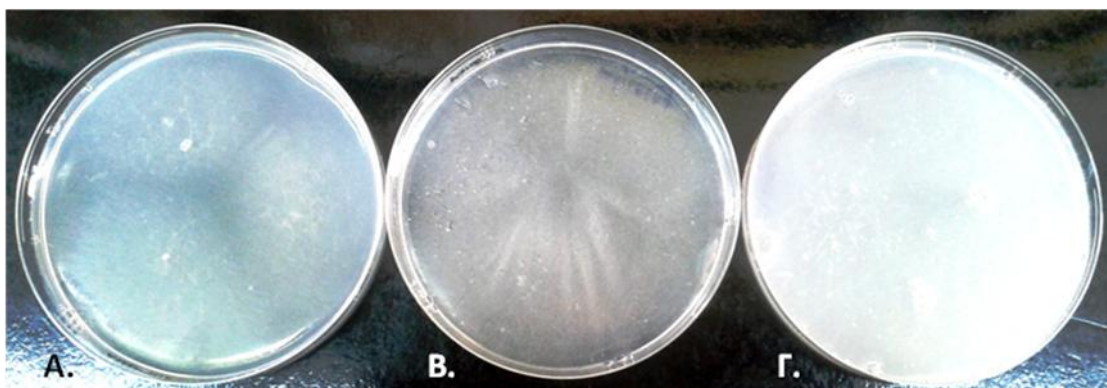
Συμπερασματικά, προκύπτει ότι η αντιμυκητιακή ικανότητα των επιλεγμένων στρεπτομυκήτων αποκτούσε τη μεγαλύτερη έντασή της σε πολύ χαμηλή συγκέντρωση γλυκόζης (μοναδική πηγή άνθρακα), καθώς και ότι αυτή δεν εκφραζόταν, όταν οι ανταγωνιστές μικροοργανισμοί αναπτύσσονταν πολύ κοντά ο ένας στον άλλο.

Ο λεπτομερέστερος έλεγχος της επίδρασης της πηγής αζώτου στην αντιμυκητιακή ικανότητα των επιλεγμένων στρεπτομυκήτων πραγματοποιήθηκε με την αντικατάσταση της πεπτόνης σόγιας, που αποτελούσε τη μοναδική πηγή αζώτου στο θρεπτικό υπόστρωμα SAA, από νιτρικά ιόντα (NO_3^- , 10 mM), αμμωνία (NH_4 , 5 mM) και ουρία ($\text{CO}(\text{NH}_2)_2$, 5 mM), διαδοχικά. Διατηρήθηκε σταθερή η συγκέντρωση του υποστρώματος σε γλυκόζη στην άριστη τιμή, όπως αυτή καθορίστηκε από την προηγούμενη δοκιμασία (0,5 % βάρος κατ' όγκον), καθώς και οι συνθήκες θερμοκρασίας και τιμής pH.

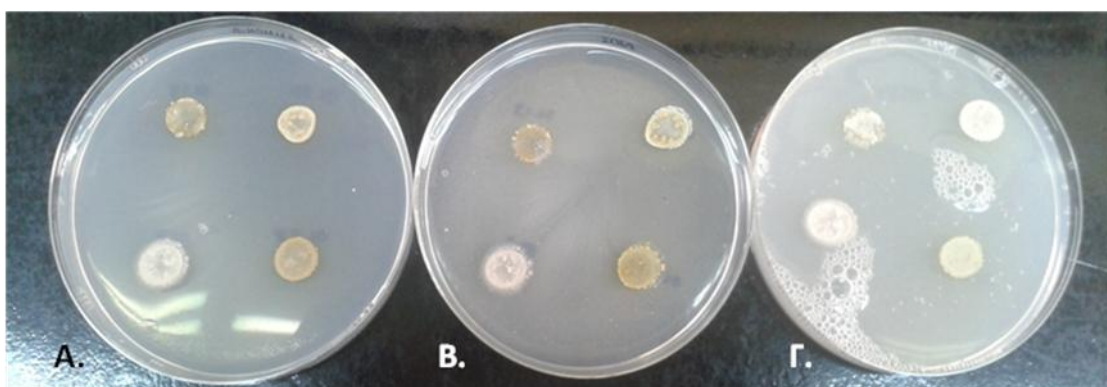
Τα αποτελέσματα των προκαταρκτικών πειραμάτων, όπου πραγματοποιήθηκαν καθαρές καλλιέργειες των εξεταζόμενων μικροοργανισμών στις συγκεκριμένες συνθήκες, ήταν θετικά για τους στρεπτομύκητες (Εικόνα 3.30), υπό την έννοια ότι αναπτύσσονταν επαρκώς αλλά όχι για τους μύκητες οι οποίοι δεν κατάφεραν να αναπτύξουν ισχυρό και πυκνό μυκήλιο (Εικόνα 3.28, 3.29).



Εικόνα 3.28. Ανάπτυξη αδύναμου μυκηλίου του φυτοπαθογόνου μύκητα *Rhizoctonia solani* DSM843, που περιέχει ως μοναδική πηγή αζώτου (Α) αμμωνία (5 mM), (Β) νιτρικά ιόντα (10 mM) και (Γ) ουρία (5 mM)

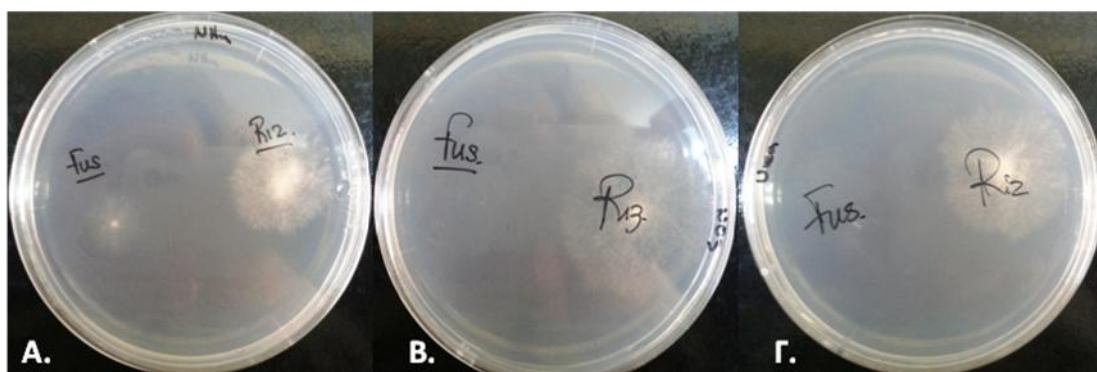


Εικόνα 3.29. Ανάπτυξη αδύναμου μυκηλίου του φυτοπαθογόνου μύκητα *Fusarium oxysporum* DSM62059 σε θρεπτικό υπόστρωμα SAA, που περιέχει ως μοναδική πηγή αζώτου (Α) αμμωνία (5 mM), (Β) νιτρικά ιόντα (10 mM) και (Γ) ουρία (5 mM)

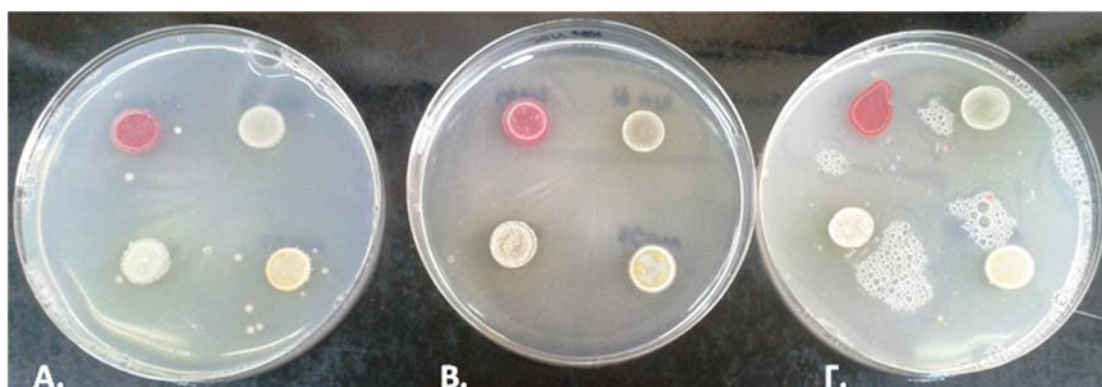


Εικόνα 3.30. Ανάπτυξη στρεπτομυκήτων σε θρεπτικό υπόστρωμα SAA, που περιέχει ως μοναδική πηγή αζώτου (Α) αμμωνία (5 mM), (Β) νιτρικά ιόντα (10 mM) και (Γ) ουρία (5 mM)

Λόγω της αδυναμίας πλήρους ανάπτυξης των μυκήτων στο τροποποιημένο θρεπτικό υπόστρωμα SAA, επιλέχθηκε για τον έλεγχο της επίδρασης των διαφορετικών πηγών αζώτου στην ένταση του ανταγωνισμού μεταξύ των εξεταζόμενων μικροοργανισμών ένα θρεπτικό υπόστρωμα ενισχυμένο σε ιχνοστοιχεία (ελάχιστο θρεπτικό υπόστρωμα, §2.2.7) και μοναδική πηγή αζώτου αμμωνία (5 mM) ή νιτρικά ιόντα (10 mM) ή ουρία (5 mM). Η ανάπτυξη τόσο των στρεπτομυκήτων όσο και του μύκητα *Rhizoctonia solani* DSM843 ήταν πλήρης στο νέο θρεπτικό υπόστρωμα, ενώ ο μύκητας *Fusarium oxysporum* DSM62059 δεν κατάφερε (Εικόνα 3.31, Εικόνα 3.32) να αναπτυχθεί σε καμία περίπτωση. Για το λόγο αυτό ο μύκητας *Fusarium oxysporum* DSM62059 δεν συμπεριλήφθηκε στον έλεγχο της επίδρασης των πηγών αζώτου στον ανταγωνισμό μεταξύ των μικροοργανισμών.

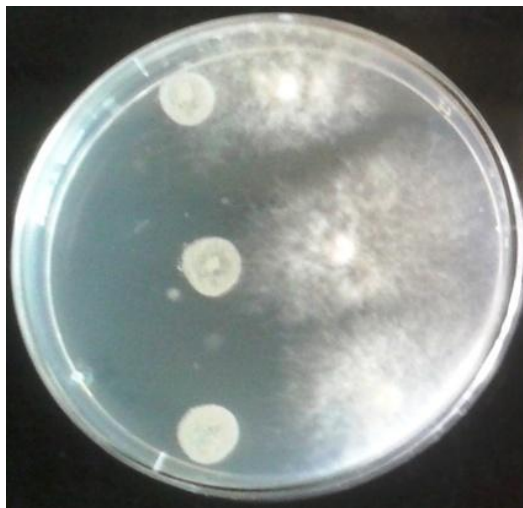


Εικόνα 3.31. Αδυναμία ανάπτυξης μυκηλίου *Fusarium oxysporum* DSM62059 (αριστερά σε κάθε τρυβλίο) και ανάπτυξη ισχυρού μυκηλίου *Rhizoctonia solani* DSM843 (δεξιά σε κάθε τρυβλίο) σε ελάχιστο θρεπτικό υπόστρωμα, που περιέχει ως μοναδική πηγή αζώτου (Α) αμμωνία (5 mM), (Β) νιτρικά ιόντα (10 mM) και (Γ) ουρία (5 mM)



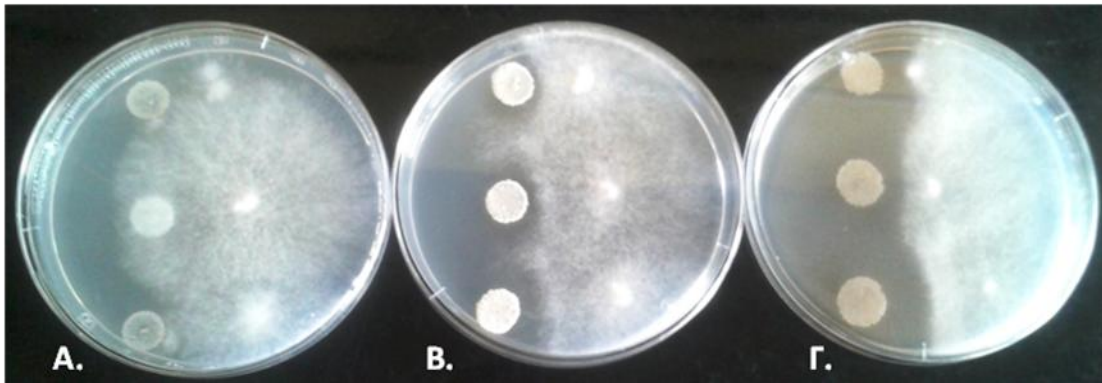
Εικόνα 3.32. Ανάπτυξη στρεπτομυκήτων σε ελάχιστο θρεπτικό υπόστρωμα, που περιέχει ως μοναδική πηγή αζώτου (Α) αμμωνία (5 mM), (Β) νιτρικά ιόντα (10 mM) και (Γ) ουρία (5 mM)

Κανένας από τους εξεταζόμενους στρεπτομύκητες, με εξαίρεση το στέλεχος GRE 24/1 Λ, δεν ανέστειλε την ανάπτυξη του μύκητα *Rhizoctonia solani* DSM843, όταν χρησιμοποιήθηκε η αμμωνία ως πηγή αζώτου. Σε κάθε περίπτωση, ανεξάρτητα από την απόσταση εμβολιασμού των μικροοργανισμών, το μυκήλιο του μύκητα εξαπλώθηκε τόσο ώστε να καλυφθεί η αποικία των βακτηρίων. Μόνο μεταξύ της αποικίας του στρεπτομύκητα GRE 24/1 Λ και του μύκητα σχηματίστηκε ζώνη αναστολής σε αυτή την πηγή αζώτου (Εικόνα 3.33)

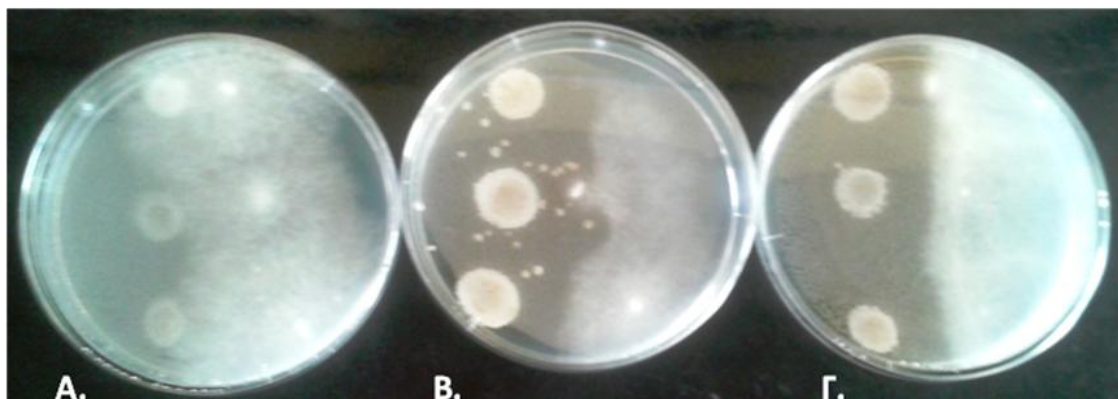


Εικόνα 3.33. Συγκαλλιέργεια του στρεπτομύκητα GRE 24/1 Λ και του μύκητα *Rhizoctonia solani* DSM843 σε ελάχιστο θρεπτικό υπόστρωμα, που περιέχει ως μοναδική πηγή αζώτου Αμμωνία (5 mM)

Τόσο όταν η πηγή αζώτου ήταν η ουρία όσο και όταν ήταν τα νιτρικά ιόντα, οι στρεπτομύκητες διατήρησαν την αντιμυκητιακή τους δράση με μοναδική εξαίρεση το στέλεχος REA 64 που δεν εμπόδισε την ανάπτυξη του μύκητα σε καμία από τις εξεταζόμενες συνθήκες. Οι στρεπτομύκητες OL 13, OL 80, CR 14, AMO 58 και GRE 24/1 Λ (ενδεικτικά παρουσιάζονται οι Εικόνες 3.34 και 3.35) επέδειξαν ισχυρότερη αντιμυκητιακή δράση παρουσία ουρίας απ' ό,τι παρουσία νιτρικών ιόντων, ενώ τα αποτελέσματα για τα υπόλοιπα στελέχη για αυτές τις πηγές αζώτου ήταν απόλυτα συγκρίσιμα. Όπως κατά την εξέταση της επίδρασης της συγκέντρωσης γλυκόζης στον ανταγωνισμό, παρατηρήθηκε ότι όσο πιο μακριά ξεκινούσε η ανάπτυξη των μικροοργανισμών τόσο πιο έντονα εκδηλωνόταν ο μεταξύ τους ανταγωνισμός.



Εικόνα 3.34. Συγκαλλιέργεια του στρεπτομύκητα OL 13 και του μύκητα *Rhizoctonia solani* DSM843 σε ελάχιστο θρεπτικό υπόστρωμα, που περιέχει ως μοναδική πηγή αζώτου (Α) αμμωνία (5 mM), (Β) νιτρικά ιόντα (10 mM) και (Γ) ουρία (5 mM)

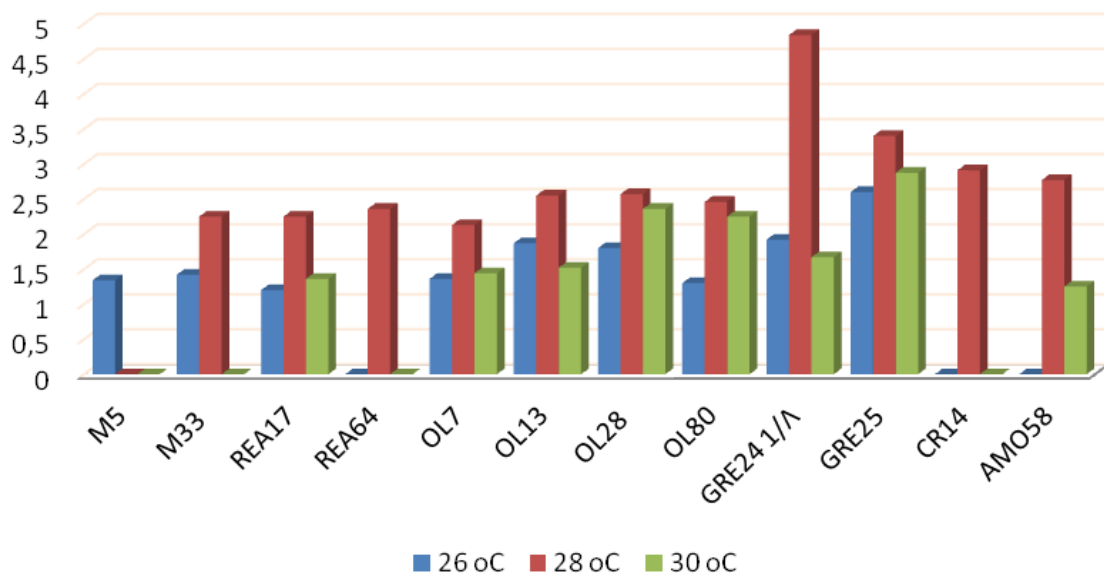


Εικόνα 3.35. Συγκαλλιέργεια του στρεπτομύκητα OL 28 και του μύκητα *Rhizoctonia solani* DSM843 σε ελάχιστο θρεπτικό υπόστρωμα, που περιέχει ως μοναδική πηγή αζώτου (Α) αμμωνία (5 mM), (Β) νιτρικά ιόντα (10 mM) και (Γ) ουρία (5 mM)

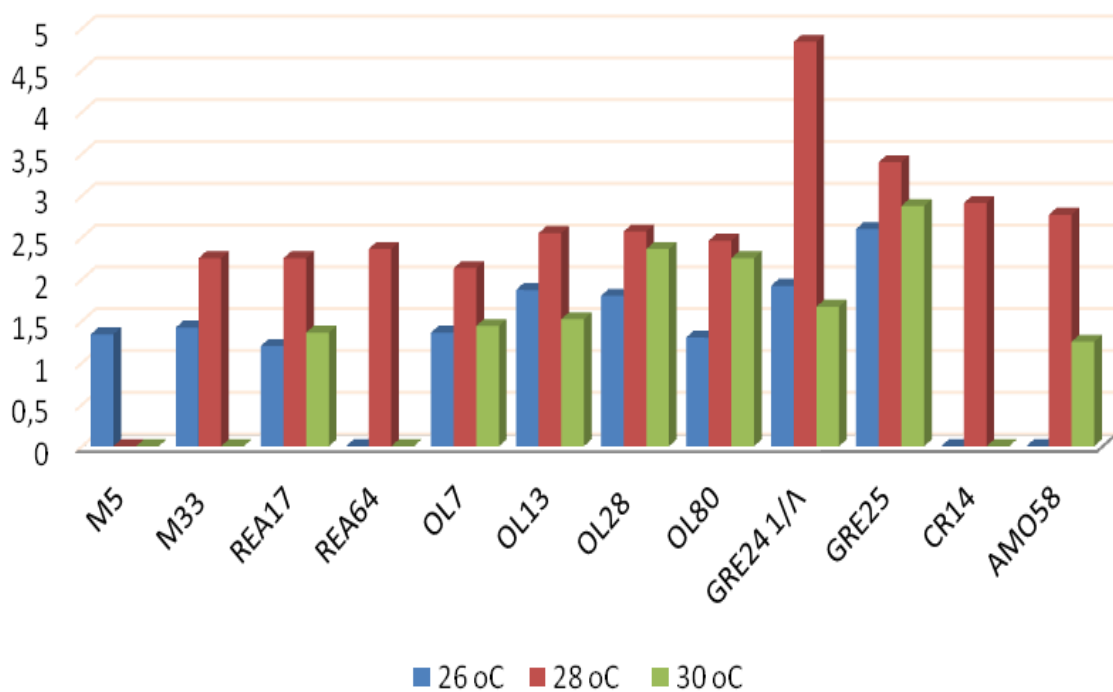
3.4.2. Επίδραση της θερμοκρασίας επώασης και της τιμής pH του θρεπτικού υποστρώματος στην αντιμυκητιακή δράση των επιλεγμένων στρεπτομυκήτων εναντίον των εξεταζόμενων φυτοπαθογόνων μυκήτων

Η θερμοκρασία που ενισχύει τον ανταγωνισμό μεταξύ των εξεταζόμενων μικροοργανισμών δείχθηκε ότι είναι οι 28 °C (Εικόνα 3.36), ενώ, όταν το pH του υποστρώματος της συγκαλλιέργειας στρεπτομυκήτων και μυκήτων ρυθμίστηκε στο 8, εκδηλώθηκε η ισχυρότερη αντιμυκητιακή δράση (Εικόνα 3.37).

(A)

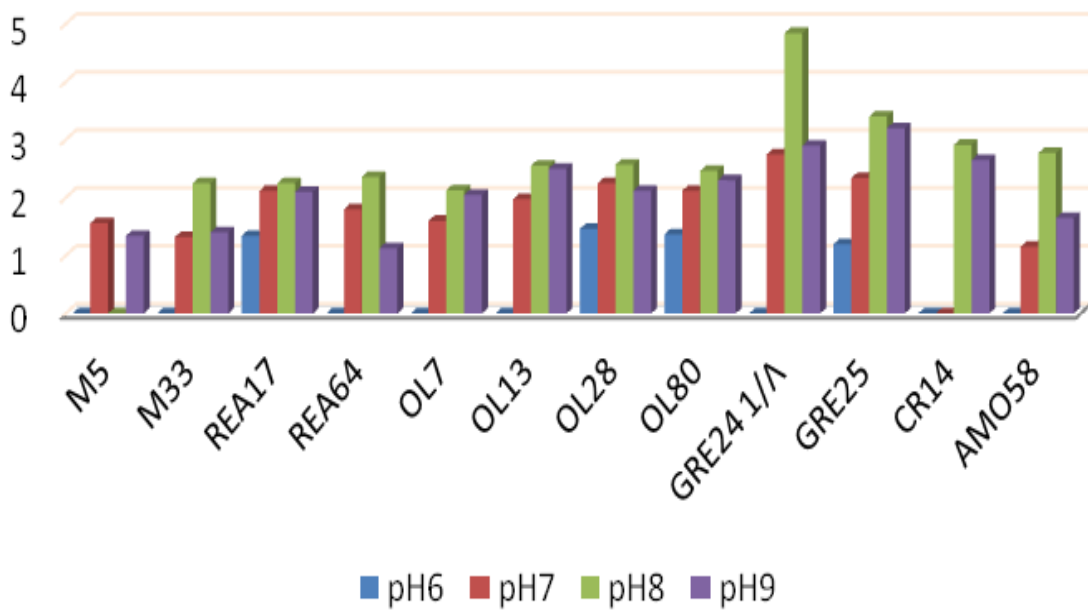


(B)

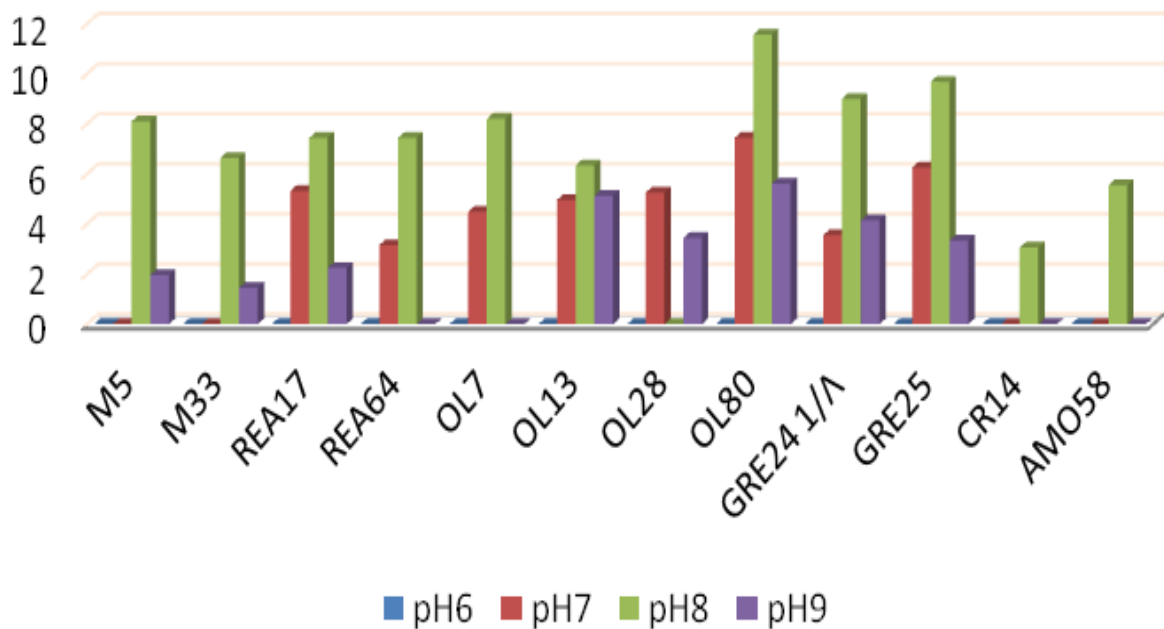


Εικόνα 3.36. Επίδραση της θερμοκρασίας της καλλιέργειας στο μέγεθος της αντιμυκητιακής δράσης των επιλεγμένων στρεπτομυκήτων έναντι του *Rhizoctonia solani* (A) και του *Fusarium oxysporum* (B)

(A)



(B)



Εικόνα 3.37. Επίδραση του pH στο μέγεθος της αντιμυκητιακής δράσης των επιλεγμένων στρεπτομυκήτων έναντι του *Rhizoctonia solani* (A) και του *Fusarium oxysporum* (B)

3.5. ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΩΝ ΣΤΡΕΠΤΟΜΥΚΗΤΩΝ

Παρακάτω παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του προσδιορισμού της ενεργότητας επιλεγμένων ενζύμων, όπως αυτός πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφηκε στην παράγραφο 2.6 του Κεφαλαίου 2.

3.5.1. Ανίχνευση ενζυμικής ενεργότητας κυτταρινάσης με πηγή άνθρακα κυτταρίνη

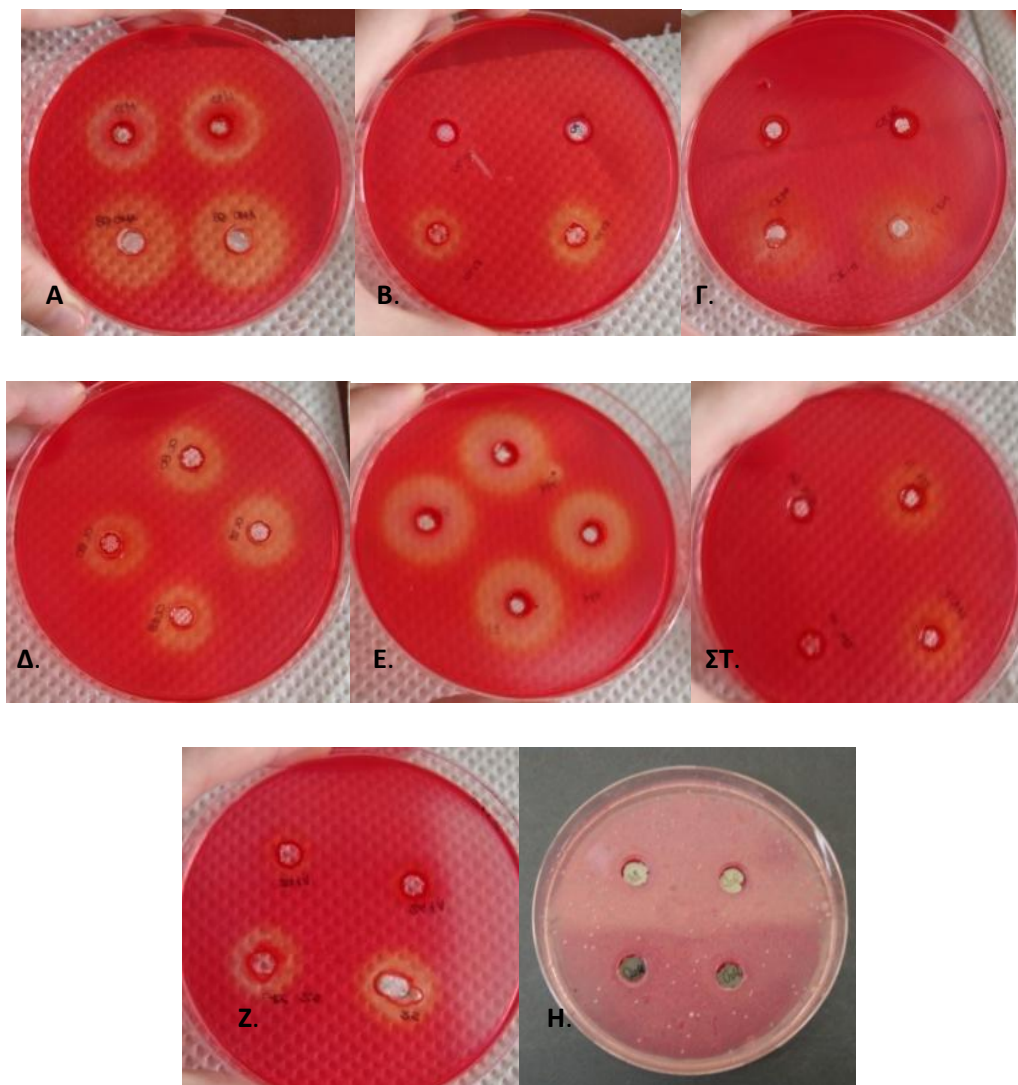
Από την εφαρμογή του πρωτοκόλλου για την ανίχνευση ενζυμικής ενεργότητας κυτταρινάσης προέκυψαν για κάθε στέλεχος οι ακόλουθες τιμές:

Πίνακας 3.28. Διάμετρος διαυγούς ζώνης ανά στέλεχος

| Στελέχη στρεπτομυκήτων | Διάμετρος διαυγών ζωνών (cm) |
|------------------------|------------------------------|
| AMO 58 | 2,5 |
| CR 14 | 2,0 |
| CR 76 | 0,0 |
| OL 7 | 0,0 |
| OL 13 | 1,2 |
| OL 28 | 1,8 |
| OL 80 | 1,7 |
| M 5 | 2,3 |
| M 7 | 2,2 |
| M 33 | 2,1 |
| REA 17 | 1,2 |
| REA 64 | 0,0 |
| GRE 24/1 Λ | 0,0 |
| GRE 25 | 1,6 |

Στο υπερκείμενο υγρό που προέκυψε από την καλλιέργεια των στρεπτομυκήτων CR 76, OL 7, REA 64 και GRE 24/1 Λ δεν ανιχνεύτηκε ενζυμική ενεργότητα κυτταρινάσης. Αντίθετα, τα υπερκείμενα των υπόλοιπων από τους εξεταζόμενους στρεπτομυκήτες (AMO 58, M 33, OL 13, CR 14, OL 28, OL 80, M 5, M 7, REA 17, GRE 25) είχαν την ικανότητα να διασπούν την κυτταρίνη με την οποία είχε

εμπλουτιστεί το στερεό υλικό, στο οποίο πραγματοποιήθηκε η δοκιμασία, και να το αποχρωματίσουν (Εικόνα 3.38). Η υψηλότερη ενεργότητα κυτταρινάσης προσδιορίστηκε για τον στρεπτομύκητα AMO 58, καθώς το εκχύλισμα της υγρής καλλιέργειάς του προκάλεσε αποχρωματισμό στο στερεό υλικό σε μεγαλύτερη ακτίνα, ενώ οριακή ενεργότητα κυτταρινάσης ανιχνεύτηκε στο εκχύλισμα της καλλιέργειας του REA 17 (Πίνακας 3.28).



Εικόνα 3.38. Ζώνες αναστολής που προκλήθηκαν από το υπερκείμενο υγρών καλλιιεργειών των επιλεγμένων στρεπτομυκήτων σε θρεπτικό υπόστρωμα, που περιέχει κυτταρίνη, μετά από χρώση με Κόκκινο του Κονγκό. **A:** AMO 58, M 33, **B:** OL 7, OL 13, **Γ:** CR 14, CR 76, **Δ:** OL 28, OL 80, **Ε:** M 5, M 7, **ΣΤ:** REA 17, REA 64, **Ζ:** GRE 24/1 Λ, GRE 25, **Η:** Αρνητικός μάρτυρας

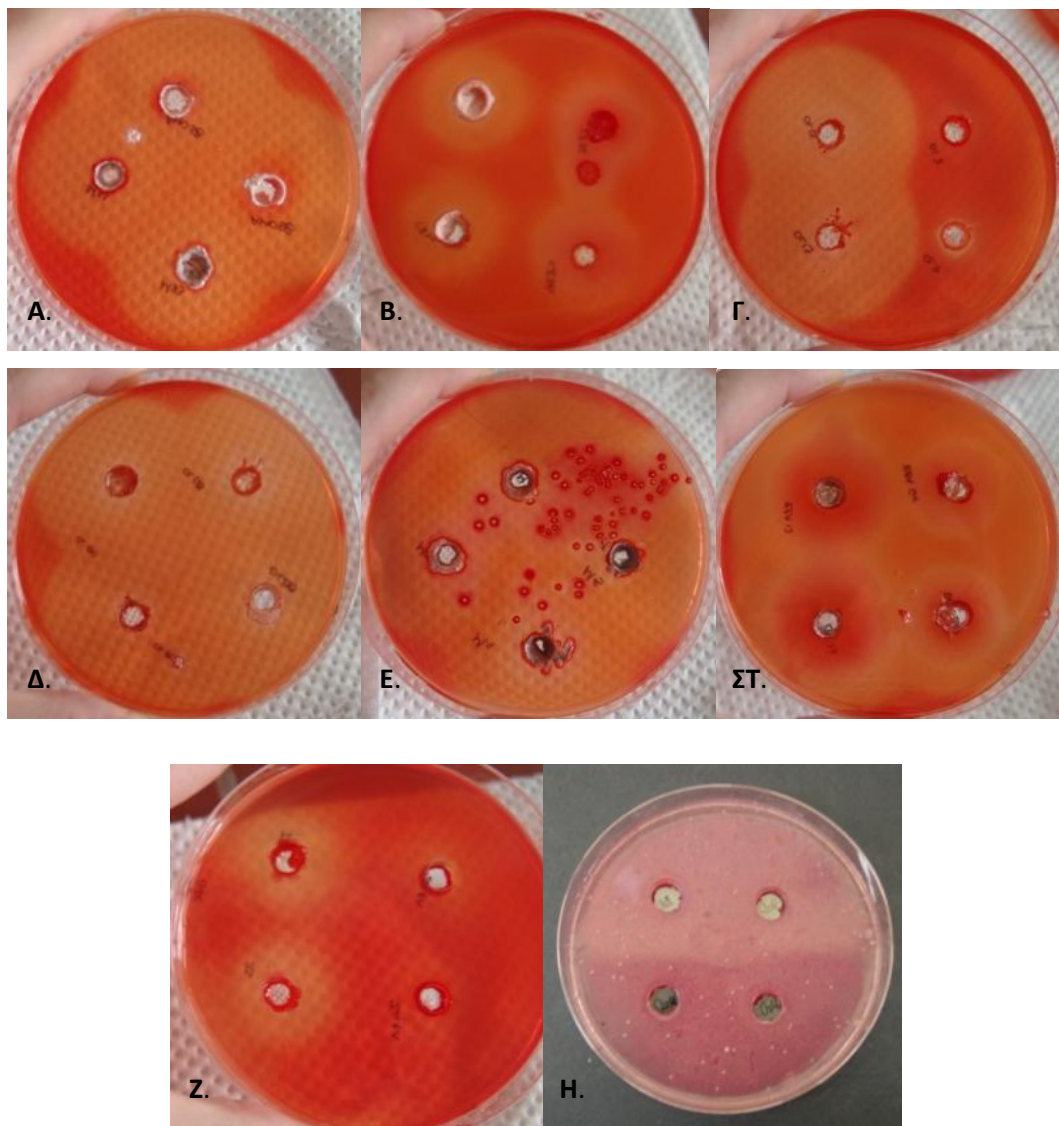
3.5.2. Ανίχνευση ενζυμικής ενεργότητας ξυλανάσης με πηγή άνθρακα την ξυλάνη

Από την εφαρμογή του πρωτοκόλλου για την ανίχνευση ενζυμικής ενεργότητας ξυλανάσης προέκυψαν για κάθε στέλεχος οι ακόλουθες τιμές:

Πίνακας 3.29. Διάμετρος διαυγούς ζώνης ανά στέλεχος

| Στελέχη στρεπτομυκήτων | Διάμετρος διαυγών ζωνών (cm) |
|------------------------|------------------------------|
| AMO 58 | 5,9 |
| CR 14 | 2,7 |
| CR 76 | 2,6 |
| OL 7 | 1,1 |
| OL 13 | 5,0 |
| OL 28 | 4,8 |
| OL 80 | 4,6 |
| M 5 | 5,6 |
| M 7 | 5,1 |
| M 33 | 4,8 |
| REA 17 | 5,9 |
| REA 64 | 5,0 |
| GRE 24/1 Λ | 1,5 |
| GRE 25 | 2,7 |

Ενεργότητα ξυλανάσης ανιχνεύτηκε στο υπερκείμενο υγρό από τις καλλιέργειες όλων των στρεπτομυκήτων που εξετάστηκαν. Όλα τα δείγματα που μελετήθηκαν κατόρθωσαν να προκαλέσουν τον σχηματισμό διαυγούς ζώνης στο υπόστρωμα που περιείχε ξυλάνη και το οποίο είχε χρωματιστεί με τη χρωστική Κόκκινο του Κονγκό (Congo Red), δείχνοντας έτσι ότι έχουν την ικανότητα να υδρολύουν την ξυλάνη. Μάλιστα, οι ενεργότητες που μετρήθηκαν ήταν πολύ υψηλές, δεδομένου ότι η διάμετρος της διαυγούς ζώνης που σχηματίστηκε ήταν πολύ μεγάλη (Εικόνα 3.39). Συγκεκριμένα, το υπερκείμενο της υγρής καλλιέργειας των στρεπτομυκήτων REA 17, REA 64, M 5, M 33, AMO 58 και OL 13 προκάλεσε διαυγή ζώνη γύρω από το φρεάτιο στο οποίο τοποθετήθηκε, της οποίας η διάμετρος ξεπέρασε τα 5 cm, φτάνοντας σχεδόν τα 6 cm (Πίνακας 3.29). Η μικρότερη ενεργότητα ξυλανάσης που μετρήθηκε προερχόταν από το δείγμα του στρεπτομύκητα OL 7, όπου η διαυγής ζώνη είχε διάμετρο 1,1 cm και η παρατήρηση και η καταγραφή της ήταν οριακή (Πίνακας 3.29).



Εικόνα 3.39. Ζώνες αναστολής που προκλήθηκαν από το υπερκείμενο υγρών καλλιιεργειών των επιλεγμένων στρεπτομυκήτων σε θρεπτικό υπόστρωμα που περιέχει ξυλάνη, μετά από χρώση με Κόκκινο του Κονγκό. **A:** AMO 58, M 33, **B:** CR 14, CR 76, **Γ:** OL 7, OL 13, **Δ:** OL 28, OL 80, **Ε:** M 5, M 7, **ΣΤ:** REA 17, REA 64, **Z:** GRE 241 Λ, GRE 25, **Η:** Αρνητικός μάρτυρας

3.5.3. Ανίχνευση ενζυμικής ενεργότητας χιτινάσης με πηγή άνθρακα τη χιτίνη

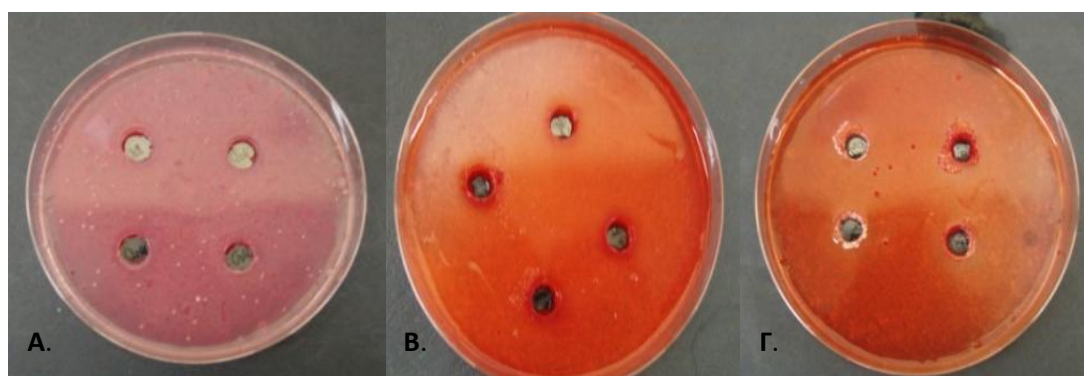
Από την εφαρμογή του πρωτοκόλλου για την ανίχνευση ενζυμικής ενεργότητας χιτινάσης προέκυψαν για κάθε στέλεχος οι τιμές, που παρατίθενται στον Πίνακα 3.30.

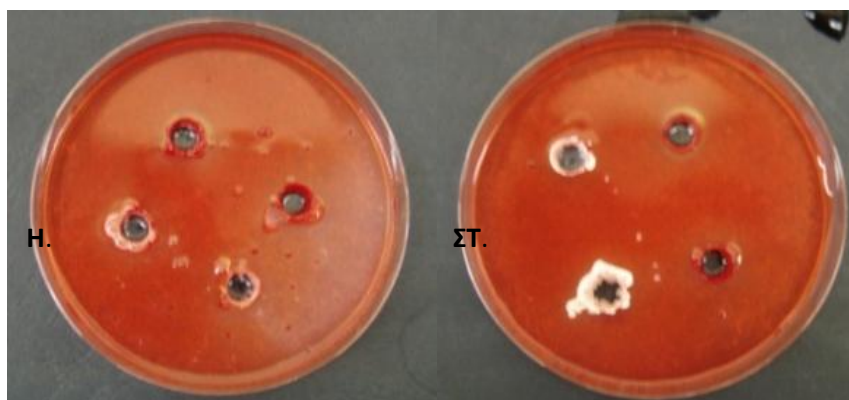
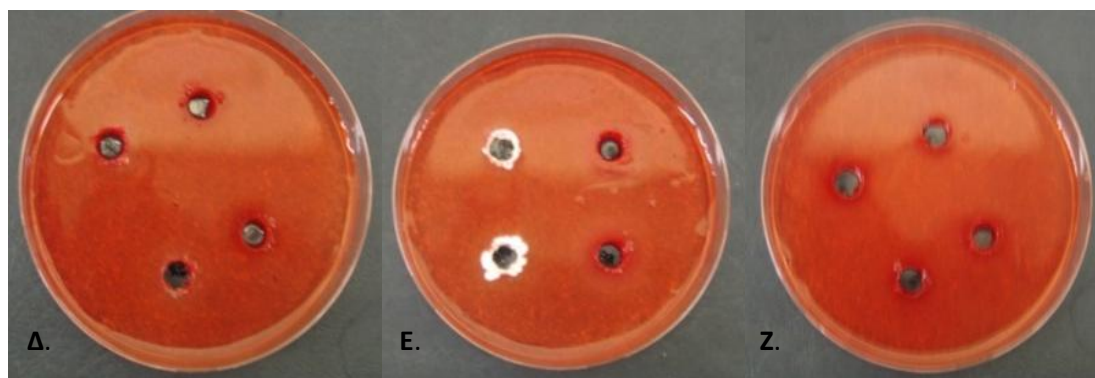
Σχετικά με την ενεργότητα χιτινάσης, αυτή δύσκολα ανιχνεύτηκε σε πολλά από τα δείγματα που εξετάστηκαν (Εικόνα 3.40). Τα εκχυλίσματα τεσσάρων από τους στρεπτομύκητες που δοκιμάστηκαν (REA 17, REA 64, GRE 24/1 Λ και GRE 25) δεν επέδειξαν καθόλου ενεργότητα χιτινάσης. Τα υπερκείμενα των καλλιιεργειών των

υπόλοιπων στρεπτομυκήτων (AMO 58, CR 14, CR 76, OL 7, OL 13, OL 28, OL 80, M 5, M 7 και M 33) εκδήλωσαν την ικανότητα να διασπούν τη χιτίνη σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα, το οποίο την περιείχε, προκαλώντας αποχρωματισμό μετά από χρώση με την χρωστική Κόκκινο του Κονγκό. Ωστόσο, η ενεργότητα αυτή ήταν ασθενής και δύσκολο να προσδιοριστεί. Εξαιρέση αποτέλεσαν οι στρεπτομύκητες M 7 και AMO 58, τα εκχυλίσματα της καλλιέργειας των οποίων προκάλεσαν διαυγή ζώνη διαμέτρου 3,1 cm (Πίνακας 3.30) γύρω από το φρεάτιο, όπου εφαρμόστηκαν, η οποία, όμως, δεν ήταν ευδιάκριτη, δηλαδή το στερεό θρεπτικό υπόστρωμα δεν είχε πλήρως αποχρωματιστεί σε αυτή την ακτίνα.

Πίνακας 3.30. Διάμετρος διαυγούς ζώνης ανά στέλεχος

| Στελέχη στρεπτομυκήτων | Διάμετρος διαυγών ζωνών (cm) |
|------------------------|------------------------------|
| AMO 58 | 3,1 |
| CR 14 | 2,1 |
| CR 76 | 2,2 |
| OL 7 | 1,6 |
| OL 13 | 1,8 |
| OL 28 | 1,8 |
| OL 80 | 2,1 |
| M 5 | 2,6 |
| M 7 | 3,1 |
| M 33 | 2,8 |
| REA 17 | 0,0 |
| REA 64 | 0,0 |
| GRE 24/1 Λ | 0,0 |
| GRE 25 | 0,0 |





Εικόνα 3.40. Ζώνες αναστολής που προκλήθηκαν από το υπερκείμενο υγρών καλλιιεργειών των επιλεγμένων στρεπτομυκήτων σε θρεπτικό υπόστρωμα, που περιέχει χιτίνη, μετά από χρώση με Κόκκινο του Κονγκό. **Α:** Αρνητικός μάρτυρας, **Β:** REA 64 - REA 17, **Γ:** OL 28 - OL 80, **Δ:** OL 7, OL 13, **Ε:** CR 76 - CR14, **ΣΤ:** GRE24/1 Α - GRE 25, **Ζ:** M 5 - M 7, **Η:** AMO 58 - M33

3.6. ΑΝΤΙΜΥΚΗΤΙΑΚΗ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΕΝΩΝ ΑΠΟ ΥΓΡΕΣ ΚΑΙ ΣΤΕΡΕΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΤΩΝ ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΣΤΡΕΠΤΟΜΥΚΗΤΩΝ, ΣΕ ΥΔΑΤΙΚΟ ΔΙΑΛΥΜΑ

Παρακάτω παρατίθενται τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την εφαρμογή των μεθόδων εκχύλισης των βιοενεργών μεταβολιτών των επιλεγμένων στρεπτομυκήτων τόσο από υγρές όσο και από υγρές καλλιέργειές τους, όπως αυτές περιγράφηκαν στο Κεφάλαιο 2 (§2.7.1).

3.6.1. Βιοενεργότητα εκχυλισμάτων καλλιιεργειών στρεπτομυκήτων εναντίον του *Rhizoctonia solani* DSM843

3.6.1.1. Βιοενεργότητα εκχυλισμάτων από υγρή καλλιέργεια των επιλεγμένων στρεπτομυκήτων εναντίον του φυτοπαθογόνου μύκητα *Rhizoctonia solani* DSM843

Τα εκχυλίσματα που προέκυψαν από την υγρή καλλιέργεια των επιλεγμένων στρεπτομυκήτων (§2.7.1) δεν είχαν την ικανότητα να αναστείλουν την ανάπτυξη του φυτοπαθογόνου μύκητα *Rhizoctonia solani* DSM843, ακόμα και μετά τη συμπύκνωσή τους.

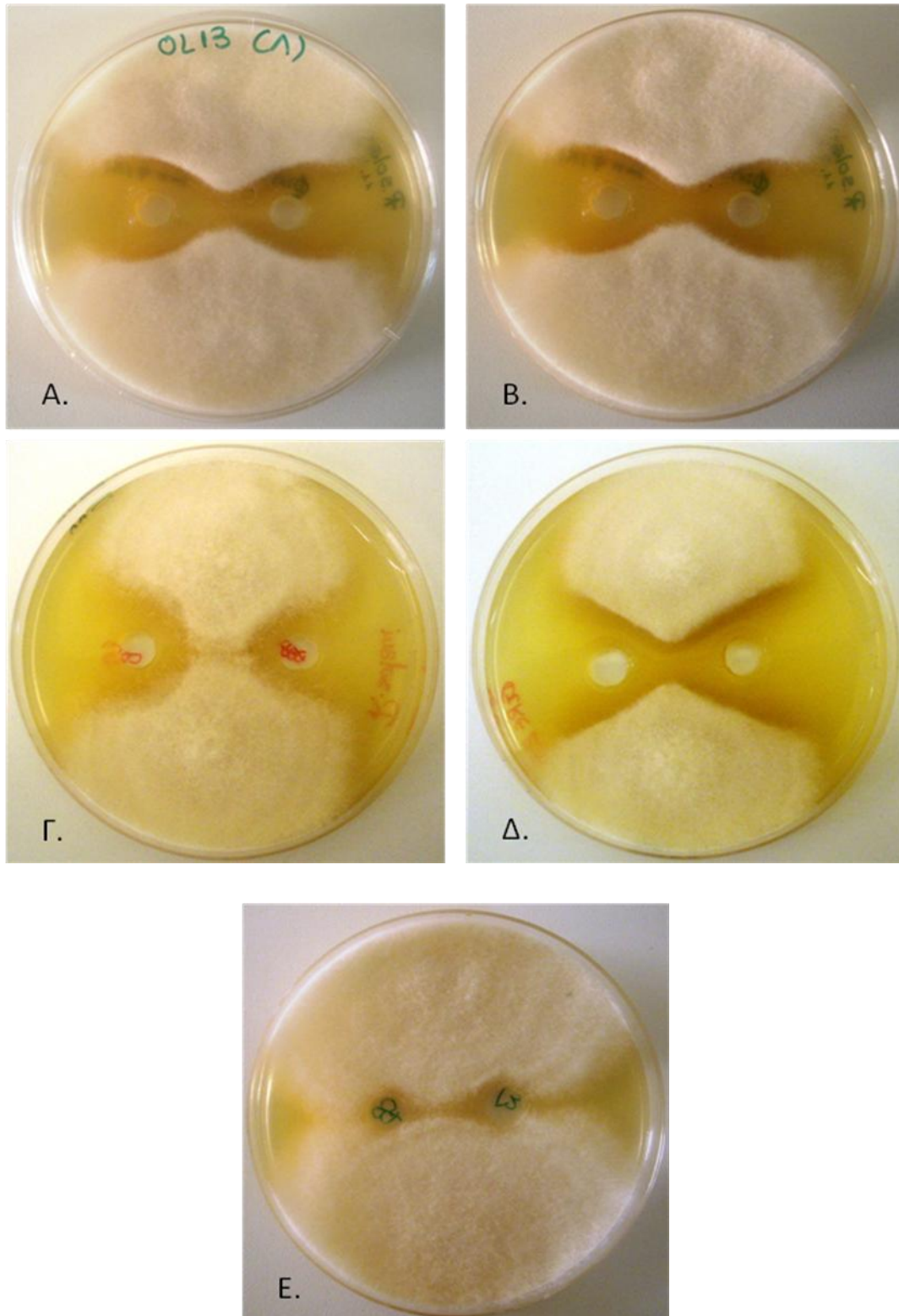
3.6.1.2. Βιοενεργότητα εκχυλισμάτων από στερεή καλλιέργεια των επιλεγμένων στρεπτομυκήτων εναντίον του φυτοπαθογόνου μύκητα *Rhizoctonia solani* DSM843

Σε αντίθεση με τα εκχυλίσματα των υγρών καλλιιεργειών των στρεπτομυκήτων, τα εκχυλίσματα που ελήφθησαν από τις στερεές καλλιέργειες (καθαρές και μικτές, §2.7.1) των ίδιων μικροοργανισμών δείχθηκαν ικανά να αναστείλουν την ανάπτυξη του *Rhizoctonia solani* DSM843. Συγκεκριμένα, το υδατικό εκχύλισμα τόσο από τη στερεή μικτή καλλιέργεια όσο και από τη στερεή καθαρή καλλιέργεια τεσσάρων από τους δώδεκα εξεταζόμενους στρεπτομύκητες έδειξε αξιοσημείωτη ικανότητα αναστολής της ανάπτυξης του μύκητα. Όπως αναμενόταν, η αντιμυκητιακή αυτή ικανότητα ενισχύθηκε με τη συμπύκνωση των εκχυλισμάτων. (Πίνακας 3.31, Εικόνα 3.41).

Με σκοπό να μελετηθεί αν η παρουσία του μύκητα-στόχου είναι κρίσιμη στην εκδήλωση του αντιμυκητιακού χαρακτήρα των στρεπτομυκήτων, εξετάστηκε η ικανότητα του εκχυλίσματος καθαρής στερεής καλλιέργειας καθενός από τα τέσσερα παραπάνω βακτήρια να αναστέλλει την ανάπτυξη του μύκητα. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι και αυτά τα δείγματα, μετά τη συμπύκνωσή τους προκάλεσαν έντονη ανασχεση της ανάπτυξης του μυκηλίου του *Rhizoctonia solani* DSM843, απόλυτα συγκρίσιμη με αυτή που προκάλεσαν τα εκχυλίσματα των μικτών καλλιιεργειών που παρουσιάστηκαν παραπάνω.

Πίνακας 3.31. Αντιμυκητιακή δραστηριότητα εκχυλισμάτων υγρής και στερεής καλλιέργειας των επιλεγμένων στρεπτομυκήτων [(-) : ανικανότητα αναστολής της ανάπτυξης των εξεταζόμενων μυκήτων, (+) : ασθενής ικανότητα αναστολής της ανάπτυξης των εξεταζόμενων μυκήτων, (++) : ισχυρή ικανότητα αναστολής της ανάπτυξης των εξεταζόμενων μυκήτων]

| Στελέχη
στρεπτομυκήτων | Αντιμυκητιακή δράση έναντι του φυτοπαθογόνου μύκητα
<i>Rhizoctonia solani</i> DSM843 | |
|---------------------------|---|--|
| | Εκχύλισμα υγρής καλλιέργειας | Εκχύλισμα στερεής καλλιέργειας
(καθαρής και μυκτης) |
| M 5 | — | — |
| M 33 | — | — |
| OL 7 | — | — |
| OL 13 | — | ++ |
| OL 28 | — | ++ |
| OL 80 | — | ++ |
| REA 17 | — | — |
| REA 64 | — | — |
| GRE 24 1 Α | — | — |
| GRE 25 | — | ++ |
| CR 14 | — | — |
| AMO 58 | — | — |



Εικόνα 3.41. Αντιμυκητιακή ικανότητα των εκχυλισμάτων που προήλθαν από τη στερεή καλλιέργεια των στρεπτομυκήτων OL 13 (A), OL 28 (B), OL 80 (Γ) και GRE 25 (Δ) σε σχέση με το μη εμβολιασμένο θρεπτικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε σαν αρνητικός μάρτυρας (E).

3.6.1.3. Κλασμάτωση μίγματος μεταβολιτών

Το μίγμα των μεταβολιτών που προέκυψε από την εκχύλιση του στερεού θρεπτικού υποστρώματος τόσο της καθαρής όσο και της μικτής καλλιέργειας των τεσσάρων παραπάνω στρεπτομυκήτων διαχωρίστηκε σε δύο κλάσματα με βάση το μοριακό βάρος των συστατικών του (§2.7.2). Καθένα από τα δύο κλάσματα, αφού συμπυκνώθηκε, εξετάστηκε ως προς την ικανότητά του να παρεμποδίζει την ανάπτυξη του φυτοπαθογόνου μύκητα *Rhizoctonia solani* DSM843.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το κλάσμα, το οποίο περιείχε τις ενώσεις μικρού μοριακού βάρους, δεν εκδήλωσε καμία αντιμυκητιακή δραστηριότητα, ενώ το κλάσμα που περιείχε τις μεγαλομοριακές ενώσεις προκαλούσε τον σχηματισμό ζώνης αναστολής της ανάπτυξης του μύκητα (Πίνακας 3.32).

Πίνακας 3.32. Αντιμυκητιακή δραστηριότητα κλασμάτων των εκχυλισμάτων στερεής καλλιέργειας των επιλεγμένων στρεπτομυκήτων [(-) : ανικανότητα αναστολής της ανάπτυξης των εξεταζόμενων μυκήτων, (+) : ικανότητα αναστολής της ανάπτυξης των εξεταζόμενων μυκήτων]

| Στελέχη
στρεπτομυκήτων | Αντιμυκητιακή δράση έναντι του φυτοπαθογόνου μύκητα
<i>Rhizoctonia solani</i> DSM843 | |
|---------------------------|---|---|
| | Κλάσμα ενώσεων μικρού
μοριακού βάρους | Κλάσμα ενώσεων μεγάλου
μοριακού βάρους |
| OL 13 | - | + |
| OL 28 | - | + |
| OL 80 | - | + |
| GRE 25 | - | + |

Η ίδια συμπεριφορά καταγράφηκε και από τα αντίστοιχα κλάσματα που προήλθαν από τις καθарές καλλιέργειες των στρεπτομυκήτων OL 13, OL 28, OL 80, GRE 25.

3.6.2. Βιοενεργότητα εκχυλισμάτων καλλιεργειών στρεπτομυκήτων εναντίον του *Fusarium oxysporum* DSM62059

3.6.2.1. Βιοενεργότητα εκχυλισμάτων από υγρή καλλιέργεια των επιλεγμένων στρεπτομυκήτων εναντίον του φυτοπαθογόνου μύκητα *Fusarium oxysporum* DSM62059

Τα εκχυλίσματα που προέκυψαν από την υγρή καλλιέργεια των επιλεγμένων στρεπτομυκήτων (§2.7.1) δεν είχαν την ικανότητα να αναστείλουν την ανάπτυξη του φυτοπαθογόνου μύκητα *Fusarium oxysporum* DSM62059, ακόμα και μετά την συμπύκνωσή τους.

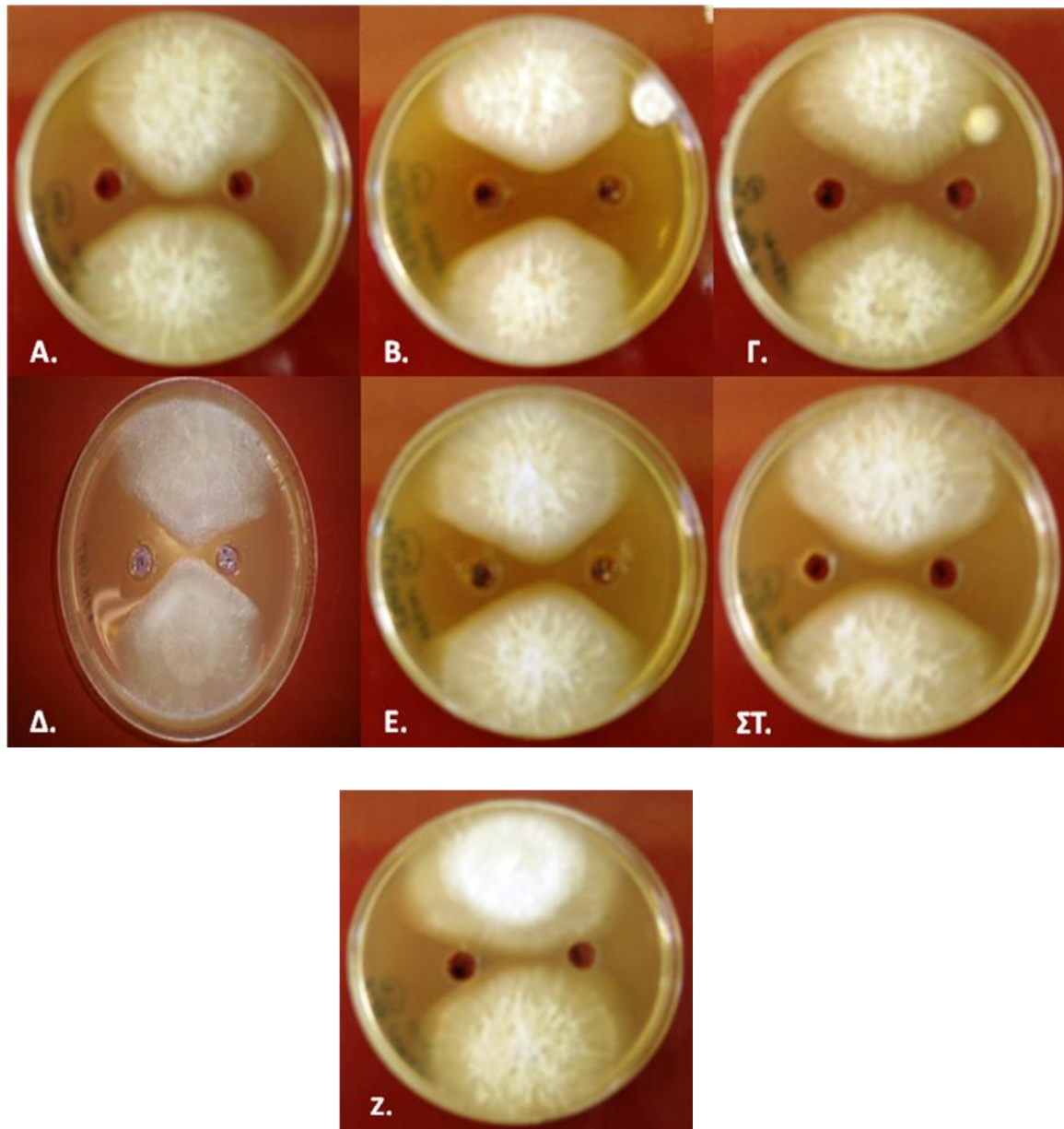
3.6.2.2. Βιοενεργότητα εκχυλισμάτων από στερεή καλλιέργεια των επιλεγμένων στρεπτομυκήτων εναντίον του φυτοπαθογόνου μύκητα *Fusarium oxysporum* DSM62059

Τα εκχυλίσματα των στερεών καλλιεργειών των στρεπτομυκήτων OL 7, OL 13, OL 28, OL 80, GRE 25 και AMO 58 (§2.7.1) μετά από συμπύκνωση (10:1) μπόρεσαν να αναστείλουν την ανάπτυξη του μύκητα. Από αυτά, τα OL 7 και AMO 58 επέδειξαν μικρή ικανότητα αναστολής, ενώ τα υπόλοιπα ισχυρότατη (Πίνακας 3.33, Εικόνα 3.42).

Με σκοπό να μελετηθεί αν η παρουσία του μύκητα-στόχου επηρεάζει τον μεταβολισμό των στρεπτομυκήτων και απαιτείται προκειμένου αυτοί να παράγουν αντιμυκητιακές ουσίες, εξετάστηκε η ικανότητα του εκχυλίσματος καθαρής στερεής καλλιέργειας καθενός από τα τέσσερα παραπάνω βακτήρια να αναστέλλει την ανάπτυξη του μύκητα. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι και αυτά τα δείγματα, μετά τη συμπύκνωσή τους προκάλεσαν έντονη ανάσχεση της ανάπτυξης του μυκηλίου του *Fusarium oxysporum* DSM62059, απόλυτα συγκρίσιμη με αυτή που προκάλεσαν τα εκχυλίσματα των μικτών καλλιεργειών που παρουσιάστηκαν παραπάνω.

Πίνακας 3.33. Αντιμυκητιακή δραστηριότητα εκχυλισμάτων υγρής και στερεής καλλιέργειας των επιλεγμένων στρεπτομυκήτων [(-) : ανικανότητα αναστολής της ανάπτυξης των εξεταζόμενων μυκήτων, (+): ασθενής ικανότητα αναστολής της ανάπτυξης των εξεταζόμενων μυκήτων, (++) : ισχυρή ικανότητα αναστολής της ανάπτυξης των εξεταζόμενων μυκήτων]

| Στελέχη
στρεπτομυκήτων | Αντιμυκητιακή δράση έναντι του φυτοπαθογόνου μύκητα
<i>Fusarium oxysporum</i> DSM62059 | |
|---------------------------|---|--|
| | Εκχύλισμα υγρής καλλιέργειας | Εκχύλισμα στερεής καλλιέργειας
(καθαρής και μικτής) |
| M 5 | - | - |
| M 33 | - | - |
| OL 7 | - | + |
| OL 13 | - | ++ |
| OL 28 | - | ++ |
| OL 80 | - | ++ |
| REA 17 | - | - |
| REA 64 | - | - |
| GRE 24/1 Α | - | - |
| GRE 25 | - | ++ |
| CR 14 | - | - |
| AMO 58 | - | + |



Εικόνα 3.42. Αντιμυκητιακή ικανότητα των εκχυλισμάτων που προήλθαν από τη στερεή καλλιέργεια των στρεπτομυκήτων OL 7 (Α), OL 13 (Β), OL 28 (Γ), OL 80 (Δ), GRE 25 (Ε) και AMO 58 (ΣΤ) σε σχέση με τον μάρτυρα (Ζ)

3.6.2.3. Κλασμάτωση μίγματος μεταβολιτών

Το μίγμα των μεταβολιτών που προέκυψε από την εκχύλιση του στερεού θρεπτικού υποστρώματος τόσο της καθαρής όσο και της μικτής καλλιέργειας των στρεπτομυκήτων OL 7, OL 13, OL 28, OL 80, GRE 25 και AMO 58 διαχωρίστηκε σε δύο κλάσματα με βάση το μοριακό βάρος των συστατικών του (§2.7.2). Καθένα από τα δύο κλάσματα, αφού συμπυκνώθηκε, εξετάστηκε ως προς την ικανότητά του να

παρεμποδίζει την ανάπτυξη του φυτοπαθογόνου μύκητα *Fusarium oxysporum* DSM62059.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, τόσο το κλάσμα των μικρομοριακών όσο και αυτό των μεγαλομοριακών μεταβολιτών των στελεχών OL 7, OL 13, OL 28, OL 80, GRE 25 και AMO 58 επέδειξε αντιμυκητιακή δράση (Πίνακας 3.34).

Πίνακας 3.34. Αντιμυκητιακή δραστηριότητα κλασμάτων των εκχυλισμάτων στερεής καλλιέργειας των επιλεγμένων στρεπτομυκήτων [(-) : ανικανότητα αναστολής της ανάπτυξης των εξεταζόμενων μυκήτων, (+) : ικανότητα αναστολής της ανάπτυξης των εξεταζόμενων μυκήτων]

| Στελέχη
στρεπτομυκήτων | Αντιμυκητιακή δράση έναντι του φυτοπαθογόνου μύκητα <i>Fusarium oxysporum</i> DSM62059 | |
|---------------------------|--|--------------------------------|
| | Κλάσμα μικρού μοριακού βάρους | Κλάσμα μεγάλου μοριακού βάρους |
| OL 7 | + | + |
| OL 13 | + | + |
| OL 28 | + | + |
| OL 80 | + | + |
| GRE 25 | + | + |
| AMO 58 | + | + |

Οι ίδιες παρατηρήσεις προέκυψαν από την εξέταση της βιοενεργότητας των αντίστοιχων κλασμάτων, στα οποία διαχωρίστηκαν οι μεταβολίτες που εκχυλίστηκαν από την καθαρή στερεή καλλιέργεια των στρεπτομυκήτων OL 7, OL 13, OL 28, OL 80, GRE 25 και AMO 58.

3.7. ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΔΡΑΣΗ ΒΙΟΕΝΕΡΓΩΝ ΥΔΑΤΙΚΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΕΝΑΝΤΙΟΝ ΚΟΙΝΩΝ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΩΝ ΔΕΙΚΤΩΝ

Το ένα από τα βιοενεργά υδατικά εκχυλίσματα από τη στερεή καλλιέργεια των υπό εξέταση στρεπτομυκήτων (GRE 25, Εικόνα 3.43) ήταν ικανό να αναστείλει την ανάπτυξη όλων των μικροβιακών δεικτών που χρησιμοποιήθηκαν κατά την εφαρμογή της μεθόδου, όπως αυτή περιγράφηκε στην παράγραφο 2.7.5 του Κεφαλαίου 2, ενώ τα υπόλοιπα διατήρησαν την αντιμυκητιακή δράση τους μόνο έναντι των εξεταζόμενων φυτοπαθογόνων μυκήτων.

Το γεγονός αυτό υποδηλώνει το ευρύ αντιμικροβιακό φάσμα της δράσης των βιοενεργών ουσιών που παράγονται από τον GRE 25 σε αντίθεση με το φάσμα δράσης των υπόλοιπων αντιμυκητιακών μεταβολιτών, των οποίων η δράση παρουσιάζει αυστηρή εξειδίκευση ως προς τους μύκητες οι οποίοι προκάλεσαν την παραγωγή τους.



Εικόνα 3.43. Ικανότητα αναστολής της ανάπτυξης κοινού μικροβιακού δείκτη (*E.coli*) από το βιοενεργό υδατικό εκχύλισμα από τη στερεή καλλιέργεια του στρεπτομύκητα GRE 25

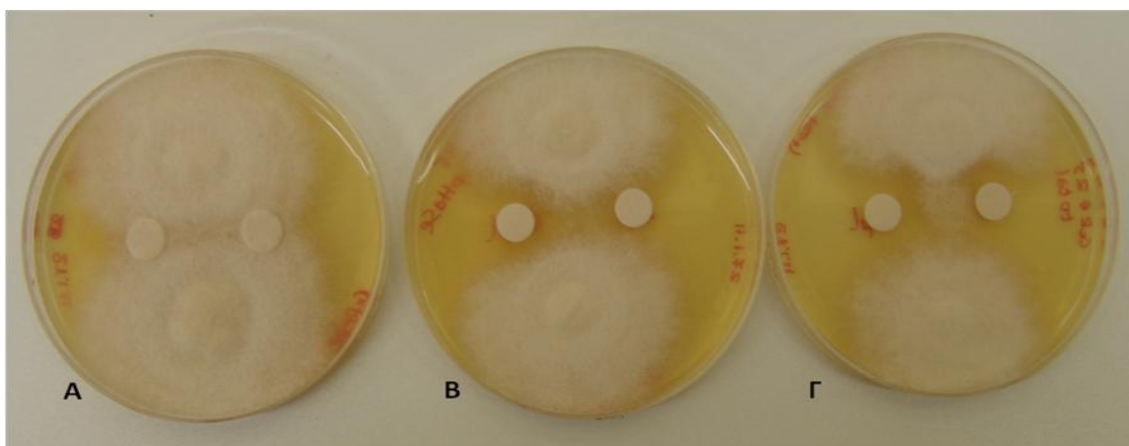
3.8. ΑΝΤΙΜΥΚΗΤΙΑΚΗ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΕΝΩΝ ΣΕ ΟΞΙΚΟ ΑΙΘΥΛΕΣΤΕΡΑ ΚΑΙ ΜΕΘΑΝΟΛΗ (ΟΡΓΑΝΙΚΟΙ ΔΙΑΛΥΤΕΣ)

Το εκχύλισμα των μεταβολιτών που παράγουν οι επιλεγμένοι στρεπτομύκητες, όταν αυτοί καλλιεργηθούν σε στερεή καλλιέργεια, διαχωρίστηκε σε δύο κλάσματα. Στο ένα περιλαμβάνονταν οι μεταβολίτες, οι οποίοι διαλύονται σε οξικό αιθυλεστέρα ή

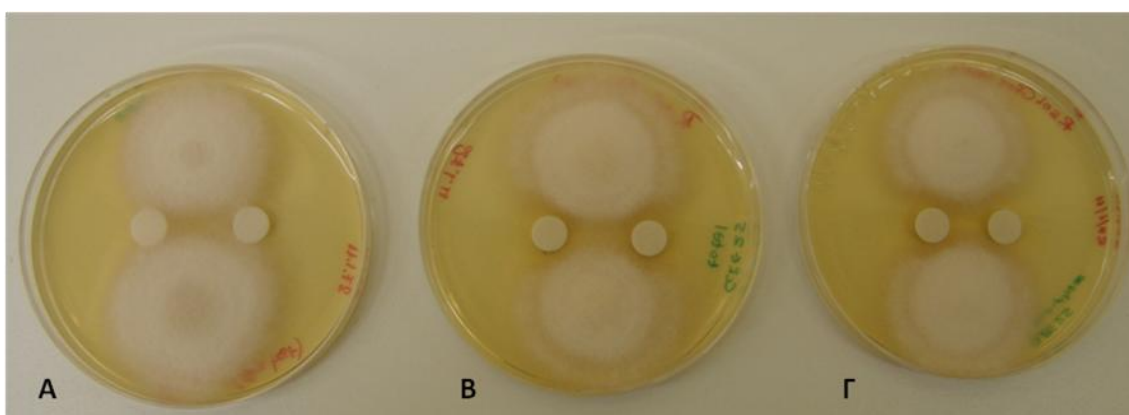
μεθανόλη (οργανική φάση), ενώ στο δεύτερο κλάσμα περιέχονταν οι υδατοδιαλυτές ενώσεις που παράγουν οι μικροοργανισμοί (υδατική φάση) (§2.7.3, §2.7.4).

Και οι δύο φάσεις ανά επεξεργασία (οργανική φάση / οξικός αιθυλεστέρας – υδατική φάση, οργανική φάση / μεθανόλη – υδατική φάση), αφού συμπυκνώθηκαν, ελέγχθηκαν ως προς την αντιμυκητιακή τους ικανότητα.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η αντιμυκητιακή δράση διατηρούνταν στην υδατική φάση κάθε επεξεργασίας αλλά χανόταν στην οργανική. Το συμπέρασμα ήταν ότι οι μεταβολίτες που παράγονται από τους επιλεγμένους στρεπτομύκητες και οι οποίοι διαλύονται σε οργανικούς διαλύτες δεν μπορούν να αναστείλουν την ανάπτυξη κανενός από τους δύο εξεταζόμενους μύκητες και ότι ο ισχυρός αντιμυκητιακός χαρακτήρας που εκδηλώνουν οι επιλεγμένοι μικροοργανισμοί οφείλεται σε υδατοδιαλυτές ενώσεις που αυτοί παράγουν (Εικόνα 3.44, Εικόνα 3.45).



Εικόνα 3.44. Αντιμυκητιακή ικανότητα εκχυλισμάτος σε οξικό αιθυλεστέρα. Α. Οργανική φάση (Οξικός αιθυλεστέρας), Β. Υδατική φάση, Γ. Συνολικό εκχύλισμα



Εικόνα 3.45. Αντιμυκητιακή ικανότητα εκχυλισμάτος σε οξικό αιθυλεστέρα. Α. Οργανική φάση (Μεθανόλη), Β. Υδατική φάση, Γ. Συνολικό εκχύλισμα

Το αποτέλεσμα αυτό προσφέρει επιπλέον στοιχεία για τη χημική φύση της ουσίας ή των ουσιών που σχετίζονται με την αντιμυκητιακή δράση των στρεπτομυκήτων που διερευνώνται ως πιθανοί παράγοντες βιοελέγχου, ενώ παράλληλα παρέχει στοιχεία απαραίτητα για την επιλογή της καταλληλότερης αναλυτικής μεθόδου για τη συνέχεια των πειραμάτων στο πλαίσιο της προσπάθειας μελέτης και απομόνωσης του αντιμυκητιακού μεταβολίτη.

3.9. ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ ΤΗΣ ΑΥΞΗΣΗΣ ΤΩΝ ΦΥΤΟΠΑΘΟΓΟΝΩΝ ΜΥΚΗΤΩΝ ΑΠΟ ΣΤΕΛΕΧΗ ΣΤΡΕΠΤΟΜΥΚΗΤΩΝ *IN VIVO*

Παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του ελέγχου της ικανότητας των επιλεγμένων στρεπτομυκήτων να προστατεύουν φυτά από τους εξεταζόμενους φυτοπαθογόνους μύκητες, *in vivo*.

3.9.1. *In vivo* ικανότητα βιοελέγχου του μύκητα *Rhizoctonia solani* DSM843 από στελέχη στρεπτομυκήτων

Οι στρεπτομύκητες GRE 24/1 Λ, REA 17, GRE 25, OL 13, OL 80, AMO 580 επιλέχθηκαν για τον έλεγχο της ικανότητάς τους να εκφράζουν τον αντιμυκητιακό τους χαρακτήρα *in vivo*, προστατεύοντας φυτά φασολιάς. Η επιλογή αυτή βασίστηκε στο γεγονός ότι οι στρεπτομύκητες αυτοί, εκτός του ότι έδειξαν τον πιο ισχυρό ανταγωνιστικό χαρακτήρα *in vitro*, έδειξαν και την καλύτερη συμπεριφορά ως πιθανοί παράγοντες βιοελέγχου στις δοκιμασίες βιοχημικής ανάλυσης της αντιμυκητιακής τους δραστηριότητας. Τα ευρήματα αυτά, σε συνδυασμό και με τα αποτελέσματα παλαιότερων μελετών (Baur και συνεργάτες, 2006 και Paululat και συνεργάτες, 2008 και 2010), που υποστήριζαν την έντονη πολυπαραγωγική σε βιοενεργές ενώσεις φύση τους, οδήγησαν στον χαρακτηρισμό τους ως υποσχόμενων παραγόντων βιοελέγχου.

Στο πλαίσιο των *in vivo* δοκιμασιών, εξετάστηκε η ικανότητα των στρεπτομυκήτων να εμποδίζουν την ανάπτυξη του φυτοπαθογόνου μύκητα *Rhizoctonia solani*

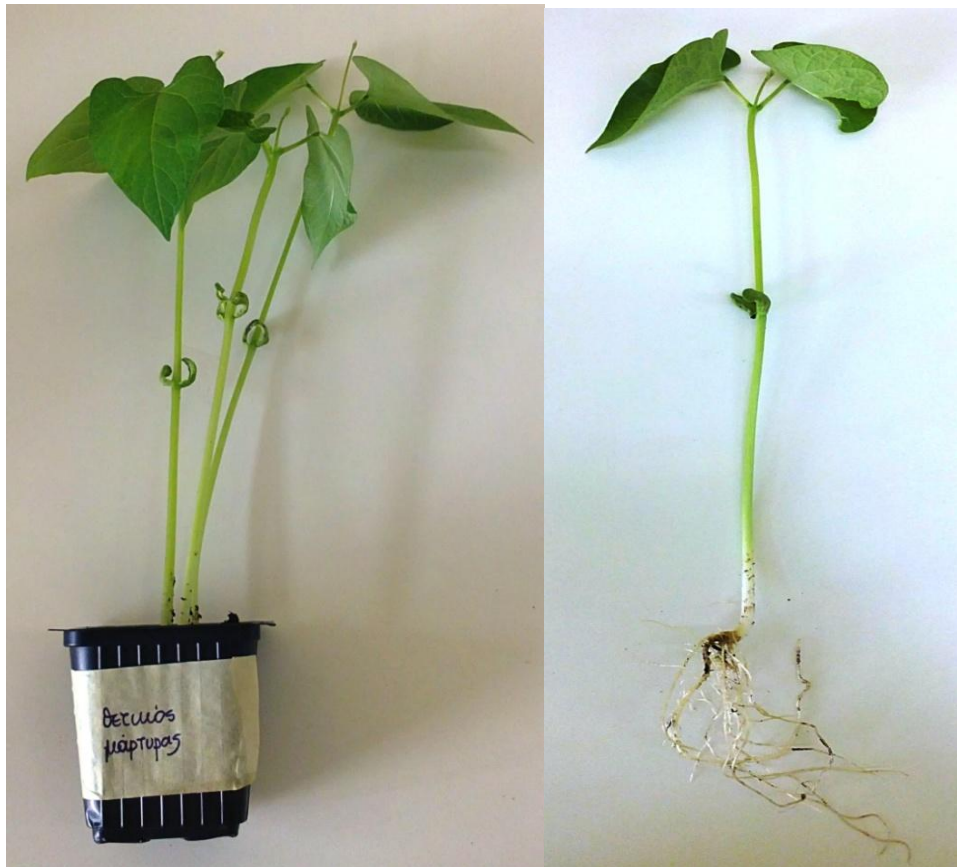
DSM843 και την εκδήλωση της παθογένειάς του σε σπόρους φασολιάς που αναπτύσσονται σε αποστειρωμένο και μη έδαφος, σύμφωνα με τη μεθοδολογία που περιγράφηκε στο Κεφάλαιο 2 (§2.8.6). Επίσης, διερευνήθηκε ο τρόπος εφαρμογής των εξεταζόμενων παραγόντων βιοελέγχου.

Τα πρώτα αποτελέσματα από μακροσκοπικές παρατηρήσεις των παραπάνω πολλαπλών σειρών πειραμάτων δείχνουν την αναστολή της ανάπτυξης του μύκητα στο έδαφος, το οποίο απουσία των στρεπτομυκήτων εμφανώς καταλάμβανε το μεγαλύτερο μέρος του χρησιμοποιούμενου εδάφους.

3.9.1.1. Διερεύνηση της ικανότητας βιοελέγχου του μύκητα *Rhizoctonia solani* DSM843 *in vivo* από στελέχη στρεπτομυκήτων, σε αποστειρωμένο χώμα

Στα πειράματα που διεξήχθησαν σε αποστειρωμένο και μολυσμένο με τον φυτοπαθογόνο μύκητα *Rhizoctonia solani* DSM843 χώμα, ο αριθμός των σπόρων φασολιάς που κατάφεραν να φυτρώσουν παρουσία των εξεταζόμενων παραγόντων βιοελέγχου ήταν σαφώς υψηλότερος από τον αριθμό των σπόρων φασολιάς που φύτεψαν σε αποστειρωμένο και μολυσμένο έδαφος απουσία παραγόντων βιοελέγχου.

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων από τις δοκιμασίες που χρησιμοποιήθηκαν ως θετικοί μάρτυρες, έδειξε πολύ υψηλή απόδοση φύτεψης σπόρων φασολιάς σε αποστειρωμένο χώμα, απαλλαγμένο από οποιονδήποτε παθογόνο παράγοντα αλλά και οποιονδήποτε από τους εξεταζόμενους παράγοντες βιοελέγχου. Σε αυτές τις συνθήκες αναπτύχθηκε σχεδόν το 80 % των σπόρων που φυτεύτηκαν και τα φυτά που αναπτύχθηκαν ήταν υγιή και απέδωσαν υψηλές τιμές στις παραμέτρους που μετρήθηκαν (ύψος και βάρος φυτού) (Εικόνα 3.46). Αντίθετα, οι αρνητικοί μάρτυρες, δηλαδή οι σπόροι φασολιού που φυτεύτηκαν σε αποστειρωμένο έδαφος μολυσμένο από τον *Rhizoctonia solani* DSM843, κατά κύριο λόγο δεν κατάφεραν καν να φυτρώσουν (το ποσοστό φύτεψης δεν κατάφερε να αγγίξει το 3 %) και τα ελάχιστα φυτά που αναπτύχθηκαν ήταν αδύναμα με έκδηλα τα συμπτώματα της παθογένειας του μύκητα (Εικόνα 3.47). Η εφαρμογή των υποψήφιων παραγόντων βιοελέγχου, γενικά, διόρθωσε όλες τις παραμέτρους που προσδιορίστηκαν σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα, χωρίς όμως να φτάνει τις αντίστοιχες τιμές του θετικού μάρτυρα.



Εικόνα 3.46. Φυτά που φύτρωσαν από σπόρους φασολιάς, που φυτεύτηκαν σε αποστειρωμένο χώμα, απαλλαγμένο από οποιονδήποτε παθογόνο παράγοντα αλλά και οποιονδήποτε από τους εξεταζόμενους παράγοντες βιοελέγχου (Θετικός Μάρτυρας)



Εικόνα 3.47. Φυτά που φύτρωσαν από μη επεξεργασμένους σπόρους φασολιάς, που φυτεύτηκαν σε αποστειρωμένο έδαφος, μολυσμένο από τον *Rhizoctonia solani* DSM843 (Αρνητικός Μάρτυρας)

Συγκεκριμένα, οι σπόροι που καλύφθηκαν πριν τη φύτευσή τους με σπόρια του στρεπτομύκητα GRE 24/1 Λ, φύτρωσαν σε ποσοστό 40,3 %, επιτυγχάνοντας τον υπερδεκαπλασιασμό του ποσοστού που προέκυψε από τον αρνητικό μάρτυρα και φτάνοντας περίπου το μισό του θετικού. Εξετάζοντας, ως παραμέτρους φύτευσης, το βάρος και το ύψος των φυτών που αναπτύχθηκαν, δείχθηκε ότι η παραπάνω επεξεργασία με τον παράγοντα βιοελέγχου οδήγησε σε φυτά αρκετά μικρότερων διαστάσεων σε σύγκριση με τον θετικό μάρτυρα, αλλά σε κάθε περίπτωση αρκετά δυνατά και με μειωμένα τα σημάδια της παθογένειας του μύκητα, σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα (Εικόνα 3.49, 3.50, 3.51).

Όταν ο εξεταζόμενος παράγοντας βιοελέγχου GRE 24/1 Λ εφαρμόστηκε απευθείας στο μολυσμένο με τον *Rhizoctonia solani* DSM843 έδαφος, η απόδοση της φύτευσης των σπόρων φασολιού ήταν και πάλι πολύ μεγαλύτερη από αυτή του αρνητικού μάρτυρα αλλά ελαφρώς μικρότερη από αυτή που προέκυψε όταν τα σπόρια του Στρεπτομύκητα εφαρμόστηκαν πάνω στους σπόρους του φυτού. Ωστόσο, όσα φυτά αναπτύχθηκαν, είχαν εικόνα αντίστοιχη των φυτών που προήλθαν από επεξεργασμένους σπόρους, όπως επιβεβαιώνουν και οι τιμές του βάρους και του ύψους τους αλλά και οι μακροσκοπικές παρατηρήσεις (Εικόνα 3.48).

Από την εξέταση του στρεπτομύκητα REA 17, ως παράγοντα βιοελέγχου, προέκυψε ότι και αυτός κατάφερε να αυξήσει πάρα πολύ το ποσοστό φύτευσης των σπόρων που είχαν καλυφθεί με σπόριά του. Η ικανότητα φύτευσης άγγιξε το 35 %, ενώ τα φυτά που αναπτύχθηκαν ήταν και πάλι μικρών διαστάσεων αλλά υγιή και δυνατά.

Όταν το διάλυμα σπορίων του REA 17 εφαρμόστηκε στο έδαφος και όχι επάνω στους σπόρους του φυτού το ποσοστό φύτευσης μειώθηκε φτάνοντας μόλις το 21 %. Η απόδοση αυτή, ωστόσο, εξακολουθεί να είναι πολλαπλάσια της απόδοσης του αρνητικού μάρτυρα. Και σε αυτά τα πειράματα, τα φυτά δεν αναπτύχθηκαν αρκετά.

Κατά τη διερεύνηση της ικανότητας του στρεπτομύκητα GRE25 να προστατεύει τους σπόρους του φυτού φασολιάς από τον φυτοπαθογόνο μύκητα *Rhizoctonia solani* DSM843, προέκυψε ότι οι σπόροι που είχαν καλυφθεί με τα σπόρια του στρεπτομύκητα είχαν την ικανότητα να φυτρώνουν σε εξαιρετικά υψηλό ποσοστό (51 %), το οποίο πλησίασε περισσότερο από τους άλλους εξεταζόμενους στρεπτομύκητες το αντίστοιχο του θετικού μάρτυρα. Τα φυτά που αναπτύχθηκαν ήταν μέτριων

διαστάσεων (μέσο ύψος = 3,51 cm) και σχετικά με το ύψος τους δυνατά (μέσο βάρος φυτών = 1,2 g).

Όταν ο στρεπτομύκητας GRE 25 εμπλούτισε, με τη μορφή σπορίων το μολυσμένο από τον φυτοπαθογόνο μύκητα χώμα, στο οποίο είχαν φυτευτεί μη επεξεργασμένοι σπόροι φασολιού, η πολύ ισχυρή αντιμυκητιακή του ικανότητα *in vivo* εκφράστηκε και πάλι. Οι σπόροι που κατάφεραν να επιβιώσουν του μύκητα και να φυτρώσουν ήταν λιγότεροι από την προηγούμενη διαδικασία αλλά σε ποσοστό που έφτανε το 49 %. Αν και τα φυτά που καταμετρήθηκαν ήταν λιγότερα, ήταν περίπου το ίδιο ανεπτυγμένα, όπως εκείνα που αναδύθηκαν από καλυμμένους με τον στρεπτομύκητα σπόρους.

Σχετικά με την επίδραση του στρεπτομύκητα OL 13 στην ανάπτυξη των φυτών φασολιού παρουσία του φυτοπαθογόνου μύκητα *Rhizoctonia solani* DSM843, όταν το βακτήριο κάλυψε τους σπόρους του φυτού, το 31,7 % των σπόρων κατάφερε να φυτρώσει. Στα φυτά, που προέκυψαν το μέσο ύψος τους προσδιορίστηκε στα 3,9 cm και το μέσο βάρος έφτασε τα 1,8 g.

Όταν διάλυμα σπορίων του στελέχους OL 13 εφαρμόστηκε στο μολυσμένο με τον μύκητα έδαφος, η φύτευση των σπόρων φασολιάς ήταν της τάξης του 28 %, χαμηλότερη κατά μόλις 4 % σε σχέση με την προηγούμενη εφαρμογή (κάλυψη σπόρων φυτού) του ίδιου μικροοργανισμού. Οι σπόροι που μπόρεσαν να φυτρώσουν ήταν κατά μέσο όρο σχεδόν οι μισοί σε σχέση με αυτούς του θετικού μάρτυρα και σχεδόν εικοσαπλάσιοι του αρνητικού. Τα φυτά που αναδύθηκαν εμφάνισαν μέτρια ανάπτυξη με το μέσο ύψος τους να φτάνει τα 3,3 cm και το μέσο βάρος τα 1,4 g. Σημειώνεται ότι οι τιμές αυτές των παραμέτρων αύξησης ήταν από τις μεγαλύτερες που προσδιορίστηκαν κατά τη διερεύνηση της *in vivo* αντιμυκητιακής ικανότητας και των άλλων στρεπτομυκήτων.

Κατά την εξέταση του στρεπτομύκητα OL 80, προέκυψε ότι το ποσοστό φύτευσης των επεξεργασμένων σπόρων ήταν το μικρότερο που μετρήθηκε (20,5 %). Τα φυτά που προέκυψαν ήταν σαφώς δυνατότερα και υψηλότερα από τον αρνητικό μάρτυρα (μέσο βάρος = 1,17 g και μέσο ύψος = 2,3 cm) αλλά λιγότερο ανεπτυγμένα σε σχέση με αυτά που προέκυψαν από την επεξεργασία των σπόρων φασολιάς με τους υπόλοιπους εξεταζόμενους στρεπτομυκήτες.

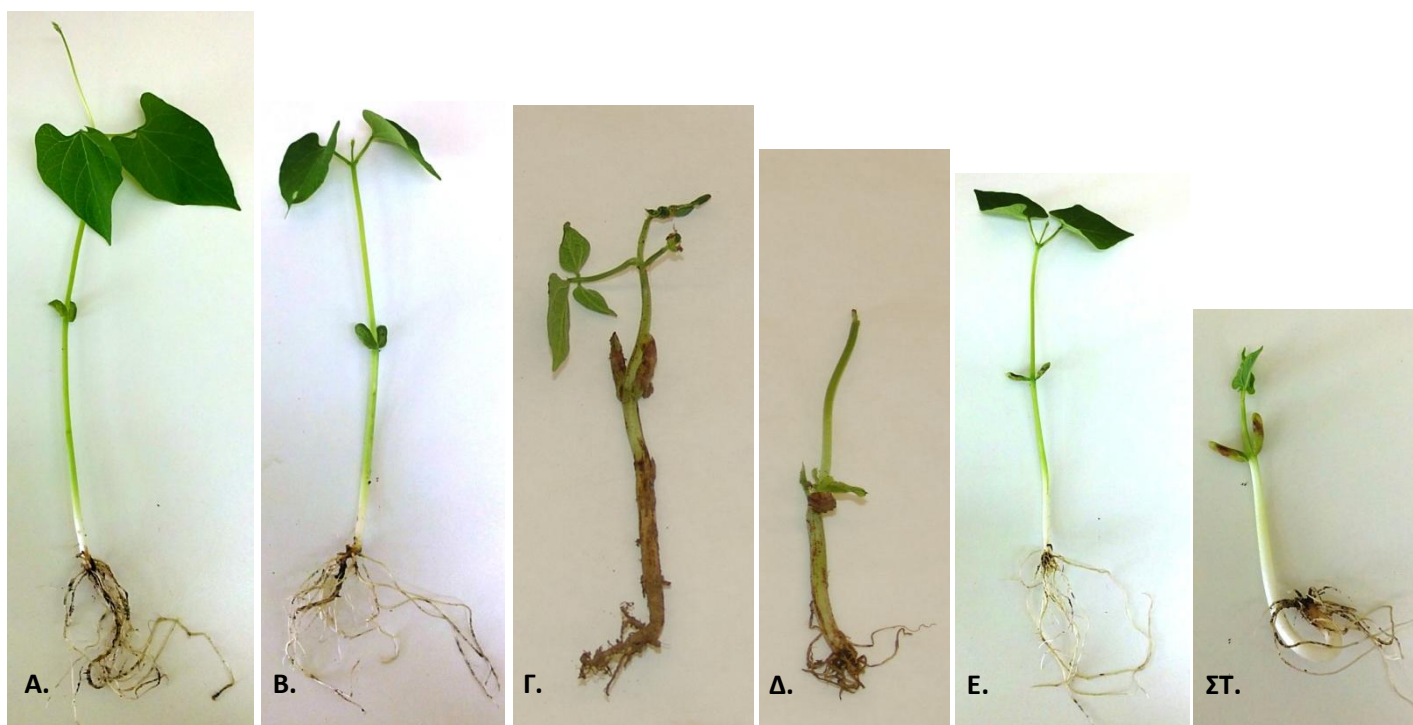
Όταν μη επεξεργασμένοι σπόροι φασολιού φυτεύτηκαν σε αποστειρωμένο χώμα μολυσμένο από τον φυτοπαθογόνο μύκητα, το οποίο είχε εμπλουτιστεί με σπόρια του στελέχους OL 80, το ποσοστό της φύτευσης των σπόρων έφτασε το 43 %, αλλά τα φυτά που σχηματίστηκαν εξακολουθούσαν να είναι ισχνά (μέσο βάρος = 1,1 g) και κοντά (μέσο ύψος = 2,2 cm).

Ο στρεπτομύκητας AMO 58, όταν κάλυπτε με τη μορφή σπορίων την επιφάνεια των σπόρων του εξεταζόμενου φυτού οδήγησε στη φύτευση περίπου του 40 % των σπόρων που φυτεύτηκαν, αποδίδοντας σε φυτά απολύτως υγιή και με μέτρια ανάπτυξη, αφού το μέσο βάρος τους πλησίασε τα 1,6 g και το μέσο ύψος τους τα 3,2 cm.

Όταν διάλυμα σπορίων του ίδιου μικροοργανισμού εφαρμόστηκε σε αποστειρωμένο και μολυσμένο με *Rhizoctonia solani* DSM843 έδαφος, ποσοστό της τάξης του 20 % των σπόρων που φυτεύτηκαν μπόρεσαν να φυτρώσουν. Το ποσοστό αυτό είναι χαμηλό αλλά αρκετά μεγαλύτερο από αυτό του αρνητικού μάρτυρα (σχεδόν τριπλάσιο). Τα φυτά που αναπτύχθηκαν δεν ήταν υγιή, ενώ το μέσο ύψος τους έφτασε τα 2,9 cm και το μέσο βάρος τους τα 0,97 g (Εικόνα 3.48).

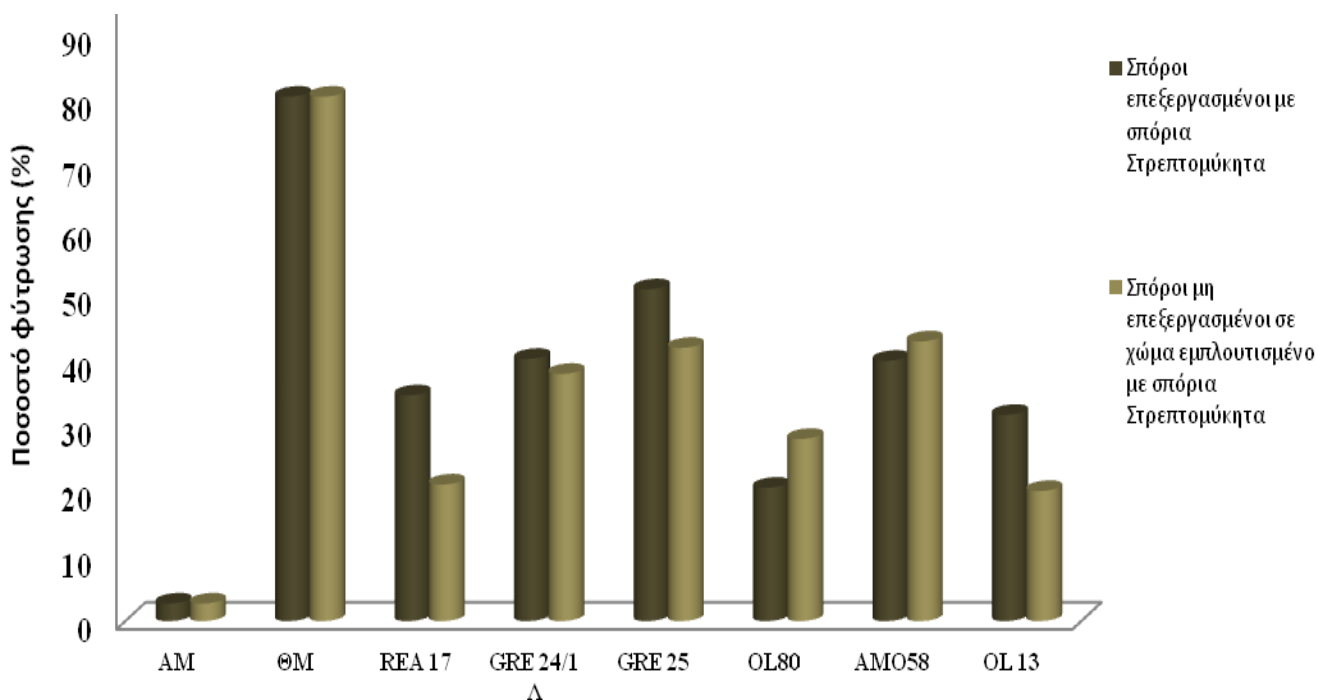
Συγκεντρώνοντας τα αποτελέσματα από τις δοκιμασίες διερεύνησης της ικανότητας επιλεγμένων στρεπτομυκήτων να προστατεύουν σπόρους φασολιάς από την παθογόνο δράση του μύκητα *Rhizoctonia solani* DSM843 με την εφαρμογή τους είτε πάνω στους σπόρους είτε στο χρησιμοποιούμενο αποστειρωμένο έδαφος, προκύπτουν τα παρακάτω γραφήματα (Εικόνα 3.49, 3.50, 3.51).

Ο στρεπτομύκητας GRE 25 δείχθηκε ικανότερος παράγοντας βιοελέγχου, αφού απέδωσε τα υψηλότερα ποσοστά φύτευσης των σπόρων φασολιού παρουσία του φυτοπαθογόνου μύκητα. Οι στρεπτομύκητες REA 17, GRE 24/1 Λ, GRE 25 και OL 13 ήταν αποτελεσματικότεροι στην προστασία των σπόρων του φυτού από τον μύκητα, όταν κάλυψαν την επιφάνεια των σπόρων που φυτεύτηκαν, ενώ οι υπόλοιποι (OL 80 και AMO 58) επέδειξαν ισχυρότερη αντιμυκητιακή δράση *in vivo*, επιτρέποντας σε περισσότερους σπόρους να φυτρώσουν όταν τα σπώριά τους εμπλούτισαν το μολυσμένο με τον μύκητα έδαφος.



Εικόνα 3.48. Φωτογραφιών που απεικονίζουν τον μέσο όρο της εμφάνισης των φυτών που προέκυψαν από σπόρους επεξεργασμένους με τους εξεταζόμενους παράγοντες βιοελέγχου (Α. REA 17, Β. GRE 24/1 Λ, Γ. GRE 25, Δ. OL 13, Ε. OL 80, ΣΤ. AMO 58), όταν φυτεύτηκαν σε αποστειρωμένο χώμα μολυσμένο με τον φυτοπαθογόνο μύκητα *Rhizoctonia solani* DSM843

Από τα συγκεντρωτικά αποτελέσματα, όπως αυτά παρουσιάζονται στην Εικόνα 3.48, φαίνεται ότι τα δυνατότερα φυτά προέκυψαν από σπόρους, που είχαν καλυφθεί με σπόρια του στρεπτομύκητα OL 13. Επίσης, οι στρεπτομύκητες GRE 25 και GRE 24/1 Λ βοήθησαν να αναπτυχθούν αρκετά δυνατά φυτά, ανεξάρτητα με την τεχνική με την οποία τα σπόριά τους χρησιμοποιήθηκαν στις δοκιμασίες. Είτε τοποθετήθηκαν στους σπόρους της φασολιάς είτε στο έδαφος, τα φυτά που αναπτύχθηκαν εμφάνισαν κατά μέσο όρο βάρος με στατιστικά ασήμαντη διαφορά. Ωστόσο, ο τρόπος εφαρμογής των σπορίων των στρεπτομυκήτων REA 17, OL 80 και AMO 58 στο εξεταζόμενο σύστημα φάνηκε να επηρεάζει το βάρος των φυτών φασολιάς, που φύτρωσαν. Οι φασολιές που προέκυψαν από σπόρους καλυμμένους με σπόρια των REA 17 και AMO 58 ήταν δυνατότερες από αυτές που προήλθαν από μη επεξεργασμένους σπόρους σε έδαφος εμποτισμένο με διάλυμα σπορίων τους, ενώ το αντίστροφο αποτέλεσμα ελήφθη από τη μελέτη του OL 80.



Εικόνα 3.49. Επί τοις εκατό ποσοστό φύτρωσης σπόρων φασολιάς σε έδαφος αποστειρωμένο και μολυσμένο με τον φυτοπαθογόνο μύκητα *Rhizoctonia solani* DSM843

AM: Αρνητικός Μάρτυρας – Μη επεξεργασμένοι σπόροι φασολιού, φυτεμένοι σε αποστειρωμένο έδαφος μολυσμένο με τον μύκητα

ΘΜ: Θετικός Μάρτυρας – Μη επεξεργασμένοι σπόροι φασολιού, φυτεμένοι σε αποστειρωμένο έδαφος

REA 17: Σπόροι φασολιού, επεξεργασμένοι με σπόρια του στρεπτομύκητα REA 17, φυτεμένοι σε αποστειρωμένο έδαφος, μολυσμένο με τον μύκητα και σπόροι φασολιού, φυτεμένοι σε αποστειρωμένο έδαφος, μολυσμένο με τον μύκητα και εμπλουτισμένο με σπόρια του στρεπτομύκητα REA 17

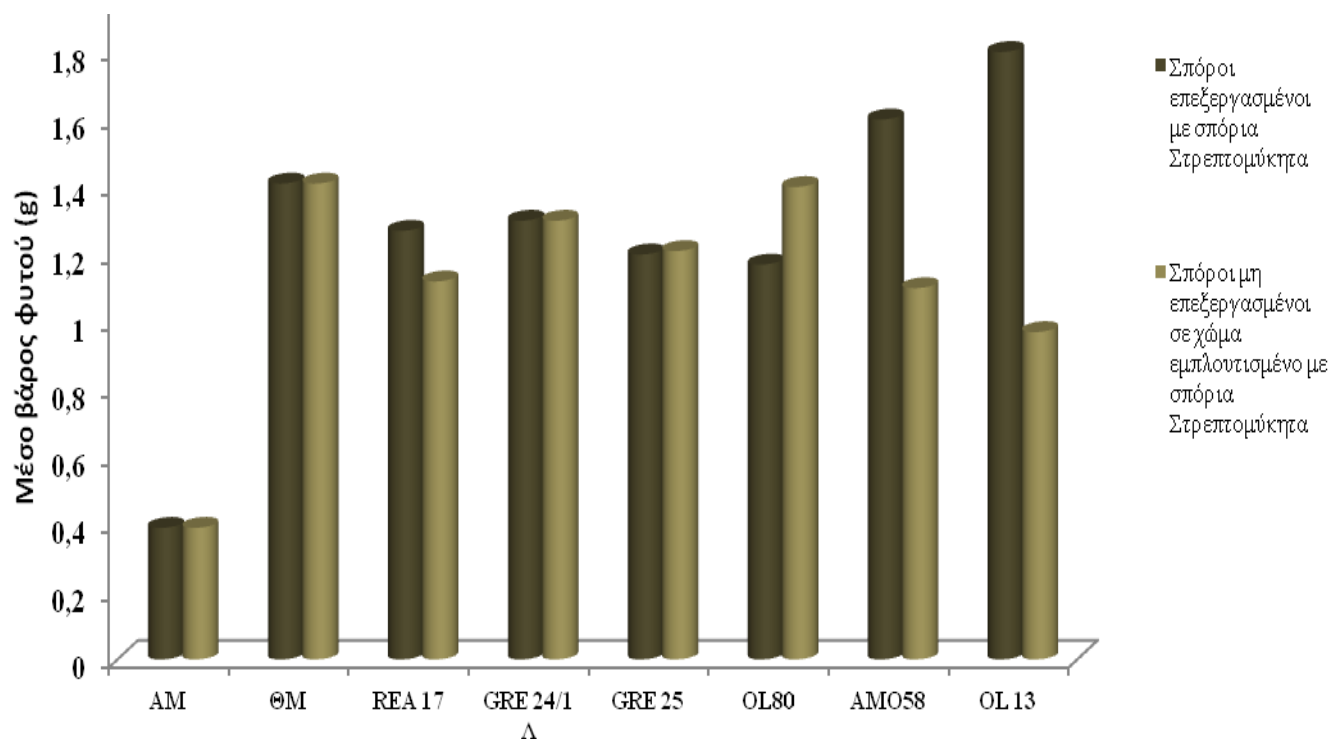
GRE 24/1 Λ: Σπόροι φασολιού, επεξεργασμένοι με σπόρια του στρεπτομύκητα GRE 24/1 Λ, φυτεμένοι σε αποστειρωμένο έδαφος, μολυσμένο με τον μύκητα και σπόροι φασολιού, φυτεμένοι σε αποστειρωμένο έδαφος, μολυσμένο με τον μύκητα και εμπλουτισμένο με σπόρια του στρεπτομύκητα GRE 24/1 Λ

GRE 25: Σπόροι φασολιού, επεξεργασμένοι με σπόρια του στρεπτομύκητα GRE 25, φυτεμένοι σε αποστειρωμένο έδαφος, μολυσμένο με τον μύκητα και σπόροι φασολιού, φυτεμένοι σε αποστειρωμένο έδαφος, μολυσμένο με τον μύκητα και εμπλουτισμένο με σπόρια του στρεπτομύκητα GRE 25

OL 80: Σπόροι φασολιού, επεξεργασμένοι με σπόρια του στρεπτομύκητα OL 80, φυτεμένοι σε αποστειρωμένο έδαφος, μολυσμένο με τον μύκητα και σπόροι φασολιού, φυτεμένοι σε αποστειρωμένο έδαφος, μολυσμένο με τον μύκητα και εμπλουτισμένο με σπόρια του στρεπτομύκητα OL 80

AMO 58: Σπόροι φασολιού, επεξεργασμένοι με σπόρια του στρεπτομύκητα AMO 58, φυτεμένοι σε αποστειρωμένο έδαφος, μολυσμένο με τον μύκητα και σπόροι φασολιού, φυτεμένοι σε αποστειρωμένο έδαφος, μολυσμένο με τον μύκητα και εμπλουτισμένο με σπόρια του στρεπτομύκητα AMO 58

OL 13: Σπόροι φασολιού, επεξεργασμένοι με σπόρια του στρεπτομύκητα OL 13, φυτεμένοι σε αποστειρωμένο έδαφος, μολυσμένο με τον μύκητα και σπόροι φασολιού, φυτεμένοι σε αποστειρωμένο έδαφος, μολυσμένο με τον μύκητα και εμπλουτισμένο με σπόρια του στρεπτομύκητα OL 13.



Εικόνα 3.50. Μέσο βάρος σπόρων φασολιάς σε έδαφος αποστειρωμένο και μολυσμένο με τον φυτοπαθογόνο μύκητα *Rhizoctonia solani* DSM843

AM: Αρνητικός Μάρτυρας – Μη επεξεργασμένοι σπόροι φασολιού, φυτεμένοι σε αποστειρωμένο έδαφος, μολυσμένο με τον μύκητα

ΘΜ: Θετικός Μάρτυρας – Μη επεξεργασμένοι σπόροι φασολιού, φυτεμένοι σε αποστειρωμένο έδαφος

REA 17: Σπόροι φασολιού, επεξεργασμένοι με σπόρια του στρεπτομύκητα REA 17, φυτεμένοι σε αποστειρωμένο έδαφος, μολυσμένο με τον μύκητα και σπόροι φασολιού, φυτεμένοι σε αποστειρωμένο έδαφος, μολυσμένο με τον μύκητα και εμπλουτισμένο με σπόρια του στρεπτομύκητα REA 17

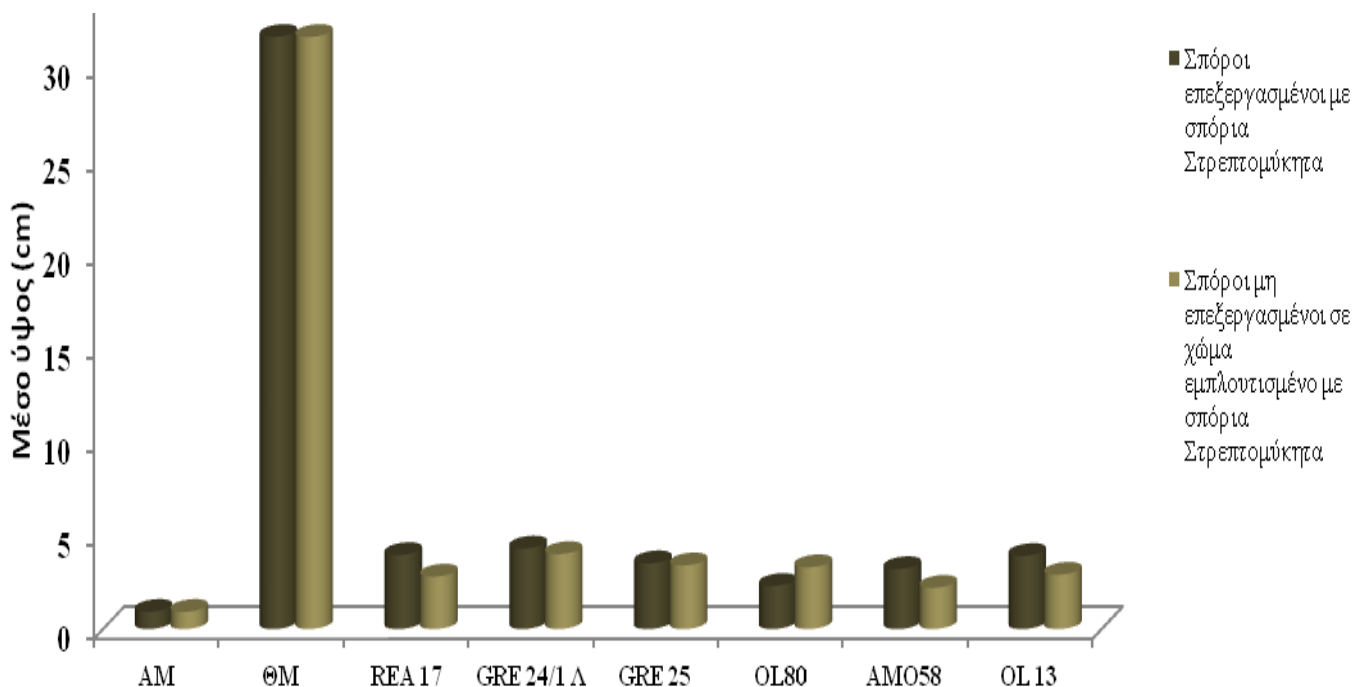
GRE 24/1 Λ: Σπόροι φασολιού, επεξεργασμένοι με σπόρια του στρεπτομύκητα GRE 24/1 Λ, φυτεμένοι σε αποστειρωμένο έδαφος, μολυσμένο με τον μύκητα και σπόροι φασολιού, φυτεμένοι σε αποστειρωμένο έδαφος, μολυσμένο με τον μύκητα και εμπλουτισμένο με σπόρια του στρεπτομύκητα GRE 24/1 Λ

GRE 25: Σπόροι φασολιού, επεξεργασμένοι με σπόρια του στρεπτομύκητα GRE 25, φυτεμένοι σε αποστειρωμένο έδαφος, μολυσμένο με τον μύκητα και σπόροι φασολιού, φυτεμένοι σε αποστειρωμένο έδαφος, μολυσμένο με τον μύκητα και εμπλουτισμένο με σπόρια του στρεπτομύκητα GRE 25

OL 80: Σπόροι φασολιού, επεξεργασμένοι με σπόρια του στρεπτομύκητα OL 80, φυτεμένοι σε αποστειρωμένο έδαφος, μολυσμένο με τον μύκητα και σπόροι φασολιού, φυτεμένοι σε αποστειρωμένο έδαφος, μολυσμένο με τον μύκητα και εμπλουτισμένο με σπόρια του στρεπτομύκητα OL 80

AMO 58: Σπόροι φασολιού, επεξεργασμένοι με σπόρια του στρεπτομύκητα AMO 58, φυτεμένοι σε αποστειρωμένο έδαφος, μολυσμένο με τον μύκητα και σπόροι φασολιού, φυτεμένοι σε αποστειρωμένο έδαφος, μολυσμένο με τον μύκητα και εμπλουτισμένο με σπόρια του στρεπτομύκητα AMO 58

OL 13: Σπόροι φασολιού, επεξεργασμένοι με σπόρια του στρεπτομύκητα OL 13, φυτεμένοι σε αποστειρωμένο έδαφος, μολυσμένο με τον μύκητα και σπόροι φασολιού, φυτεμένοι σε αποστειρωμένο έδαφος, μολυσμένο με τον μύκητα και εμπλουτισμένο με σπόρια του στρεπτομύκητα OL 13



Εικόνα 3.51. Μέσο ύψος φυτών φασολιάς σε έδαφος αποστειρωμένο και μολυσμένο με τον φυτοπαθογόνο μύκητα *Rhizoctonia solani* DSM843

AM: Αρνητικός Μάρτυρας – Μη επεξεργασμένοι σπόροι φασολιού, φυτεμένοι σε αποστειρωμένο έδαφος, μολυσμένο με τον μύκητα

ΘΜ: Θετικός Μάρτυρας – Μη επεξεργασμένοι σπόροι φασολιού, φυτεμένοι σε αποστειρωμένο έδαφος

REA 17: Σπόροι φασολιού, επεξεργασμένοι με σπόρια του στρεπτομύκητα REA 17, φυτεμένοι σε αποστειρωμένο έδαφος, μολυσμένο με τον μύκητα και σπόροι φασολιού, φυτεμένοι σε αποστειρωμένο έδαφος, μολυσμένο με τον μύκητα και εμπλουτισμένο με σπόρια του στρεπτομύκητα REA 17

GRE 24/1 Λ: Σπόροι φασολιού, επεξεργασμένοι με σπόρια του στρεπτομύκητα GRE 24/1 Λ, φυτεμένοι σε αποστειρωμένο έδαφος, μολυσμένο με τον μύκητα και σπόροι φασολιού, φυτεμένοι σε αποστειρωμένο έδαφος, μολυσμένο με τον μύκητα και εμπλουτισμένο με σπόρια του στρεπτομύκητα GRE 24/1 Λ

GRE 25: Σπόροι φασολιού, επεξεργασμένοι με σπόρια του στρεπτομύκητα GRE 25, φυτεμένοι σε αποστειρωμένο έδαφος, μολυσμένο με τον μύκητα και σπόροι φασολιού, φυτεμένοι σε αποστειρωμένο έδαφος, μολυσμένο με τον μύκητα και εμπλουτισμένο με σπόρια του στρεπτομύκητα GRE 25

OL 80: Σπόροι φασολιού, επεξεργασμένοι με σπόρια του στρεπτομύκητα OL 80, φυτεμένοι σε αποστειρωμένο έδαφος, μολυσμένο με τον μύκητα και σπόροι φασολιού, φυτεμένοι σε αποστειρωμένο έδαφος, μολυσμένο με τον μύκητα και εμπλουτισμένο με σπόρια του στρεπτομύκητα OL 80

AMO 58: Σπόροι φασολιού, επεξεργασμένοι με σπόρια του στρεπτομύκητα AMO 58, φυτεμένοι σε αποστειρωμένο έδαφος, μολυσμένο με τον μύκητα και σπόροι φασολιού, φυτεμένοι σε αποστειρωμένο έδαφος, μολυσμένο με τον μύκητα και εμπλουτισμένο με σπόρια του στρεπτομύκητα AMO 58

OL 13: Σπόροι φασολιού, επεξεργασμένοι με σπόρια του στρεπτομύκητα OL 13, φυτεμένοι σε αποστειρωμένο έδαφος, μολυσμένο με τον μύκητα και σπόροι φασολιού, φυτεμένοι σε αποστειρωμένο έδαφος, μολυσμένο με τον μύκητα και εμπλουτισμένο με σπόρια του στρεπτομύκητα OL 13

Το ύψος των φυτών φασολιάς, που αναπτύχθηκαν σε αποστειρωμένο έδαφος, μολυσμένο με τον φυτοπαθογόνο μύκητα *Rhizoctonia solani* DSM843, δεν επηρεάστηκε από τον τρόπο εφαρμογής των σπορίων του στρεπτομύκητα GRE 25 στο εξεταζόμενο σύστημα. Αντίθετα, σπόροι φασολιού, επεξεργασμένοι με σπόρια των στρεπτομυκήτων REA 17, OL 13 και AMO 58, απέδωσαν φυτά ψηλότερα από σπόρους μη επεξεργασμένους, φυτεμένους σε έδαφος εμπλουτισμένο με σπόρια των ίδιων στρεπτομυκήτων. Το ίδιο αλλά λιγότερο έντονο αποτέλεσμα προέκυψε από τη μελέτη της επίδρασης του στρεπτομύκητα GRE 24/1 Λ, ενώ τα φυτά που φύτευαν σε έδαφος, που περιείχε σπόρια του στρεπτομύκητα OL80 ήταν ψηλότερα από εκείνα που προήλθαν από σπόρους επεξεργασμένους σε διάλυμα σπορίων του βακτηρίου αυτού.

3.9.1.2. Διερεύνηση της ικανότητας βιοελέγχου του μύκητα *Rhizoctonia solani* DSM843 *in vivo* από στελέχη στρεπτομυκήτων, σε μη αποστειρωμένο χώμα

Στα πειράματα που διεξήχθησαν χώμα ίδιας σύστασης με αυτό που χρησιμοποιήθηκε στις προηγούμενες δοκιμασίες αλλά μη αποστειρωμένο και μολυσμένο με τον φυτοπαθογόνο μύκητα *Rhizoctonia solani* DSM843, ο αριθμός των σπόρων φασολιάς που κατάφεραν να φυτρώσουν παρουσία των εξεταζόμενων παραγόντων βιοελέγχου ήταν υψηλότερος σε σχέση με τον αριθμό των σπόρων φασολιάς που φύτευαν σε μη αποστειρωμένο και μολυσμένο έδαφος απουσία παραγόντων βιοελέγχου αλλά και γενικά υψηλότερος σε σχέση με την απόδοση φύτευσης που μετρήθηκε από την εφαρμογή των εξεταζόμενων στρεπτομυκήτων σε αποστειρωμένο και μολυσμένο χώμα.

Στα δοχεία που χρησιμοποιήθηκαν ως θετικοί μάρτυρες (μη επεξεργασμένοι σπόροι σε μη αποστειρωμένο έδαφος) η απόδοση φύτευσης σπόρων φασολιάς ήταν πολύ υψηλή και κατά περίπου 7 % υψηλότερη από την απόδοση της φύτευσης του θετικού μάρτυρα σε αποστειρωμένο χώμα. Στη συνέχεια της σύγκρισης των θετικών μαρτύρων των πειραμάτων σε αποστειρωμένο και μη αποστειρωμένο έδαφος, τα φυτά που αναδύθηκαν στη δεύτερη περίπτωση ήταν μεγαλύτερα, αφού κατά μέσο όρο το βάρος τους ήταν υπερδιπλάσιο των πρώτων (Εικόνα 3.52). Επίσης, τα φυτά που μεγάλωσαν σε μη αποστειρωμένο χώμα ήταν κατά μέσο όρο περίπου 5 cm ψηλότερα. Αντίθετα, οι αρνητικοί μάρτυρες, όπου σπόροι φασολιού τοποθετήθηκαν

σε μη αποστειρωμένο έδαφος, μολυσμένο από τον *Rhizoctonia solani* DSM843, έδωσαν ακριβώς τα ίδια αποτελέσματα φύτευσης με τους αρνητικούς μάρτυρες των πειραμάτων σε αποστειρωμένο χώμα. Σε μη αποστειρωμένο έδαφος, η παθογένεια του μύκητα έπληξε το σύνολο των σπόρων που χρησιμοποιήθηκαν, μην επιτρέποντας τη φύτευση ποσοστού άνω του 97 % αυτών και προκαλώντας έντονα συμπτώματα στα ελάχιστα φυτά που αναπτύχθηκαν. Οι ρίζες των φυτών αυτών είχαν έκδηλα τα συμπτώματα της παθογένειας του μύκητα, εμφανίζοντας σκούρο καφετί χρωματισμό και αλλοίωση του ιστού (Εικόνα 3.53).



Εικόνα 3.52. Δείγμα φυτών φασολιάς, που φύτευσαν από σπόρους φασολιάς, που φυτεύτηκαν σε μη αποστειρωμένο χώμα, απαλλαγμένο από οποιονδήποτε παθογόνο παράγοντα αλλά και οποιονδήποτε από τους εξεταζόμενους παράγοντες βιοελέγχου (Θετικός Μάρτυρας)



Εικόνα 3.53. Δείγμα φυτών φασολιάς, που φύτρωσαν από μη επεξεργασμένους σπόρους φασολιάς, που φυτεύτηκαν σε μη αποστειρωμένο έδαφος, μολυσμένο από τον *Rhizoctonia solani* DSM843 (Αρνητικός Μάρτυρας)

Η χρήση των επιλεγμένων στρεπτομυκίτων γενικά διόρθωσε κατά πολύ όλες τις μετρούμενες παραμέτρους σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα, οδηγώντας σε τιμές πιο κοντά στις αντίστοιχες τιμές του θετικού. Επιπλέον, σε μη αποστειρωμένο χώμα και παρουσία των υποψήφιων παραγόντων βιοελέγχου, τα φυτά αναπτύχθηκαν κατά πολύ καλύτερα συγκριτικά με τα αυτά των αντίστοιχων δοκιμασιών σε αποστειρωμένο έδαφος (Εικόνα 3.54).

Συγκεκριμένα και αναλυτικότερα, οι σπόροι που καλύφθηκαν πριν τη φύτευσή τους με σπόρια του στρεπτομύκητα GRE 24/1 Λ, φύτρωσαν σε ποσοστό 26,4 %. Αν και το αποτέλεσμα της φύτευσης, παρόλο που είναι θετικό σε σύγκριση με τον αρνητικό μάρτυρα, δεν είναι πολύ υψηλό, ωστόσο το βάρος και το ύψος των φυτών που αναπτύχθηκαν ήταν πολύ μεγάλο, εφάμιλλο του βάρους και του ύψους των φυτών του θετικού μάρτυρα.

Όταν ο εξεταζόμενος παράγοντας βιοελέγχου GRE 24/1 Λ εφαρμόστηκε απευθείας στο μολυσμένο με τον *Rhizoctonia solani* DSM843 έδαφος, η απόδοση της φύτευσης των σπόρων φασολιού ήταν μικρότερη από αυτήν της προηγούμενης δοκιμασίας. Τα φυτά που αναπτύχθηκαν είχαν την πολύ καλή εικόνα των φυτών που προήλθαν από επεξεργασμένους σπόρους, όπως επιβεβαιώνουν και οι τιμές του βάρους και του ύψους τους αλλά και οι μακροσκοπικές παρατηρήσεις.

Η κάλυψη των σπόρων του φυτού-στόχου με σπόρια του στρεπτομύκητα REA 17 δείχθηκε ότι ήταν σε θέση να αυξήσει πολύ το ποσοστό φύτευσης των σπόρων σε μολυσμένο, μη αποστειρωμένο χώμα. Το 44 % των επεξεργασμένων σπόρων

φύτρωσαν και τα φυτά που αναπτύχθηκαν έμοιαζαν πολύ στα φυτά του θετικού μάρτυρα, καθώς το μέσο βάρος τους υπολογίστηκε στα 2,75 g και το μέσο ύψος τους στα 35,8 cm.

Όταν το διάλυμα σπορίων του REA 17 εμπλούτισε το μη αποστειρωμένο και μολυσμένο χώμα, το ποσοστό φύτευσης μειώθηκε σε σχέση με την προηγούμενη διαδικασία, αφού υπολογίστηκε σε 26 %. Και σε αυτές τις δοκιμασίες, τα φυτά αναπτύχθηκαν ικανοποιητικά, με τις εξεταζόμενες παραμέτρους αύξησης να δίνουν τιμές αντίστοιχες της προηγούμενης διαδικασίας αλλά και του θετικού μάρτυρα.

Αναλύοντας τα αποτελέσματα της επίδρασης του στρεπτομύκητα GRE 25 στην καταπολέμηση του φυτοπαθογόνου μύκητα *Rhizoctonia solani* DSM843 σε μη αποστειρωμένο έδαφος, προέκυψε ότι οι σπόροι που είχαν καλυφθεί με τα σπόρια του στρεπτομύκητα είχαν την ικανότητα να φυτρώνουν σε ποσοστό υψηλότερο όσων υπολογίστηκαν (75 %). Τα φυτά που αναπτύχθηκαν ήταν μεγάλων διαστάσεων (μέσο ύψος = 33,52 cm) και δυνατά (μέσο βάρος φυτών = 2,44 g).

Όταν στο μη αποστειρωμένο έδαφος χορηγήθηκε διάλυμα σπορίων του στελέχους GRE 25, περισσότεροι από τους μισούς μη επεξεργασμένους σπόρους που είχαν φυτευτεί κατάφεραν να αναδυθούν. Τα φυτά που καταμετρήθηκαν ήταν λιγότερα σε σχέση με την προηγούμενη διαδικασία εφαρμογής του στρεπτομύκητα, αλλά ήταν πολύ ανεπτυγμένα, με μέσο ύψος που ξεπερνούσε τα 40 cm και μέσο βάρος της τάξης των 2,9 g.

Σπόροι φασολιού, καλυμμένοι με σπόρια του στρεπτομύκητα OL 13, ανέστειλαν την παθογόνο δράση του *Rhizoctonia solani* DSM843, έχοντας σαν αποτέλεσμα την φύτευση του 44 % των σπόρων που φυτεύτηκαν. Στα φυτά που προέκυψαν το μέσο ύψος τους μετρήθηκε στα 28,75 cm και το μέσο βάρος έφτασε τα 2,8 g.

Τα αποτελέσματα από τον εμπλουτισμό του μη αποστειρωμένου χώματος με διάλυμα σπορίων του στελέχους OL 13 έδειξαν ότι το 40 % των μη επεξεργασμένων σπόρων φύτευσε, δίνοντας φυτά μέσου ύψους 36,33 cm και μέσου βάρους 3,4 g.

Κατά την εξέταση του στρεπτομύκητα OL 80, προέκυψε ότι το ποσοστό φύτευσης των επεξεργασμένων σπόρων έφτασε το 22,2 %. Στα φυτά που προέκυψαν μετρήθηκαν τιμές παραμέτρων φύτευσης από τις χαμηλότερες αλλά σε κάθε

περίπτωση καλύτερες από αυτές των αρνητικών μαρτύρων, αφού το μέσο βάρος τους υπολογίστηκε ίσο με 1,57 g και το μέσο ύψος ίσο με 23 cm).

Όταν μη επεξεργασμένοι σπόροι φασολιού φυτεύτηκαν σε αποστειρωμένο χώμα, μολυσμένο από τον φυτοπαθογόνο μύκητα, το οποίο είχε εμπλουτιστεί με σπόρια του στελέχους OL 80, το ποσοστό της φύτευσης των σπόρων έφτασε το 54 %, αλλά τα φυτά που σχηματίστηκαν εξακολουθούσαν να παρουσιάζουν μέτρια ανάπτυξη με μέσο βάρος ίσο με 1,51 g και μέσο ύψος ίσο με 16,6 cm).

Σπόροι φασολιού καλυμμένοι με σπόρια του στρεπτομύκητα AMO 58 φύτευσαν σε ποσοστό περίπου του 41,6 % και η ανάπτυξη των φυτών που προέκυψαν κρίθηκε ικανοποιητική, αφού το μέσο βάρος τους υπολογίστηκε στα 2,86 g και το μέσο ύψος τους τα 32,6 cm.

Όταν διάλυμα σπορίων του ίδιου μικροοργανισμού εφαρμόστηκε σε μη αποστειρωμένο και επιπλέον μολυσμένο με τον μύκητα έδαφος, το 37 % των σπόρων που φυτεύτηκαν μπόρεσε να φυτρώσει. Τα συγκριτικά λιγότερα φυτά που αναπτύχθηκαν και εξετάστηκαν ήταν μικρά (μέσο ύψος = 24 cm), αδύναμα (μέσο βάρος = 1,1 g) και εμφανώς επηρεασμένα από την παθογόνο δράση του μύκητα (Εικόνα 3.54).

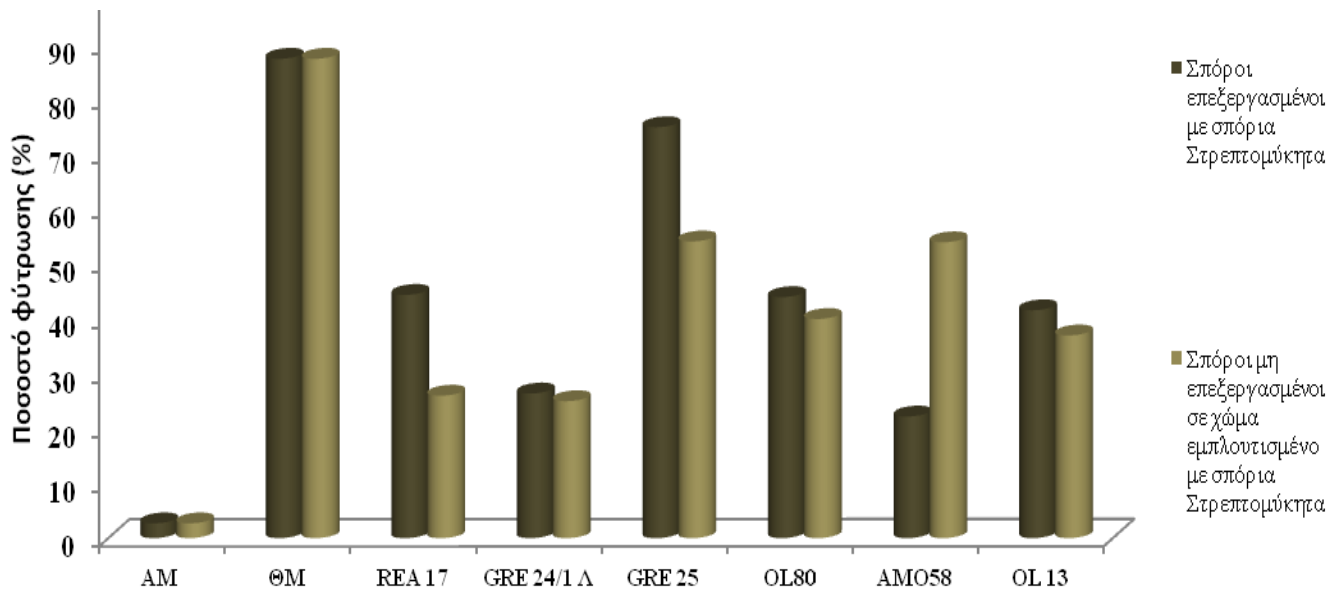
Συγκεντρώνοντας τα αποτελέσματα από τις δοκιμασίες διερεύνησης της ικανότητας επιλεγμένων στρεπτομυκήτων να προστατεύουν σπόρους φασολιάς από την παθογόνο δράση του μύκητα *Rhizoctonia solani* DSM843 με την εφαρμογή τους είτε πάνω στους σπόρους είτε στο χρησιμοποιούμενο μη αποστειρωμένο έδαφος, προκύπτουν τα παρακάτω γραφήματα. (Εικόνα 3.55 – 3.57).

Με μοναδική εξαίρεση τον στρεπτομύκητα AMO 58, όλοι οι υπόλοιποι μικροοργανισμοί (REA 17, GRE 25, GRE 24/1 Λ, OL 13 και OL 80) ήταν πιο αποτελεσματικοί ως παράγοντες βιοελέγχου του *Rhizoctonia solani* DSM843, όταν κάλυψαν τους σπόρους φασολιάς πριν τη φύτευσή τους. Αυτοί οι σπόροι κατάφεραν να φυτρώσουν σε μεγαλύτερο ποσοστό συγκριτικά με μη επεξεργασμένους σπόρους, οι οποίοι τοποθετήθηκαν σε μη αποστειρωμένο και μολυσμένο με τον φυτοπαθογόνο μύκητα, όπου οι παραπάνω εξεταζόμενοι παράγοντες βιοελέγχου είχαν ενεθεί με τη μορφή διαλύματος σπορίων. Αντίθετα, με τη μορφή αυτή, ο στρεπτομύκητας AMO 58 κατάφερε να προστατέψει και να οδηγήσει στη φύτευση σημαντικά

περισσότερους σπόρους φασολιάς, παρά όταν τα σπόριά του εφαρμόστηκαν στην επιφάνεια των σπόρων.



Εικόνα 3.54. Δείγματα φωτογραφιών που απεικονίζουν τον μέσο όρο της εμφάνισης των φυτών που προέκυψαν από σπόρους επεξεργασμένους με τους εξεταζόμενους παράγοντες βιοελέγχου (Α. REA 17, Β. GRE 24/1 Λ, Γ. GRE 25, Δ. OL 13, Ε. OL 80, ΣΤ. AMO 58), όταν φυτεύτηκαν σε μη αποστειρωμένο χώμα μολυσμένο με τον φυτοπαθογόνο μύκητα *Rhizoctonia solani* DSM843



Εικόνα 3.55. Επί τοις εκατό ποσοστό φύτευσης σπόρων φασολιάς σε έδαφος μη αποστειρωμένο και μολυσμένο με τον φυτοπαθογόνο μύκητα *Rhizoctonia solani* DSM843
 AM: Αρνητικός Μάρτυρας – Μη επεξεργασμένοι σπόροι φασολιού, φυτεμένοι σε μη αποστειρωμένο έδαφος μολυσμένο με τον μύκητα

ΘΜ: Θετικός Μάρτυρας – Μη επεξεργασμένοι σπόροι φασολιού, φυτεμένοι σε μη αποστειρωμένο έδαφος

REA 17: Σπόροι φασολιού, επεξεργασμένοι με σπόρια του στρεπτομύκητα REA 17, φυτεμένοι σε μη αποστειρωμένο έδαφος, μολυσμένο με τον μύκητα και σπόροι φασολιού, φυτεμένοι σε μη αποστειρωμένο έδαφος, μολυσμένο με τον μύκητα και εμπλουτισμένο με σπόρια του στρεπτομύκητα REA 17

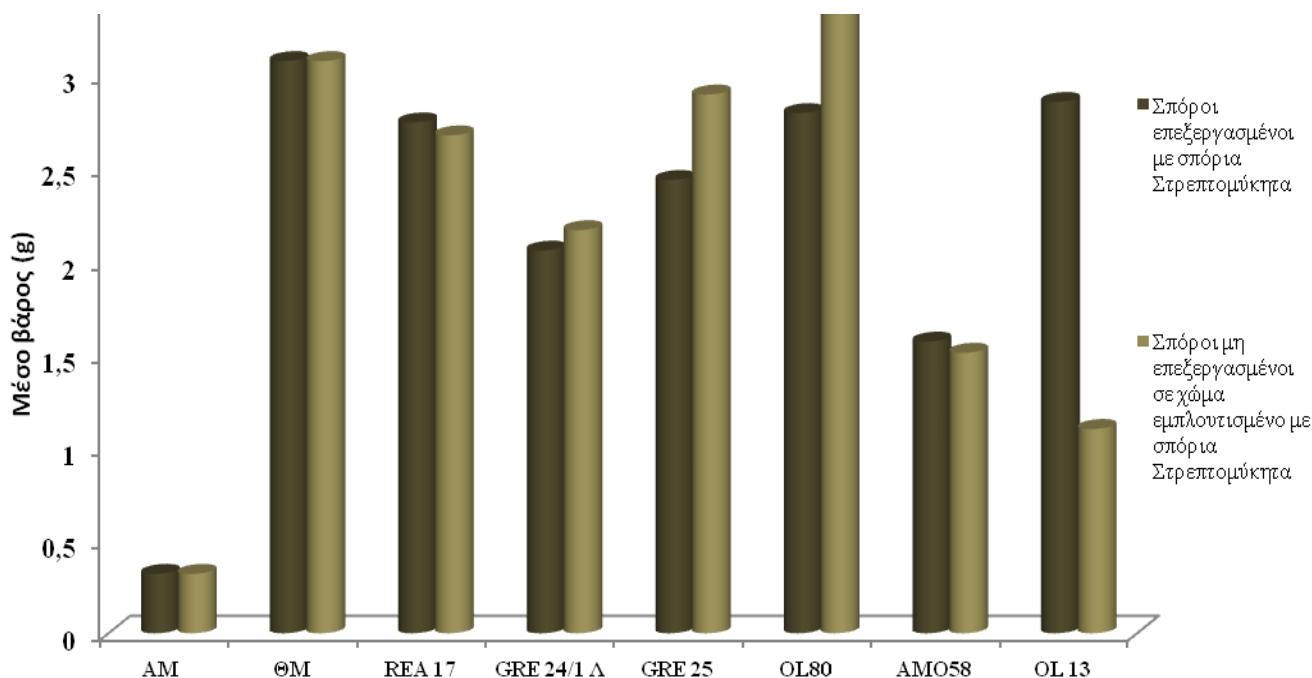
GRE 24/1 Λ: Σπόροι φασολιού, επεξεργασμένοι με σπόρια του στρεπτομύκητα GRE 24/1 Λ, φυτεμένοι σε μη αποστειρωμένο έδαφος, μολυσμένο με τον μύκητα και σπόροι φασολιού, φυτεμένοι σε μη αποστειρωμένο έδαφος, μολυσμένο με τον μύκητα και εμπλουτισμένο με σπόρια του στρεπτομύκητα GRE 24/1 Λ

GRE 25: Σπόροι φασολιού, επεξεργασμένοι με σπόρια του στρεπτομύκητα GRE 25, φυτεμένοι σε μη αποστειρωμένο έδαφος, μολυσμένο με τον μύκητα και σπόροι φασολιού, φυτεμένοι σε μη αποστειρωμένο έδαφος, μολυσμένο με τον μύκητα και εμπλουτισμένο με σπόρια του στρεπτομύκητα GRE 25

OL 80: Σπόροι φασολιού, επεξεργασμένοι με σπόρια του στρεπτομύκητα OL 80, φυτεμένοι σε μη αποστειρωμένο έδαφος, μολυσμένο με τον μύκητα και σπόροι φασολιού, φυτεμένοι σε μη αποστειρωμένο έδαφος, μολυσμένο με τον μύκητα και εμπλουτισμένο με σπόρια του στρεπτομύκητα OL 80

AMO 58: Σπόροι φασολιού, επεξεργασμένοι με σπόρια του στρεπτομύκητα AMO 58, φυτεμένοι σε μη αποστειρωμένο έδαφος, μολυσμένο με τον μύκητα και σπόροι φασολιού, φυτεμένοι σε μη αποστειρωμένο έδαφος, μολυσμένο με τον μύκητα και εμπλουτισμένο με σπόρια του στρεπτομύκητα AMO 58

OL 13: Σπόροι φασολιού, επεξεργασμένοι με σπόρια του στρεπτομύκητα OL 13, φυτεμένοι σε μη αποστειρωμένο έδαφος, μολυσμένο με τον μύκητα και σπόροι φασολιού, φυτεμένοι σε μη αποστειρωμένο έδαφος, μολυσμένο με τον μύκητα και εμπλουτισμένο με σπόρια του στρεπτομύκητα OL 13



Εικόνα 3.56. Μέσο βάρος φυτών φασολιάς που αναπτύχθηκαν σε έδαφος μη αποστειρωμένο και μολυσμένο με τον φυτοπαθογόνο μύκητα *Rhizoctonia solani* DSM843

AM: Αρνητικός Μάρτυρας – Μη επεξεργασμένοι σπόροι φασολιού, φυτεμένοι σε μη αποστειρωμένο έδαφος, μολυσμένο με τον μύκητα

ΘΜ: Θετικός Μάρτυρας – Μη επεξεργασμένοι σπόροι φασολιού, φυτεμένοι σε μη αποστειρωμένο έδαφος

REA 17: Σπόροι φασολιού, επεξεργασμένοι με σπόρια του στρεπτομύκητα REA 17, φυτεμένοι σε μη αποστειρωμένο έδαφος, μολυσμένο με τον μύκητα και σπόροι φασολιού, φυτεμένοι σε μη αποστειρωμένο έδαφος, μολυσμένο με τον μύκητα και εμπλουτισμένο με σπόρια του στρεπτομύκητα REA 17

GRE 24/1 Λ: Σπόροι φασολιού, επεξεργασμένοι με σπόρια του στρεπτομύκητα GRE 24/1 Λ, φυτεμένοι σε μη αποστειρωμένο έδαφος, μολυσμένο με τον μύκητα και σπόροι φασολιού, φυτεμένοι σε μη αποστειρωμένο έδαφος, μολυσμένο με τον μύκητα και εμπλουτισμένο με σπόρια του στρεπτομύκητα GRE 24/1 Λ

GRE 25: Σπόροι φασολιού, επεξεργασμένοι με σπόρια του στρεπτομύκητα GRE 25, φυτεμένοι σε μη αποστειρωμένο έδαφος, μολυσμένο με τον μύκητα και σπόροι φασολιού, φυτεμένοι σε μη αποστειρωμένο έδαφος, μολυσμένο με τον μύκητα και εμπλουτισμένο με σπόρια του στρεπτομύκητα GRE 25

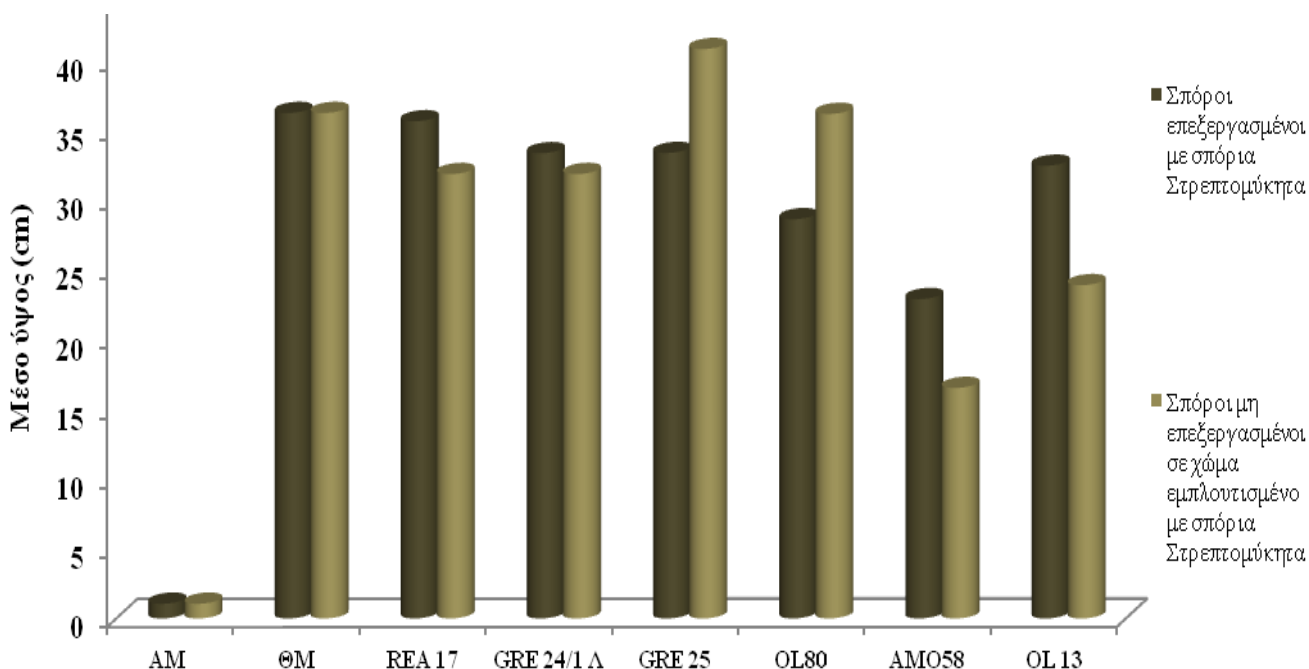
OL 80: Σπόροι φασολιού, επεξεργασμένοι με σπόρια του στρεπτομύκητα OL 80, φυτεμένοι σε μη αποστειρωμένο έδαφος, μολυσμένο με τον μύκητα και σπόροι φασολιού, φυτεμένοι σε μη αποστειρωμένο έδαφος, μολυσμένο με τον μύκητα και εμπλουτισμένο με σπόρια του στρεπτομύκητα OL 80

AMO 58: Σπόροι φασολιού, επεξεργασμένοι με σπόρια του στρεπτομύκητα AMO 58, φυτεμένοι σε μη αποστειρωμένο έδαφος, μολυσμένο με τον μύκητα και σπόροι φασολιού, φυτεμένοι σε μη αποστειρωμένο έδαφος, μολυσμένο με τον μύκητα και εμπλουτισμένο με σπόρια του στρεπτομύκητα AMO 58

OL 13: Σπόροι φασολιού, επεξεργασμένοι με σπόρια του στρεπτομύκητα OL 13, φυτεμένοι σε μη αποστειρωμένο έδαφος, μολυσμένο με τον μύκητα και σπόροι φασολιού, φυτεμένοι σε μη αποστειρωμένο έδαφος, μολυσμένο με τον μύκητα και εμπλουτισμένο με σπόρια του Στρεπτομύκητα OL 13

Οι στρεπτομύκητες REA 17, OL 13 και AMO 58 γενικά οδήγησαν σε δυνατότερα φυτά, όταν εφαρμόστηκαν απευθείας πάνω στους σπόρους φασολιάς παρά όταν εφαρμόστηκαν στο έδαφος, με τη μορφή σπορίων. Ωστόσο, η διαφορά αυτή ήταν ασήμαντη όσον αφορά στους REA 17 και AMO 58 αλλά αξιοσημείωτη όσον αφορά στον στρεπτομύκητα OL 13. Σχετικά με τους υπόλοιπους στρεπτομύκητες (GRE 24/1 Λ, GRE 25 και OL 80), τα δυνατότερα φυτά, και μάλιστα με σημαντική διαφορά, προέκυψαν, όταν οι εξεταζόμενοι μικροοργανισμοί εμπλούτισαν με τη μορφή διαλύματος σπορίων το μη αποστειρωμένο και μολυσμένο με τον *Rhizoctonia solani* DSM843 έδαφος.

Οι τέσσερις από τους έξι επιλεγμένους στρεπτομύκητες, δηλαδή τα στελέχη με την κωδική ονομασία REA 17, GRE 24/1 Λ, AMO 58 και OL 13 έδειξαν ότι, όταν τα σπόριά τους χρησιμοποιήθηκαν για την επεξεργασία των σπόρων φασολιάς πριν τη φύτευση, τα φυτά που αναπτύσσονταν ήταν ψηλότερα από όταν τα σπόριά τους χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση της μικροχλωρίδας του χώματος στα οποία φυτεύτηκαν. Ειδικά κατά την εξέταση της δράσης των στρεπτομυκήτων AMO 58 και OL 13 η διαφορά αυτή καταγράφηκε ως πολύ σημαντική. Οι Στρεπτομύκητες GRE 25 και OL 80 εκδήλωσαν εντελώς διαφορετική συμπεριφορά. Στις δοκιμασίες κατά τις οποίες το διάλυμα σπορίων τους εμπλούτισε το μη αποστειρωμένο έδαφος, που είχε μολυνθεί από τον φυτοπαθογόνο μύκητα, τα φυτά φασολιάς που αναπτύχθηκαν ήταν κατά πολύ ψηλότερα από τα φυτά που προήλθαν από σπόρους επεξεργασμένους με σπόριά τους και είχαν εκ των υστέρων φυτευθεί σε μη αποστειρωμένο και επιβαρυνμένο με τον μύκητα έδαφος.



Εικόνα 3.57. Μέσο ύψος φυτών φασολιάς που αναπτύχθηκαν σε έδαφος μη αποστειρωμένο και μολυσμένο με τον φυτοπαθογόνο μύκητα *Rhizoctonia solani* DSM843

AM: Αρνητικός Μάρτυρας – Μη επεξεργασμένοι σπόροι φασολιού, φυτεμένοι σε μη αποστειρωμένο έδαφος, μολυσμένο με τον μύκητα

ΘΜ: Θετικός Μάρτυρας – Μη επεξεργασμένοι σπόροι φασολιού, φυτεμένοι σε μη αποστειρωμένο έδαφος

REA 17: Σπόροι φασολιού, επεξεργασμένοι με σπόρια του στρεπτομύκητα REA 17, φυτεμένοι σε μη αποστειρωμένο έδαφος, μολυσμένο με τον μύκητα και σπόροι φασολιού, φυτεμένοι σε μη αποστειρωμένο έδαφος, μολυσμένο με τον μύκητα και εμπλουτισμένο με σπόρια του στρεπτομύκητα REA 17

GRE 24/1 Λ: Σπόροι φασολιού, επεξεργασμένοι με σπόρια του στρεπτομύκητα GRE 24/1 Λ, φυτεμένοι σε μη αποστειρωμένο έδαφος, μολυσμένο με τον μύκητα και σπόροι φασολιού, φυτεμένοι σε μη αποστειρωμένο έδαφος, μολυσμένο με τον μύκητα και εμπλουτισμένο με σπόρια του στρεπτομύκητα GRE 24/1 Λ

GRE 25: Σπόροι φασολιού, επεξεργασμένοι με σπόρια του στρεπτομύκητα GRE 25, φυτεμένοι σε μη αποστειρωμένο έδαφος, μολυσμένο με τον μύκητα και σπόροι φασολιού, φυτεμένοι σε μη αποστειρωμένο έδαφος, μολυσμένο με τον μύκητα και εμπλουτισμένο με σπόρια του στρεπτομύκητα GRE 25

OL 80: Σπόροι φασολιού, επεξεργασμένοι με σπόρια του στρεπτομύκητα OL 80, φυτεμένοι σε μη αποστειρωμένο έδαφος, μολυσμένο με τον μύκητα και σπόροι φασολιού, φυτεμένοι σε μη αποστειρωμένο έδαφος, μολυσμένο με τον μύκητα και εμπλουτισμένο με σπόρια του στρεπτομύκητα OL 80

AMO 58: Σπόροι φασολιού, επεξεργασμένοι με σπόρια του στρεπτομύκητα AMO 58, φυτεμένοι σε μη αποστειρωμένο έδαφος, μολυσμένο με τον μύκητα και σπόροι φασολιού, φυτεμένοι σε μη αποστειρωμένο έδαφος, μολυσμένο με τον μύκητα και εμπλουτισμένο με σπόρια του στρεπτομύκητα AMO 58

OL 13: Σπόροι φασολιού, επεξεργασμένοι με σπόρια του στρεπτομύκητα OL 13, φυτεμένοι σε μη αποστειρωμένο έδαφος, μολυσμένο με τον μύκητα και σπόροι φασολιού, φυτεμένοι σε μη αποστειρωμένο έδαφος, μολυσμένο με τον μύκητα και εμπλουτισμένο με σπόρια του στρεπτομύκητα OL 13

3.9.2. *In vivo* ικανότητα βιοελέγχου του μύκητα *Fusarium oxysporum* DSM62059 από στελέχη στρεπτομυκήτων

Οι στρεπτομύκητες CR 14, GRE 25, REA 17, OL 7 και AMO 58 επιλέχθηκαν για τον έλεγχο της ικανότητάς τους να εκφράζουν τον αντιμυκητιακό τους χαρακτήρα *in vivo*, προστατεύοντας φυτά τομάτας. Η επιλογή αυτή βασίστηκε στο γεγονός ότι οι στρεπτομύκητες αυτοί, εκτός του ότι έδειξαν τον πιο ισχυρό ανταγωνιστικό χαρακτήρα *in vitro*, έδειξαν και την καλύτερη συμπεριφορά ως πιθανοί παράγοντες βιοελέγχου στις δοκιμασίες βιοχημικής ανάλυσης της αντιμυκητιακής τους δραστηριότητας.

Στο πλαίσιο των *in vivo* δοκιμασιών, εξετάστηκε η ικανότητα των στρεπτομυκήτων να εμποδίζουν την ανάπτυξη του φυτοπαθογόνου μύκητα *Fusarium oxysporum* DSM62059 και την εκδήλωση της παθογένειάς του σε σπορόφυτα τομάτας, που αναπτύσσονται σε αποστειρωμένο και μη έδαφος, σύμφωνα με τη μεθοδολογία που περιγράφηκε στο Κεφάλαιο 2 (§2.8.6). Επίσης, διερευνήθηκε ο τρόπος εφαρμογής των εξεταζόμενων παραγόντων βιοελέγχου.

3.9.2.1. Διερεύνηση της ικανότητας βιοελέγχου του μύκητα *Fusarium oxysporum* DSM62059 *in vivo* από στελέχη στρεπτομυκήτων, σε αποστειρωμένο χώμα

Στα πειράματα που διεξήχθησαν σε αποστειρωμένο, μολυσμένο με τον φυτοπαθογόνο μύκητα *Fusarium oxysporum* DSM62059 χώμα, ο αριθμός των σπορόφυτων τομάτας, που κατάφεραν να αναπτυχθούν παρουσία των εξεταζόμενων παραγόντων βιοελέγχου ήταν σαφώς υψηλότερος από τον αριθμό εκείνων που αναπτύχθηκαν σε αποστειρωμένο και μολυσμένο έδαφος απουσία παραγόντων βιοελέγχου.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που καταγράφηκαν, προέκυψε ότι η ικανότητα ανάπτυξης μη επεξεργασμένων σπορόφυτων τομάτας σε μη μολυσμένο με τον μύκητα, αποστειρωμένο χώμα (θετικός μάρτυρας) ήταν πολύ υψηλή, φτάνοντας το 95 % του συνόλου των σπορόφυτων που εξετάστηκαν (Εικόνα 3.58). Όλα τα φυτά που αναπτύχθηκαν είχαν υγιή εμφάνιση, ενώ οι τιμές των παραμέτρων φύτευσης που μετρήθηκαν έφτασαν κατά μέσο όρο τα 15,71 cm (μέσο ύψος φυτών τομάτας) και τα

0,55 g (μέσο βάρος φυτών τομάτας). Ωστόσο, σε αποστειρωμένο και μολυσμένο με τον *Fusarium oxysporum* DSM62059 το 45 % των μη επεξεργασμένων σπορόφυτων τομάτας που φυτεύτηκαν (αρνητικός μάρτυρας) κατόρθωσαν να αναπτυχθούν, των οποίων το μέσο ύψος μετρήθηκε στα 11,16 cm ενώ το μέσο βάρος τους στα 0,36 g (Εικόνα 3.59).

Γενικά, τα σπορόφυτα τομάτας που είχαν επεξεργαστεί με σπόρια επιλεγμένων στρεπτομυκήτων αναπτύχθηκαν σε μεγαλύτερο ποσοστό από αυτό του αρνητικού μάρτυρα και στα φυτά που προέκυψαν οι τιμές των παραμέτρων φύτρωσης που μετρήθηκαν ήταν διορθωμένες (Εικόνα 3.60).

Συγκεκριμένα, σπορόφυτα τομάτας που υπέστησαν επεξεργασία πριν τη φύτευσή τους με σπόρια του στρεπτομύκητα CR14, αναπτύχθηκαν σε ποσοστό που ξεπέρασε το 81,25 %, πλησιάζοντας πολύ το αντίστοιχο ποσοστό του θετικού μάρτυρα. Το μέσο ύψος των φυτών που αναπτύχθηκαν ανήλθε στο 14,62 cm και το μέσο βάρος στα 0,51 g, τιμές πολύ κοντινές στις αντίστοιχες που μετρήθηκαν στα φυτά του θετικού μάρτυρα και κατά πολύ αυξημένες σε σχέση με εκείνες του αρνητικού μάρτυρα.



Εικόνα 3.58. Φυτά, που φύτρωσαν από σπορόφυτα τομάτας, που φυτεύτηκαν σε αποστειρωμένο χώμα, απαλλαγμένο από οποιονδήποτε παθογόνο παράγοντα αλλά και οποιονδήποτε από τους εξεταζόμενους παράγοντες βιοελέγχου (Θετικός Μάρτυρας)



Εικόνα 3.59. Φυτά, που φύτρωσαν από μη επεξεργασμένα σπορόφυτα τομάτας, που φυτεύτηκαν σε αποστειρωμένο έδαφος, μολυσμένο από τον *Fusarium oxysporum* DSM62059 (Αρνητικός Μάρτυρας)

Τα μη επεξεργασμένα σπορόφυτα, που τοποθετήθηκαν σε αποστειρωμένο και μολυσμένο έδαφος, το οποίο όμως είχε εμπλουτιστεί με διάλυμα σπορίων του στρεπτομύκητα CR 14, αναπτύχθηκαν σε ποσοστό 80,25 %, αποδίδοντας φυτά μέσου ύψους σχεδόν 14 cm (13,96 cm) και μέσου βάρους μεγαλύτερου του 0,5 g (0,51 g).

Σπόροι τομάτας που βλάστησαν παρουσία του στρεπτομύκητα GRE 25, όταν φυτεύτηκαν σε αποστειρωμένο χώμα μολυσμένο με τον φυτοπαθογόνο μύκητα φύτρωσαν σε ποσοστό 75 %, απόδοση πολύ βελτιωμένη σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα και αρκετά κοντινή σε αυτή που επέδειξε ο θετικός μάρτυρας. Όσα φυτά αναπτύχθηκαν, κατά μέσο όρο, ήταν πολύ ψηλότερα από αυτά του αρνητικού μάρτυρα (μέσο ύψος = 13,42 cm) και κατά πολύ δυνατώτερα (μέσο βάρος = 0,58 g), ενώ μακροσκοπικά δεν εμφάνισαν σημεία παθογένειας.

Από τους μη επεξεργασμένους σπόρους τομάτας που τοποθετήθηκαν σε χώμα όπου συνυπήρχαν ο φυτοπαθογόνος μύκητας αλλά και σπόρια του στρεπτομύκητα GRE 25, ποσοστό μεγαλύτερο του 70 % (70,75 %) κατάφερε να φυτρώσει, αποδίδοντας φυτά υγιή, ψηλά και δυνατά. Το μέσο βάρος των φυτών που αναπτύχθηκαν υπολογίστηκε στα 0,55 g, ενώ το μέσο ύψος τους ξεπέρασε τα 13 cm (13,16 cm).

Εξετάζοντας την επίδραση του στρεπτομύκητα REA 17 στην ανάπτυξη σπορόφυτων τομάτας, που τοποθετήθηκαν σε αποστειρωμένο και μολυσμένο με *Fusarium oxysporum* DSM843 χώμα, προέκυψε ότι και αυτός κατάφερε να αυξήσει πάρα πολύ τον αριθμό των σπορόφυτων που αναπτύχθηκαν και οδήγησε σε ψηλά και δυνατά φυτά, όταν κάλυψε με τη μορφή σπορίων του τα νεαρά σπορόφυτα. Συγκεκριμένα, πάνω από το 71 % των επεξεργασμένων σπορόφυτων αναπτύχθηκαν και στα φυτά που προέκυψαν το μέσο ύψος μετρήθηκε στα 11, 39 cm, ενώ το μέσο βάρος στα 0,36 g.

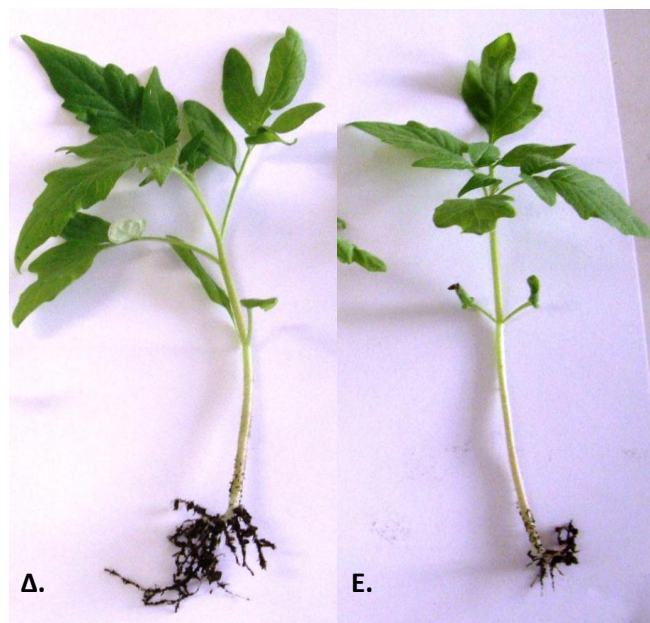
Όταν τα σπόρια του στρεπτομύκητα REA 17 εφαρμόστηκαν στο αποστειρωμένο και μολυσμένο με τον μύκητα χώμα, το ποσοστό επιτυχημένης και πλήρους ανάπτυξης φυτών τομάτας έφτασε το 63 %. Το ποσοστό αυτό, αν και είναι από τα χαμηλότερα που καταμετρήθηκαν, είναι υψηλότερο κατά 40 % περίπου από αυτό του αρνητικού μάρτυρα. Τα φυτά που προέκυψαν ήταν μικρά και αδύναμα αλλά φυσιολογικά στην εμφάνιση, χωρίς σημάδια της παθογένειας του μύκητα. Το μέσο βάρος τους έφτασε τα 0,4 g και το μέσο ύψος τους τα 11,22 cm.

Το 93,75 % των σπόρων τομάτας που είχαν καλυφθεί με σπόρια του στρεπτομύκητα OL 7 εξελίχθηκαν σε υγιή και δυνατά φυτά, των οποίων το μέσο βάρος έφτασε τα 0,53 g και το μέσο ύψος τους υπολογίστηκε στα 13,97 cm. Όλες οι παραπάνω τιμές, και ιδιαίτερα το ποσοστό φύτευσης, είναι πολύ κοντινές στις αντίστοιχες του θετικού μάρτυρα και απέχουν κατά πολύ από αυτές του αρνητικού.

Στις δοκιμασίες κατά τις οποίες ο παράγοντας βιοελέγχου (OL 7) εφαρμόστηκε στο χρώμα, το οποίο είχε μολυνθεί από τον μύκητα *Fusarium oxysporum* DSM62059, το 84,25 % των μη επεξεργασμένων σπορόφυτων που φυτεύτηκαν κατάφεραν να φυτρώσουν. Το ποσοστό αυτό, συγκριτικά με το αντίστοιχο του αρνητικού μάρτυρα είναι πολύ υψηλό αλλά κατά 10 % περίπου μικρότερο από το αντίστοιχο της προηγούμενης διαδικασίας. Τα φυτά που μετρήθηκαν ήταν σε κάθε περίπτωση εύρωστα, ψηλά και δυνατά. Το μέσο ύψος τους υπολογίστηκε στα 13,57 cm ενώ το μέσο βάρος τους στα 0,51 g.

Τέλος, κατά τη διερεύνηση της ικανότητας του στρεπτομύκητα AMO 58 να προστατεύει τα σπορόφυτα της τομάτας από την παθογόνο δράση του *Fusarium oxysporum* DSM62059, προέκυψε ότι το 87,5 % των σπορόφυτων αναπτύχθηκαν επιτυχώς, ποσοστό αρκετά υψηλό, συγκρινόμενο τόσο με τον θετικό όσο και με τον αρνητικό μάρτυρα. Τα φυτά ήταν απολύτως υγιή, κατόπιν μακροσκοπικής παρατήρησης. Το μέσο ύψος των φυτών ανήλθε στα 15,57 cm, τιμή σχεδόν ίση με το μέσο ύψος των φυτών του θετικού μάρτυρα, ενώ το βάρος των φυτών αυτών ξεπέρασε αρκετά το μέσο βάρος του θετικού μάρτυρα, φτάνοντας κατά μέσο όρο τα 0,64 g.

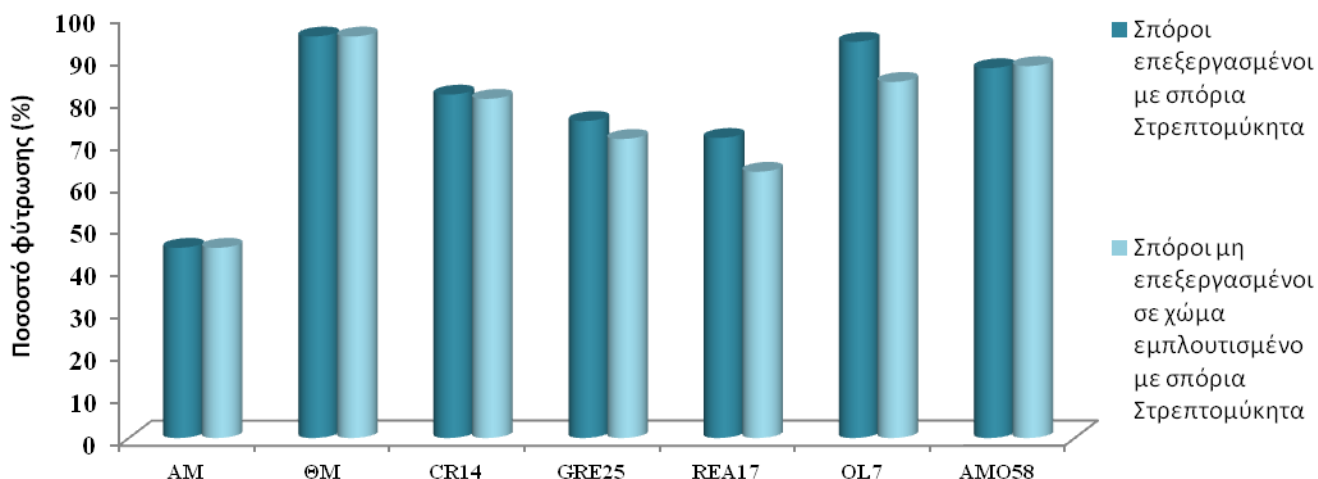
Στην περίπτωση του στρεπτομύκητα AMO 58, όταν το διάλυμα των σπορίων του χρησιμοποιήθηκε για να εμπλουτίσει το μολυσμένο με τον φυτοπαθογόνο μύκητα χρώμα και όχι για να καλύψει του σπόρους του εξεταζόμενου φυτού, το αποτέλεσμα ήταν να κατορθώσουν να αναπτυχθούν πολλά από τα σπορόφυτα που χρησιμοποιήθηκαν (ποσοστό ίσο με το 88 % όσων φυτεύτηκαν). Το ποσοστό αυτό, περιλαμβάνεται στα υψηλότερα που καταμετρήθηκαν και δεν διαφέρει στατιστικά σημαντικά από το αντίστοιχο της προηγούμενη διαδικασίας με τον ίδιο στρεπτομύκητα. Τα φυτά τομάτας που τελικά ανέκυσαν και στα οποία μετρήθηκαν οι εξεταζόμενες παράμετροι φύτευσης εμφάνισαν υγιή φαινότυπο. Το μέσο βάρος τους έφτασε τα 0,56 g, ενώ το μέσο ύψος τους τα 15,26 cm. (Εικόνα 3.60).



Εικόνα 3.60. Φωτογραφίες που απεικονίζουν τον μέσο όρο της εμφάνισης των φυτών που προέκυψαν από τα επεξεργασμένα με τους εξεταζόμενους παράγοντες βιοελέγχου σπορόφυτα (Α. CR 14, Β. GRE 25, Γ. REA 17, Δ. OL 7, Ε. AMO 58), όταν φυτεύτηκαν σε μη αποστειρωμένο χώμα, μολυσμένο με τον φυτοπαθογόνο μύκητα *Fusarium oxysporum* DSM62059

Συγκεντρώνοντας τα αποτελέσματα από τις δοκιμασίες διερεύνησης της ικανότητας επιλεγμένων στρεπτομυκήτων να προστατεύουν σπορόφυτα τομάτας από την παθογόνο δράση του μύκητα *Fusarium oxysporum* DSM62059 με την εφαρμογή τους

είτε πάνω στους σπόρους είτε στο χρησιμοποιούμενο αποστειρωμένο έδαφος, προκύπτουν τα παρακάτω γραφήματα (Εικόνες 3.61 – 3.63).



Εικόνα 3.61. Επί τοις εκατό ποσοστό φύτευσης σπορόφυτων τομάτας σε έδαφος αποστειρωμένο και μολυσμένο με τον φυτοπαθογόνο μύκητα *Fusarium oxysporum* DSM62059

AM: Αρνητικός Μάρτυρας – Μη επεξεργασμένα σπορόφυτα τομάτας, φυτεμένα σε αποστειρωμένο έδαφος, μολυσμένο με τον μύκητα

ΘΜ: Θετικός Μάρτυρας – Μη επεξεργασμένα σπορόφυτα τομάτας, φυτεμένα σε αποστειρωμένο έδαφος

CR 14: Σπορόφυτα τομάτας, επεξεργασμένα με σπόρια του στρεπτομύκητα CR 14, φυτεμένα σε αποστειρωμένο έδαφος, μολυσμένο με τον μύκητα και σπορόφυτα τομάτας, φυτεμένα σε αποστειρωμένο έδαφος, μολυσμένο με τον μύκητα και εμπλουτισμένο με σπόρια του στρεπτομύκητα CR 14

GRE 25: Σπορόφυτα τομάτας, επεξεργασμένα με σπόρια του στρεπτομύκητα GRE 25, φυτεμένα σε αποστειρωμένο έδαφος, μολυσμένο με τον μύκητα και σπορόφυτα τομάτας, φυτεμένα σε αποστειρωμένο έδαφος, μολυσμένο με τον μύκητα και εμπλουτισμένο με σπόρια του στρεπτομύκητα GRE 25

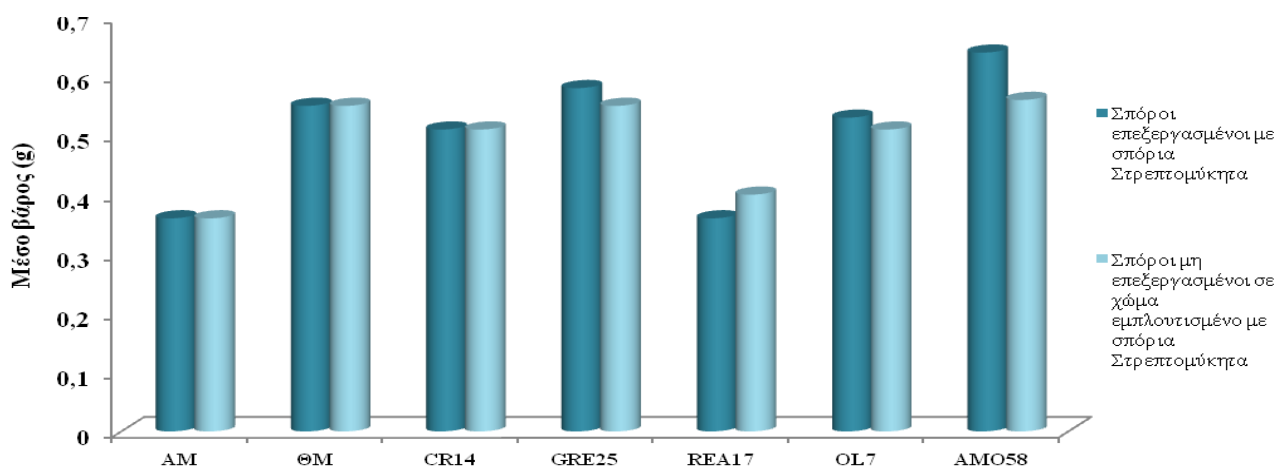
REA 17: Σπορόφυτα τομάτας, επεξεργασμένα με σπόρια του στρεπτομύκητα REA 17, φυτεμένα σε αποστειρωμένο έδαφος, μολυσμένο με τον μύκητα και σπορόφυτα τομάτας, φυτεμένα σε αποστειρωμένο έδαφος, μολυσμένο με τον μύκητα και εμπλουτισμένο με σπόρια του στρεπτομύκητα REA 17

OL 7: Σπορόφυτα τομάτας, επεξεργασμένα με σπόρια του στρεπτομύκητα OL 7, φυτεμένα σε αποστειρωμένο έδαφος, μολυσμένο με τον μύκητα και σπορόφυτα τομάτας, φυτεμένα σε αποστειρωμένο έδαφος, μολυσμένο με τον μύκητα και εμπλουτισμένο με σπόρια του στρεπτομύκητα OL 7

AMO 58: Σπορόφυτα τομάτας, επεξεργασμένα με σπόρια του στρεπτομύκητα AMO 58, φυτεμένα σε αποστειρωμένο έδαφος, μολυσμένο με τον μύκητα και σπορόφυτα τομάτας, φυτεμένα σε αποστειρωμένο έδαφος, μολυσμένο με τον μύκητα και εμπλουτισμένο με σπόρια του στρεπτομύκητα AMO 58

Με εξαίρεση τον Στρεπτομύκητα AMO 58, κατά τη μελέτη του οποίου δεν δείχθηκε καμία επίδραση της μεθόδου εφαρμογής των σπορίων του στην ικανότητα ανάπτυξης των σπορόφυτων τομάτας σε μη αποστειρωμένο έδαφος, μολυσμένο με τον

φυτοπαθογόνο μύκητα, οι υπόλοιποι στρεπτομύκητες ήταν ικανότεροι να οδηγήσουν τα σπορόφυτα στην πλήρη ανάπτυξη, όταν αυτά είχαν υποστεί επεξεργασία πριν τη φύτευσή τους με τα σπόρια αυτών.



Εικόνα 3.62. Μέσο βάρος φυτών τομάτας σε έδαφος αποστειρωμένο και μολυσμένο με τον φυτοπαθογόνο μύκητα *Fusarium oxysporum* DSM62059

AM: Αρνητικός Μάρτυρας – Μη επεξεργασμένα σπορόφυτα τομάτας, φυτεμένα σε αποστειρωμένο έδαφος, μολυσμένο με τον μύκητα

ΘΜ: Θετικός Μάρτυρας – Μη επεξεργασμένα σπορόφυτα τομάτας, φυτεμένα σε αποστειρωμένο έδαφος

CR 14: Σπορόφυτα τομάτας, επεξεργασμένα με σπόρια του στρεπτομύκητα CR 14, φυτεμένα σε αποστειρωμένο έδαφος, μολυσμένο με τον μύκητα και σπορόφυτα τομάτας, φυτεμένα σε αποστειρωμένο έδαφος, μολυσμένο με τον μύκητα και εμπλουτισμένο με σπόρια του στρεπτομύκητα CR 14

GRE 25: Σπορόφυτα τομάτας, επεξεργασμένα με σπόρια του στρεπτομύκητα GRE 25, φυτεμένα σε αποστειρωμένο έδαφος, μολυσμένο με τον μύκητα και σπορόφυτα τομάτας, φυτεμένα σε αποστειρωμένο έδαφος, μολυσμένο με τον μύκητα και εμπλουτισμένο με σπόρια του στρεπτομύκητα GRE 25

REA 17: Σπορόφυτα τομάτας, επεξεργασμένα με σπόρια του στρεπτομύκητα REA 17, φυτεμένα σε αποστειρωμένο έδαφος, μολυσμένο με τον μύκητα και σπορόφυτα τομάτας, φυτεμένα σε αποστειρωμένο έδαφος, μολυσμένο με τον μύκητα και εμπλουτισμένο με σπόρια του στρεπτομύκητα REA 17

OL 7: Σπορόφυτα τομάτας, επεξεργασμένα με σπόρια του στρεπτομύκητα OL 7, φυτεμένα σε αποστειρωμένο έδαφος, μολυσμένο με τον μύκητα και σπορόφυτα τομάτας, φυτεμένα σε αποστειρωμένο έδαφος, μολυσμένο με τον μύκητα και εμπλουτισμένο με σπόρια του στρεπτομύκητα OL 7

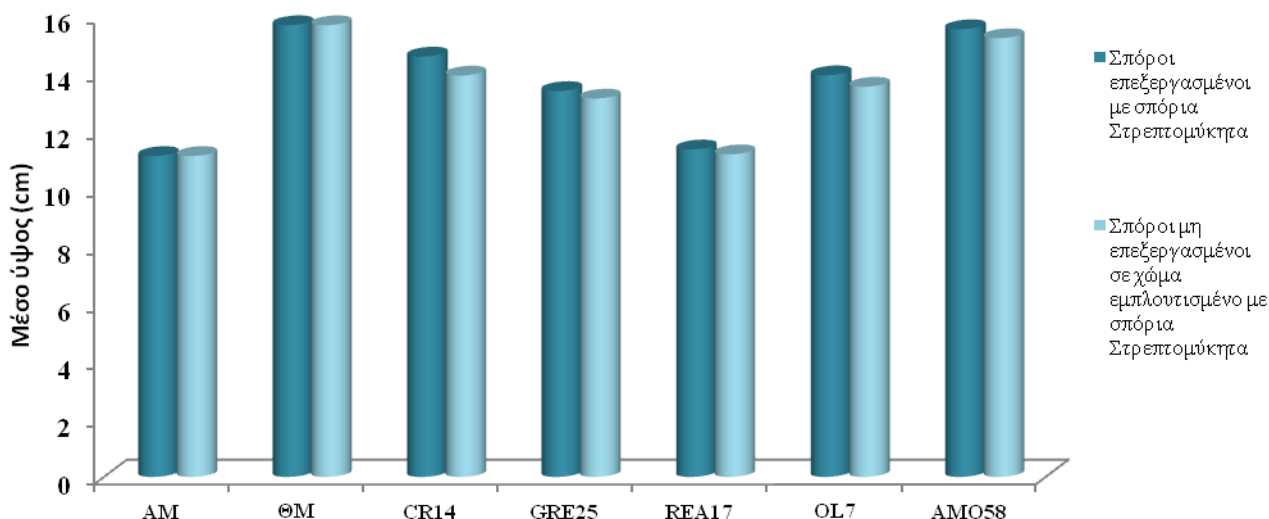
AMO 58: Σπορόφυτα τομάτας, επεξεργασμένα με σπόρια του στρεπτομύκητα AMO 58, φυτεμένα σε αποστειρωμένο έδαφος, μολυσμένο με τον μύκητα και σπορόφυτα τομάτας, φυτεμένα σε αποστειρωμένο έδαφος, μολυσμένο με τον μύκητα και εμπλουτισμένο με σπόρια του στρεπτομύκητα AMO 58

Η μέθοδος διαχείρισης του στρεπτομύκητα CR 14 ως παράγοντα βιοελέγχου για την προστασία σπορόφυτων τομάτας σε έδαφος αποστειρωμένο και μολυσμένο με τον μύκητα *Fusarium oxysporum* DSM62059 φάνηκε από τα αποτελέσματα ότι δεν επηρεάζει σε κανένα βαθμό το βάρος των φυτών που αναπτύσσονται. Ο στρεπτομύκητας REA 17, όταν χρησιμοποιείται για να εμπλουτίσει το έδαφος, στο οποίο τοποθετούνται μη επεξεργασμένα σπορόφυτα τομάτας, οδηγεί στον σχηματισμό πιο δυνατών φυτών από αυτά που προκύπτουν από σπορόφυτα επεξεργασμένα με σπόριά του. Το αντίστροφο ακριβώς αποτέλεσμα προέκυψε από τη μελέτη των υπόλοιπων στρεπτομυκήτων, αφού τα φυτά που ανέκυψαν από σπορόφυτα καλυμμένα με σπόρια των GRE 25, OL 7 και κυρίως του AMO 58 ήταν δυνατότερα και βαρύτερα.

Όλοι οι εξεταζόμενοι στρεπτομύκητες, δηλαδή τα επιλεγμένα για τις *in vivo* δοκιμασίες στελέχη CR 14, GRE 25, OL 7, REA 17 και AMO 58, κρίθηκαν από τα αποτελέσματα ικανότερα να οδηγήσουν στην ανάπτυξη ψηλότερων φυτών τομάτας όταν τα σπόριά τους χρησιμοποιήθηκαν για την επεξεργασία των σπορόφυτων, τα οποία στη συνέχεια φυτεύτηκαν σε αποστειρωμένο και μολυσμένο με τον φυτοπαθογόνο μύκητα έδαφος παρά όταν αυτά εντέθηκαν στο έδαφος αυτό και τα σπορόφυτα φυτεύτηκαν σε αυτό χωρίς καμία επεξεργασία.

3.9.2.2. Διερεύνηση της ικανότητας βιοελέγχου του μύκητα *Fusarium oxysporum* DSM62059 *in vivo* από στελέχη στρεπτομυκήτων, σε μη αποστειρωμένο χώμα

Τα αποτελέσματα που ακολουθούν προέκυψαν από πειράματα που πραγματοποιήθηκαν σε χώμα ίδιας σύστασης με αυτό που χρησιμοποιήθηκε στις προηγούμενες δοκιμασίες αλλά μη αποστειρωμένο (§2.7.6). Σε μη αποστειρωμένο και ταυτόχρονα μολυσμένο με τον φυτοπαθογόνο μύκητα *Fusarium oxysporum* DSM62059 χώμα, ο αριθμός των σπορόφυτων τομάτας, που κατάφεραν να φυτρώσουν παρουσία των εξεταζόμενων παραγόντων βιοελέγχου ήταν κατά κανόνα υψηλότερος σε σχέση με τον αριθμό των σπορόφυτων τομάτας, που φύτεψαν σε μη αποστειρωμένο και μολυσμένο έδαφος απουσία παραγόντων βιοελέγχου. Επίσης, γενικά, το ποσοστό φύτεψης σε αυτές τις δοκιμασίες (μη αποστειρωμένο χώμα) καταγράφηκε υψηλότερο σε σχέση με αυτό που προέκυψε από τα αντίστοιχα πειράματα σε αποστειρωμένο χώμα.



Εικόνα 3.63. Μέσο ύψος φυτών τομάτας σε έδαφος αποστειρωμένο και μολυσμένο με τον φυτοπαθογόνο μύκητα *Fusarium oxysporum* DSM62059

AM: Αρνητικός Μάρτυρας – Μη επεξεργασμένα σπορόφυτα τομάτας, φυτεμένα σε αποστειρωμένο έδαφος μολυσμένο με τον μύκητα

ΘΜ: Θετικός Μάρτυρας – Μη επεξεργασμένα σπορόφυτα τομάτας, φυτεμένα σε αποστειρωμένο έδαφος

CR 14: Σπορόφυτα τομάτας, επεξεργασμένα με σπόρια του στρεπτομύκητα CR 14, φυτεμένα σε αποστειρωμένο έδαφος, μολυσμένο με τον μύκητα και σπορόφυτα τομάτας, φυτεμένα σε αποστειρωμένο έδαφος, μολυσμένο με τον μύκητα και εμπλουτισμένο με σπόρια του στρεπτομύκητα CR 14

GRE 25: Σπορόφυτα τομάτας, επεξεργασμένα με σπόρια του στρεπτομύκητα GRE 25, φυτεμένα σε αποστειρωμένο έδαφος, μολυσμένο με τον μύκητα και σπορόφυτα τομάτας, φυτεμένα σε αποστειρωμένο έδαφος, μολυσμένο με τον μύκητα και εμπλουτισμένο με σπόρια του στρεπτομύκητα GRE 25

REA 17: Σπορόφυτα τομάτας, επεξεργασμένα με σπόρια του στρεπτομύκητα REA 17, φυτεμένα σε αποστειρωμένο έδαφος, μολυσμένο με τον μύκητα και σπορόφυτα τομάτας, φυτεμένα σε αποστειρωμένο έδαφος, μολυσμένο με τον μύκητα και εμπλουτισμένο με σπόρια του στρεπτομύκητα REA 17

OL 7: Σπορόφυτα τομάτας, επεξεργασμένα με σπόρια του στρεπτομύκητα OL 7, φυτεμένα σε αποστειρωμένο έδαφος, μολυσμένο με τον μύκητα και σπορόφυτα τομάτας, φυτεμένα σε αποστειρωμένο έδαφος, μολυσμένο με τον μύκητα και εμπλουτισμένο με σπόρια του στρεπτομύκητα OL 7

AMO 58: Σπορόφυτα τομάτας, επεξεργασμένα με σπόρια του στρεπτομύκητα AMO 58, φυτεμένα σε αποστειρωμένο έδαφος, μολυσμένο με τον μύκητα και σπορόφυτα τομάτας, φυτεμένα σε αποστειρωμένο έδαφος, μολυσμένο με τον μύκητα και εμπλουτισμένο με σπόρια του στρεπτομύκητα AMO 58

Στα δοχεία που χρησιμοποιήθηκαν ως θετικοί μάρτυρες (μη επεξεργασμένοι σπόροι σε μη αποστειρωμένο έδαφος) η απόδοση φύτευσης σπορόφυτων τομάτας ήταν πολύ υψηλή, φτάνοντας το 96 % των σπορόφυτων που φυτεύτηκαν (κατά 1 % υψηλότερη

από την αντίστοιχη απόδοση του θετικού μάρτυρα σε αποστειρωμένο χώμα). Τα φυτά τομάτας που αναπτύχθηκαν και χρησιμοποιήθηκαν ως θετικοί μάρτυρες σε μη αποστειρωμένο χώμα ήταν ελαφρώς δυνατότερα και κατά πολύ ψηλότερα των αντίστοιχων σε αποστειρωμένο χώμα (Εικόνα 3.64). Το μέσο βάρος τους υπολογίστηκε στα 0,60 g, ενώ το μέσο ύψος τους έφτασε τα 18,47 cm. Στα δοχεία που χρησιμοποιήθηκαν ως αρνητικοί μάρτυρες, όπου μη επεξεργασμένα σπορόφυτα τομάτας φυτεύτηκαν σε μη αποστειρωμένο χώμα, μολυσμένο με τον φυτοπαθογόνο μύκητα *Fusarium oxysporum* DSM62059, το ποσοστό της φύτευσης ήταν κατά 6 % υψηλότερο από αυτό των αρνητικών μαρτύρων των πειραμάτων σε αποστειρωμένο χώμα. Τα φυτά – αρνητικοί μάρτυρες ήταν μικρά και αδύναμα, ενώ συχνά εκδήλωσαν συμπτώματα παθογένειας που περιγράφονται από την εικόνα χλωρωτικών φυτών (Εικόνα 3.65). Το μέσο βάρος αυτών των φυτών ήταν 0,21 g (τιμή μικρότερη κατά 15 % από την αντίστοιχη των αρνητικών μαρτύρων σε αποστειρωμένο χώμα) και το μέσο ύψος τους 10,75 cm (τιμή μικρότερη κατά 0,41 % της αντίστοιχης των αρνητικών μαρτύρων σε αποστειρωμένο χώμα).

Σε μη αποστειρωμένο χώμα, η χρήση των επιλεγμένων στρεπτομυκήτων, σε γενικές γραμμές, διόρθωσε σε στατιστικά σημαντικό βαθμό όλες τις μετρούμενες παραμέτρους σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα (Εικόνα 3.66).

Συγκεκριμένα, οι σπόροι τομάτας, που καλύφθηκαν πριν τη φύτευσή τους με σπόρια του στρεπτομύκητα CR 14, φύτευσαν σε ποσοστό 88,25 %. Το ποσοστό αυτό είναι πολύ υψηλό τόσο σε σχέση με το πόσο απέχει από το αντίστοιχο του αρνητικού μάρτυρα όσο και σε σχέση με το πόσο πλησιάζει στο ποσοστό φύτευσης του θετικού μάρτυρα. Τα φυτά τομάτας που προέκυψαν ήταν υγιή και το μέσο ύψος τους υπολογίστηκε στα 14,88 cm, ενώ το μέσο βάρος τους στα 0,54 g.

Στα πειράματα που ο στρεπτομύκητας CR 14, υπό τη μορφή διαλύματος σπορίων, εφαρμόστηκε στο μη αποστειρωμένο χώμα, το οποίο είχε μολυνθεί από τον *Fusarium oxysporum* DSM62059, το 82,5 % των μη επεξεργασμένων σπορόφυτων φύτευσε και οδήγησε στο σχηματισμό φυτών τομάτας, που κατά μέσο όρο είχαν ύψος 14,91 cm και βάρος 0,51 g. Όλες οι τιμές που ελήφθησαν ως αποτέλεσμα αυτής της δοκιμασίας είναι σε μικρό βαθμό χαμηλότερες από αυτές που μετρήθηκαν στην προηγούμενη δοκιμασία μελέτης της ικανότητας ελέγχου του μύκητα από τον CR 14.



Εικόνα 3.64. Φυτά τομάτας, που φύτρωσαν από σπορόφυτα τομάτας, που φυτεύτηκαν σε μη αποστειρωμένο χώμα, απαλλαγμένο από οποιονδήποτε παθογόνο παράγοντα αλλά και οποιονδήποτε από τους εξεταζόμενους παράγοντες βιοελέγχου (Θετικός Μάρτυρας)

Το ποσοστό φύτρωσης σπορόφυτων τομάτας σε μολυσμένο και μη αποστειρωμένο χώμα, κατόπιν επεξεργασίας τους με σπόρια του στρεπτομύκητα GRE 25, ήταν κατά 40 % μεγαλύτερο από αυτό του αρνητικού μάρτυρα και κατά 15 % μικρότερο του θετικού μάρτυρα. Στα φυτά που σχηματίστηκαν το μέσο ύψος υπολογίστηκε στα 15,12 cm, ενώ το μέσο βάρος στα 0,42 g. Από τη μακροσκοπική παρατήρηση που πραγματοποιήθηκε δεν καταγράφηκαν συμπτώματα παθογένειας.

Ο αριθμός των φυτών που προέκυψαν από μη επεξεργασμένα σπορόφυτα τομάτας σε μολυσμένο με τον φυτοπαθογόνο μύκητα χώμα, του οποίου η φυσιολογική μικροχλωρίδα είχε ενισχυθεί με διάλυμα σπορίων του στρεπτομύκητα GRE 25, ήταν και πάλι κατά 40 % μεγαλύτερος από αυτόν του αρνητικού μάρτυρα και κατά 15 % μικρότερος του θετικού μάρτυρα, και άρα εφάμιλλος του αριθμού των φυτών που αναπτύχθηκαν από σπόρους επεξεργασμένους με τα σπόρια του GRE 25. Το μέσο

ύψος των φυτών στην παρούσα δοκιμασία ήταν 15,27 g και το μέσο βάρος τους 0,52 g· δηλαδή, αν και ο αριθμός των φυτών που κατάφεραν να αναπτυχθούν φαίνεται να είναι ανεξάρτητος της μεθόδου εφαρμογής του GRE 25 στο εξεταζόμενο σύστημα, όταν ο GRE 25 εφαρμόζεται απευθείας στο έδαφος, τα φυτά είναι δυνατότερα και ψηλότερα.



Εικόνα 3.65. Φυτά τομάτας, που φύτρωσαν από μη επεξεργασμένα σπορόφυτα τομάτας, που φυτεύτηκαν σε μη αποστειρωμένο έδαφος, μολυσμένο από τον *Fusarium oxysporum* DSM62059 (Αρνητικός Μάρτυρας)

Τα σπορόφυτα τομάτας που φυτεύτηκαν μετά από επεξεργασία τους με σπόρια του στρεπτομύκητα REA 17 κατόρθωσαν να φυτρώσουν σε ποσοστό 77,75 %. Το ποσοστό συμπεριλαμβάνεται στα χαμηλά ποσοστά φύτευσης, αν και ξεπερνάει τον αρνητικό μάρτυρα σχεδόν κατά 22 %. Ωστόσο, είναι υψηλότερο από κάθε ποσοστό φύτευσης σε δοκιμασία στην οποία χρησιμοποιήθηκε ο REA 17 για τον έλεγχο του *Fusarium oxysporum* DSM62059. Τα φυτά που αναπτύχθηκαν υπό τις παραπάνω συνθήκες είχαν κατά μέσο όρο βάρος της τάξης των 0,46 g και ύψος σχεδόν 14 cm.

Στις δοκιμασίες, στις οποίες ο ίδιος στρεπτομύκητας (REA 17) χρησιμοποιήθηκε ως διάλυμα σπορίων απευθείας στο μη αποστειρωμένο και μολυσμένο με τον μύκητα έδαφος, το ποσοστό φύτευσης ήταν σημαντικά χαμηλό. Μόλις το 67,25 % των

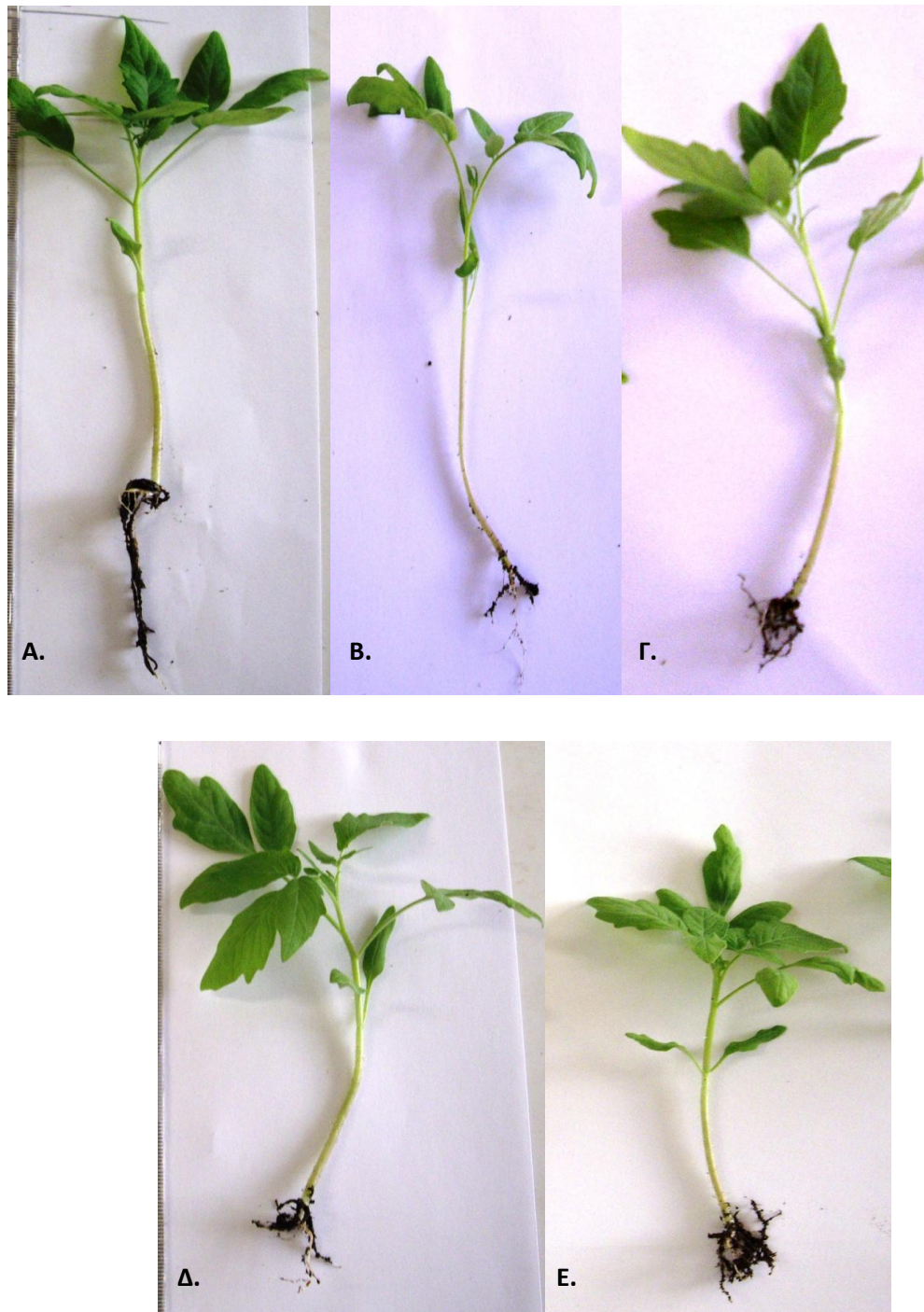
σπορόφυτων φύτευαν και τα φυτά που ελήφθησαν ήταν μικρά και ελαφριά. Το μέσο βάρος τους έφτασε τα 0,36 g και το μέσο ύψος τους τα 12,25 cm.

Αναλύοντας τα αποτελέσματα της επίδρασης του στρεπτομύκητα OL 7 στον έλεγχο της παθογόνου δράσης του μύκητα *Fusarium oxysporum* DSM62059 σε μη αποστειρωμένο έδαφος, προέκυψε ότι οι σπόροι που είχαν καλυφθεί με τα σπόρια του στρεπτομύκητα είχαν την ικανότητα να φυτρώνουν σε ποσοστό 92 %. Τα φυτά που αναπτύχθηκαν ήταν αρκετά ψηλά, με μέσο ύψος 14,78 cm και δυνατά με μέσο βάρος 0,55 g.

Όταν στο μη αποστειρωμένο έδαφος χορηγήθηκε διάλυμα σπορίων του στελέχους OL 7, το ποσοστό της φύτευσης μειώθηκε στο 88 % σε σχέση με την προηγούμενη δοκιμασία. Αναλογικά μειώθηκε και το βάρος των φυτών που προέκυψαν (μέσο βάρος = 0,49 g), ενώ το μέσο ύψος τους αυξήθηκε περισσότερο από 1 cm (μέσο ύψος = 15,91 cm). Σε καμία, ωστόσο, περίπτωση δεν παρατηρήθηκε παθολογικός φαινότυπος, σε κανένα από τα φυτά που εξετάστηκαν.

Η παρουσία των σπορίων του στρεπτομύκητα AMO 58 στην επιφάνεια των σπορόφυτων της τομάτας ανέβασε το ποσοστό της φύτευσής τους σε μη αποστειρωμένο και μολυσμένο χώμα στο 94 %. Το αποτέλεσμα αυτό ελάχιστα διαφέρει από το αντίστοιχο του θετικού μάρτυρα (96 %). Τα φυτά που ανέκυψαν ήταν τα ψηλότερα που εξετάστηκαν (μέσο ύψος = 16,82 cm) και το μέσο βάρος τους έφτασε τα 0,56 g.

Οι παραπάνω τιμές μειώνονται, καθώς τα σπόρια του στρεπτομύκητα AMO 58 εφαρμόζονται με τη μορφή εναιωρήματος απευθείας στο μη αποστειρωμένο χώμα που έχει μολυνθεί με τον *Fusarium oxysporum* DSM62059. Το ποσοστό φύτευσης υπολογίστηκε στο 90,25 %, το οποίο, αν και είναι πολύ υψηλό, είναι μικρότερο από το αντίστοιχο της προηγούμενης διαδικασίας. Τα φυτά που αναπτύχθηκαν είχαν κατά μέσο όρο βάρος στατιστικά ασήμαντης διαφοράς σε σχέση με την προηγούμενη διαδικασία, ενώ το μέσο ύψος τους ήταν 16,1 cm. Και σε αυτή την περίπτωση όλα τα φυτά που αναπτύχθηκαν είχαν απολύτως υγιή εμφάνιση. (Εικόνα 3.66).



Εικόνα 3.66. Φωτογραφίες που απεικονίζουν τον μέσο όρο της εμφάνισης των φυτών που προέκυψαν από σπόρους επεξεργασμένους με τους εξεταζόμενους παράγοντες βιοελέγχου (Α. CR 14, Β. GRE 5, Γ. REA 17, Δ. OL 7, Ε. AMO 58), όταν φυτεύτηκαν σε αποστειρωμένο χώμα, μολυσμένο με τον φυτοπαθογόνο μύκητα *Fusarium oxysporum* DSM62059

Συγκεντρώνοντας τα αποτελέσματα από τις δοκιμασίες διερεύνησης της ικανότητας επιλεγμένων στρεπτομυκήτων να προστατεύουν σπόρους φασολιάς από την παθογόνο δράση του μύκητα *Rhizoctonia solani* DSM843 με την εφαρμογή τους είτε

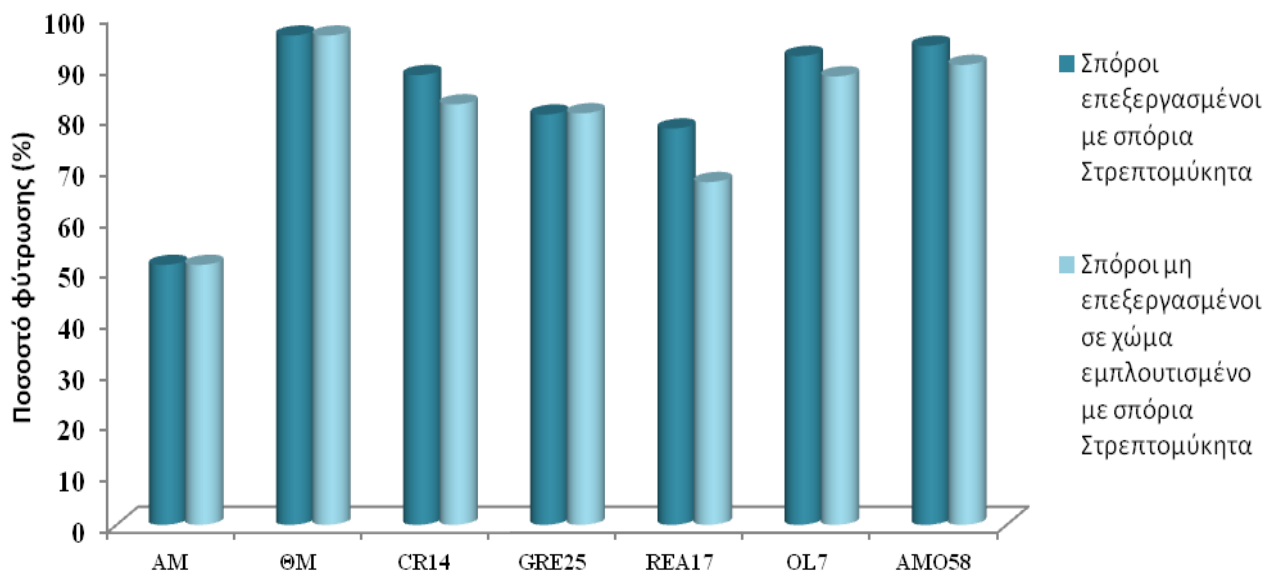
πάνω στους σπόρους είτε στο χρησιμοποιούμενο μη αποστειρωμένο έδαφος, προκύπτουν οι παρακάτω εικόνες (Εικόνες 3.67 – 3.69).

Με εξαίρεση τον στρεπτομύκητα GRE 25, του οποίου η μέθοδος εφαρμογής στο εξεταζόμενο σύστημα φαίνεται να μην επηρεάζει την απόδοση ανάπτυξης των σπορόφυτων τομάτας σε μη αποστειρωμένο και μολυσμένο με τον *Fusarium oxysporum* DSM62059, για τους υπόλοιπους εξεταζόμενους στρεπτομύκητες φαίνεται η μέθοδος εφαρμογής να είναι σημαντική για την αποτελεσματικότητά τους ως παραγόντων βιοελέγχου. Συγκεκριμένα, οι στρεπτομύκητες CR 14, REA 17, AMO 58 και OL 7 μπορούν να προστατέψουν αποτελεσματικότερα, αποδίδοντας υψηλότερα ποσοστά φύτρωσης και ανάπτυξης, τα σπορόφυτα τομάτας από τον φυτοπαθογόνο μύκητα σε μη αποστειρωμένο έδαφος, όταν τα σπόριά τους χρησιμοποιούνται για την επεξεργασία των σπόρων και των νεαρών σπορόφυτων του φυτού.

Η πλειονότητα των στρεπτομυκήτων ευνόησαν την ανάπτυξη των σποροφύτων τομάτας, αποδίδοντας φυτά πολύ δυνατά, όταν τα σπόριά τους χρησιμοποιήθηκαν για την επεξεργασία των σπορόφυτων πριν τη φύτευσή τους στο μη αποστειρωμένο και μολυσμένο με τον φυτοπαθογόνο μύκητα έδαφος. Τα σπορόφυτα που φυτεύτηκαν σε μη αποστειρωμένο έδαφος, μολυσμένο με τον *Fusarium oxysporum* DSM62059, στο οποίο είχε επιπλέον εντεθεί διάλυμα σπορίων των CR 14, REA 17, AMO 58 και OL 7 ήταν σαφώς πιο αδύναμα και ελαφρύτερα. Εντελώς αντίστροφα έδρασε ο στρεπτομύκητας GRE 25, ο οποίος εκδήλωσε εντονότερη αντιμυκητιακή ικανότητα, όταν τα σπόριά του εφαρμόστηκαν στο έδαφος και όχι στα σπορόφυτα, οδηγώντας έτσι στην ανάπτυξη δυνατότερων φυτών.

Σχετικά με το ύψος των φυτών τομάτας, η επίδραση της μεθόδου εφαρμογής των εξεταζόμενων παραγόντων βιοελέγχου στο μελετούμενο σύστημα φαίνεται να μην παίζει, γενικά, κρίσιμο ρόλο. Σχεδόν ανεξάρτητα με το πώς χρησιμοποιήθηκαν οι στρεπτομύκητες για να προστατέψουν τα σπορόφυτα τομάτας από την παθογόνο δράση του *Fusarium oxysporum* DSM62059, τα φυτά τομάτας που αναπτύχθηκαν ήταν πολύ ψηλά. Η πιο σημαντική εξαίρεση προέρχεται από τον στρεπτομύκητα REA 17, που η παρουσία των σπορίων του στα σπορόφυτα πριν τη φύτευση τα ευνοεί στην απόδοση ψηλότερων φυτών από εκείνα που αναπτύσσονται από μη επεξεργασμένα σπορόφυτα φυτεμένα σε έδαφος με σπόριά του. Αντίστοιχα αποτελέσματα

προέκυψαν και από τη μελέτη του AMO 58, ενώ αντίστροφα αποτελέσματα καταγράφηκαν από τη μελέτη του στρεπτομύκητα OL 7.



Εικόνα 3.67. Επί τοις εκατό ποσοστό φύτευσης σπορόφυτων τομάτας σε έδαφος μη αποστειρωμένο και μολυσμένο με τον φυτοπαθογόνο μύκητα *Fusarium oxysporum* DSM62059

AM: Αρνητικός Μάρτυρας – Μη επεξεργασμένα σπορόφυτα τομάτας, φυτεμένα σε μη αποστειρωμένο έδαφος, μολυσμένο με τον μύκητα

ΘΜ: Θετικός Μάρτυρας – Μη επεξεργασμένα σπορόφυτα τομάτας, φυτεμένα σε μη αποστειρωμένο έδαφος

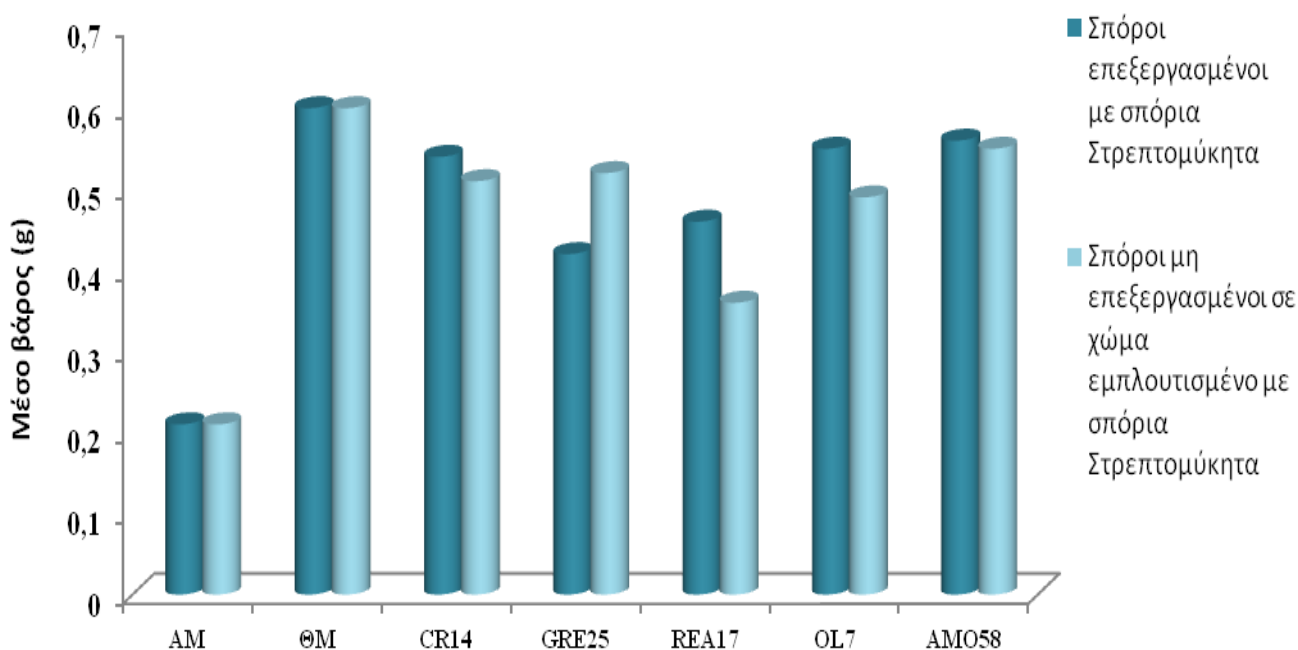
CR 14: Σπορόφυτα τομάτας, επεξεργασμένα με σπόρια του στρεπτομύκητα CR 14, φυτεμένα σε μη αποστειρωμένο έδαφος, μολυσμένο με τον μύκητα και σπορόφυτα τομάτας, φυτεμένα σε μη αποστειρωμένο έδαφος, μολυσμένο με τον μύκητα και εμπλουτισμένο με σπόρια του στρεπτομύκητα CR 14

GRE 25: Σπορόφυτα τομάτας, επεξεργασμένα με σπόρια του στρεπτομύκητα GRE 25, φυτεμένα σε μη αποστειρωμένο έδαφος, μολυσμένο με τον μύκητα και σπορόφυτα τομάτας, φυτεμένα σε μη αποστειρωμένο έδαφος, μολυσμένο με τον μύκητα και εμπλουτισμένο με σπόρια του στρεπτομύκητα GRE 25

REA 17: Σπορόφυτα τομάτας, επεξεργασμένα με σπόρια του στρεπτομύκητα REA 17, φυτεμένα σε μη αποστειρωμένο έδαφος, μολυσμένο με τον μύκητα και σπορόφυτα τομάτας, φυτεμένα σε μη αποστειρωμένο έδαφος, μολυσμένο με τον μύκητα και εμπλουτισμένο με σπόρια του στρεπτομύκητα REA 17

OL 7: Σπορόφυτα τομάτας, επεξεργασμένα με σπόρια του στρεπτομύκητα OL 7, φυτεμένα σε μη αποστειρωμένο έδαφος, μολυσμένο με τον μύκητα και σπορόφυτα τομάτας, φυτεμένα σε μη αποστειρωμένο έδαφος, μολυσμένο με τον μύκητα και εμπλουτισμένο με σπόρια του στρεπτομύκητα OL 7

AMO 58: Σπορόφυτα τομάτας, επεξεργασμένα με σπόρια του στρεπτομύκητα AMO 58, φυτεμένα σε μη αποστειρωμένο έδαφος, μολυσμένο με τον μύκητα και σπορόφυτα τομάτας, φυτεμένα σε μη αποστειρωμένο έδαφος, μολυσμένο με τον μύκητα και εμπλουτισμένο με σπόρια του στρεπτομύκητα AMO 58



Εικόνα 3.68. Μέσο βάρος φυτών τομάτας σε έδαφος μη αποστειρωμένο και μολυσμένο με τον φυτοπαθογόνο μύκητα *Fusarium oxysporum* DSM62059

AM: Αρνητικός Μάρτυρας – Μη επεξεργασμένα σπορόφυτα τομάτας, φυτεμένα σε μη αποστειρωμένο έδαφος, μολυσμένο με τον μύκητα

ΘΜ: Θετικός Μάρτυρας – Μη επεξεργασμένα σπορόφυτα τομάτας, φυτεμένα σε μη αποστειρωμένο έδαφος

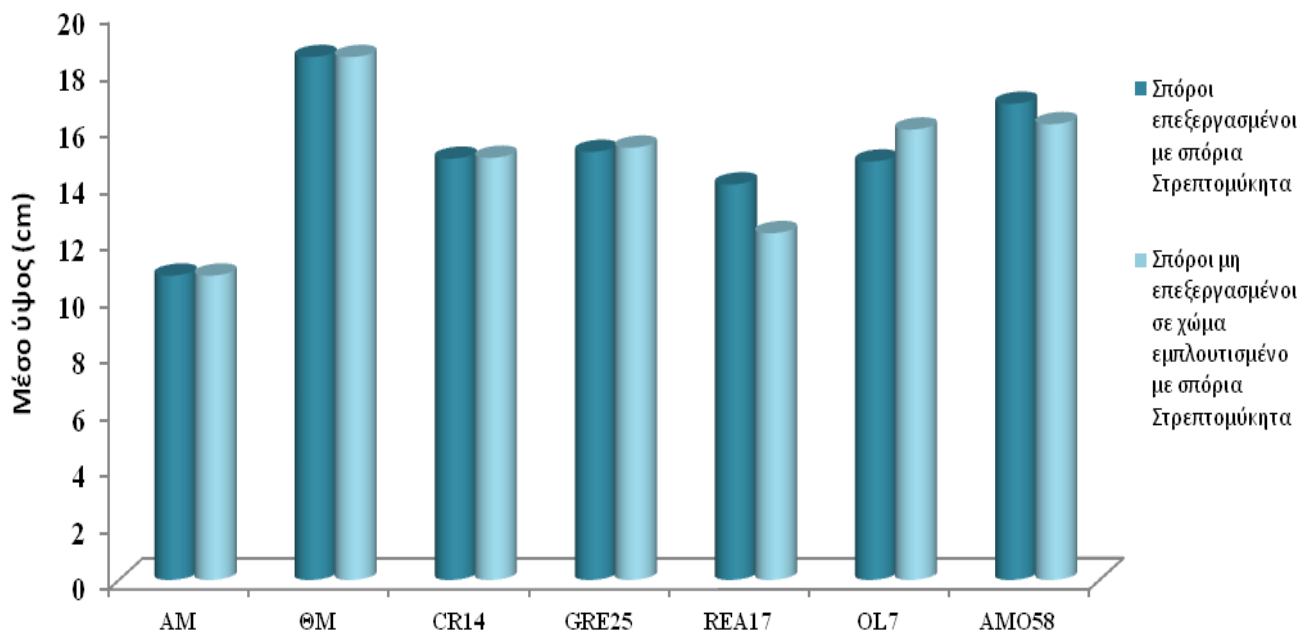
CR 14: Σπορόφυτα τομάτας, επεξεργασμένα με σπόρια του στρεπτομύκητα CR 14, φυτεμένα σε μη αποστειρωμένο έδαφος, μολυσμένο με τον μύκητα και σπορόφυτα τομάτας φυτεμένα, σε μη αποστειρωμένο έδαφος, μολυσμένο με τον μύκητα και εμπλουτισμένο με σπόρια του στρεπτομύκητα CR 14

GRE 25: Σπορόφυτα τομάτας, επεξεργασμένα με σπόρια του στρεπτομύκητα GRE 25, φυτεμένα σε μη αποστειρωμένο έδαφος, μολυσμένο με τον μύκητα και σπορόφυτα τομάτας, φυτεμένα σε μη αποστειρωμένο έδαφος, μολυσμένο με τον μύκητα και εμπλουτισμένο με σπόρια του στρεπτομύκητα GRE 25

REA 17: Σπορόφυτα τομάτας, επεξεργασμένα με σπόρια του στρεπτομύκητα REA 17, φυτεμένα σε μη αποστειρωμένο έδαφος, μολυσμένο με τον μύκητα και σπορόφυτα τομάτας, φυτεμένα σε μη αποστειρωμένο έδαφος, μολυσμένο με τον μύκητα και εμπλουτισμένο με σπόρια του στρεπτομύκητα REA 17

OL 7: Σπορόφυτα τομάτας, επεξεργασμένα με σπόρια του στρεπτομύκητα OL 7, φυτεμένα σε μη αποστειρωμένο έδαφος, μολυσμένο με τον μύκητα και σπορόφυτα τομάτας, φυτεμένα σε μη αποστειρωμένο έδαφος, μολυσμένο με τον μύκητα και εμπλουτισμένο με σπόρια του στρεπτομύκητα OL 7

AMO 58: Σπορόφυτα τομάτας, επεξεργασμένα με σπόρια του στρεπτομύκητα AMO 58, φυτεμένα σε μη αποστειρωμένο έδαφος, μολυσμένο με τον μύκητα και σπορόφυτα τομάτας, φυτεμένα σε μη αποστειρωμένο έδαφος μολυσμένο με τον μύκητα και εμπλουτισμένο με σπόρια του στρεπτομύκητα AMO 58



Εικόνα 3.69. Μέσο ύψος φυτών τομάτας σε έδαφος μη αποστειρωμένο και μολυσμένο με τον φυτοπαθογόνο μύκητα *Fusarium oxysporum* DSM62059

AM: Αρνητικός Μάρτυρας – Μη επεξεργασμένα σπορόφυτα τομάτας, φυτεμένα σε μη αποστειρωμένο έδαφος, μολυσμένο με τον μύκητα

ΘΜ: Θετικός Μάρτυρας – Μη επεξεργασμένα σπορόφυτα τομάτας, φυτεμένα σε μη αποστειρωμένο έδαφος

CR 14: Σπορόφυτα τομάτας, επεξεργασμένα με σπόρια του στρεπτομύκητα CR 14, φυτεμένα σε μη αποστειρωμένο έδαφος, μολυσμένο με τον μύκητα και σπορόφυτα τομάτας, φυτεμένα σε μη αποστειρωμένο έδαφος, μολυσμένο με τον μύκητα και εμπλουτισμένο με σπόρια του στρεπτομύκητα CR 14

GRE 25: Σπορόφυτα τομάτας, επεξεργασμένα με σπόρια του στρεπτομύκητα GRE 25, φυτεμένα σε μη αποστειρωμένο έδαφος, μολυσμένο με τον μύκητα και σπορόφυτα τομάτας, φυτεμένα σε μη αποστειρωμένο έδαφος, μολυσμένο με τον μύκητα και εμπλουτισμένο με σπόρια του στρεπτομύκητα GRE 25

REA 17: Σπορόφυτα τομάτας, επεξεργασμένα με σπόρια του στρεπτομύκητα REA 17, φυτεμένα σε μη αποστειρωμένο έδαφος, μολυσμένο με τον μύκητα και σπορόφυτα τομάτας, φυτεμένα σε μη αποστειρωμένο έδαφος, μολυσμένο με τον μύκητα και εμπλουτισμένο με σπόρια του στρεπτομύκητα REA 17

OL 7: Σπορόφυτα τομάτας, επεξεργασμένα με σπόρια του στρεπτομύκητα OL 7, φυτεμένα σε μη αποστειρωμένο έδαφος, μολυσμένο με τον μύκητα και σπορόφυτα τομάτας, φυτεμένα σε μη αποστειρωμένο έδαφος, μολυσμένο με τον μύκητα και εμπλουτισμένο με σπόρια του στρεπτομύκητα OL 7

AMO 58: Σπορόφυτα τομάτας, επεξεργασμένα με σπόρια του στρεπτομύκητα AMO 58, φυτεμένα σε μη αποστειρωμένο έδαφος, μολυσμένο με τον μύκητα και σπορόφυτα τομάτας, φυτεμένα σε μη αποστειρωμένο έδαφος, μολυσμένο με τον μύκητα και εμπλουτισμένο με σπόρια του στρεπτομύκητα AMO 58

3.9.3. Διερεύνηση της ικανότητας επιλεγμένων στρεπτομυκήτων να προωθούν τη φύτευση

3.9.3.1. Διερεύνηση της ικανότητας επιλεγμένων στρεπτομυκήτων να προωθούν τη φύτευση και την ανάπτυξη φυτών φασολιάς σε αποστειρωμένο έδαφος

Με σκοπό να μελετηθεί η ικανότητα επιλεγμένων στρεπτομυκήτων να προωθούν την ανάπτυξη φυτών φασολιάς, οι *in vivo* δοκιμασίες επαναλήφθηκαν σε αποστειρωμένο έδαφος (§2.8.6 B) με τη διαφορά ότι το χώμα δεν μολύνθηκε από τον φυτοπαθογόνο μύκητα ενώ οι σπόροι φασολιού υπέστησαν επεξεργασία με τους επιλεγμένους στρεπτομύκητες. Έτσι διερευνάται, επιπλέον, η ικανότητα των μικροοργανισμών αυτών να προωθούν την ανάπτυξη του φυτού απουσία του φυτοπαθογόνου παράγοντα.

Επίσης, μέσω της αξιολόγησης των προηγούμενων αποτελεσμάτων δείχθηκε ότι αποτελεσματικότερος παράγοντας βιοελέγχου του φυτοπαθογόνου μύκητα *Rhizoctonia solani* DSM843 στις *in vivo* δοκιμασίες ήταν ο στρεπτομύκητας GRE 25. Έτσι, ο μικροοργανισμός αυτός μελετήθηκε ως προς την ικανότητά του να προωθεί την ανάπτυξη φυτών φασολιάς, τα οποία μετά την κάλυψή τους με τα σπόρια του στρεπτομύκητα φυτεύθηκαν σε αποστειρωμένο έδαφος. Για τον σκοπό αυτό, μετρήθηκε το ποσοστό των σπόρων που φύτευσαν και οδήγησαν σε φυτά φασολιού, καθώς και το βάρος και το ύψος των φυτών αυτών. Ως μάρτυρας (M) χρησιμοποιήθηκε ίδιος αριθμός μη επεξεργασμένων σπόρων φασολιού, οι οποίοι φυτεύθηκαν σε αποστειρωμένο έδαφος.

Πίνακας 3.44. Ποσοστό φύτευσης σπόρων φασολιού σε αποστειρωμένο χώμα και παράμετροι φύτευσης που μετρήθηκαν (μέσο ύψος και μέσο βάρος) στα φυτά φασολιού που αναπτύχθηκαν

M: μη επεξεργασμένοι σπόροι φασολιού, φυτεμένοι σε αποστειρωμένο χώμα

GRE 25: σπόροι φασολιού, καλυμμένοι με σπόρια του στρεπτομύκητα GRE 25, φυτεμένοι σε αποστειρωμένο χώμα

| | Ποσοστό φύτευσης (%) | Μέσο βάρος (g) | Μέσο ύψος (cm) |
|---------------|----------------------|----------------|----------------|
| M | 91,7 | 3,08 | 36,45 |
| GRE 25 | 50 | 2,37 | 30,17 |

Σύμφωνα με τις μετρήσεις, όπως αυτές παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.44, οι μη επεξεργασμένοι σπόροι φασολιού φύτευσαν σε ποσοστό πολύ κοντά στο 100 %,

όταν φυτεύθηκαν σε αποστειρωμένο έδαφος και τα φυτά που προέκυψαν ήταν υγιή, ψηλά και δυνατά. Το ποσοστό φύτευσης σπόρων φασολιού, επεξεργασμένων με σπόρια του στρεπτομύκητα GRE 25 ήταν 50 %, δηλαδή το μισό από αυτό των μη επεξεργασμένων σπόρων και τα φυτά που ανέκυψαν από αυτούς ήταν αρκετά εύρωστα αλλά με μειωμένο κατά 30 % περίπου το μέσο βάρος τους και κατά 17 % περίπου το ύψος τους. Σύμφωνα με τα παραπάνω, ο στρεπτομύκητας GRE 25, ενώ μπορεί να μειώνει αποτελεσματικά την παθογόνο δράση του φυτοπαθογόνου μύκητα *Rhizoctonia solani* DSM843 σε φυτά φασολιού, όταν είναι ο μόνος μικροοργανισμός στο περιβάλλον των σπόρων, μειώνει τόσο τη φύτευση όσο και την ανάπτυξη των φυτών φασολιάς. Έτσι, αποδεικνύεται η ικανότητά του να δρα ως αυξητικός παράγοντας στην ανάπτυξη των φυτών αυτών.

3.9.3.2. Διερεύνηση της ικανότητας επιλεγμένων στρεπτομυκήτων να προωθούν τη φύτευση και την ανάπτυξη σπορόφυτων τομάτας σε αποστειρωμένο έδαφος

Οι *in vivo* δοκιμασίες επαναλήφθηκαν σε αποστειρωμένο έδαφος απουσία του φυτοπαθογόνου μύκητα, ενώ τα σπορόφυτα τομάτας υπέστησαν επεξεργασία με τους επιλεγμένους στρεπτομύκητες (§2.8.6 B) με σκοπό τη μελέτη της ικανότητας επιλεγμένων στρεπτομυκήτων να προωθούν την ανάπτυξη φυτών τομάτας. Έτσι, εξετάστηκε η ικανότητα των μικροοργανισμών αυτών να προωθούν την ανάπτυξη του φυτού απουσία του φυτοπαθογόνου παράγοντα.

Αξιολογώντας τα αποτελέσματα των προηγούμενων πειραμάτων, επιλέχθηκαν οι στρεπτομύκητες GRE 25 και OL 7 να ελεγχθούν ως προς την ικανότητά τους να προωθούν την ανάπτυξη των φυτών τομάτας. Έτσι, διάλυμα σπορίων των στρεπτομυκήτων αυτών χρησιμοποιήθηκε για την επεξεργασία σπορόφυτων τομάτας τα οποία στη συνέχεια φυτεύθηκαν σε αποστειρωμένο έδαφος. Προσδιορίστηκε το ποσοστό των σπορόφυτων που φύτευσαν και οδήγησαν σε φυτά τομάτας, καθώς και το βάρος και το ύψος των φυτών αυτών. Ως μάρτυρας (M) χρησιμοποιήθηκε ίδιος αριθμός μη επεξεργασμένων σπορόφυτων τομάτας, τα οποία φυτεύθηκαν σε αποστειρωμένο έδαφος.

Από την ανάλυση των αποτελεσμάτων, όπως αυτά παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.45, τα μη επεξεργασμένα σπορόφυτα τομάτας φύτευσαν σε ποσοστό της τάξης του 95

%, όταν φυτεύθηκαν σε αποστειρωμένο έδαφος. Τα φυτά που προέκυψαν ήταν υγιή με το μέσο βάρος τους να υπολογίζεται περίπου στο μισό γραμμάριο, ενώ το μέσο ύψος τους να είναι 15 cm. Το ποσοστό φύτευσης σπορόφυτων τομάτας, επεξεργασμένων με σπόρια του στρεπτομύκητα GRE 25 όσο και εκείνων που υπέστησαν επεξεργασία με σπόρια του στρεπτομύκητα OL 7 ήταν 100 %. Το μέσο βάρος των πρώτων ξεπέρασε εκείνο του μάρτυρα κατά 0,3 g περίπου, ενώ το μέσο βάρος των δεύτερων ξεπέρασε τον μάρτυρα κατά περίπου 0,2 g. Επιπρόσθετα, τα φυτά που φύτευσαν από σπορόφυτα, επεξεργασμένα με τον στρεπτομύκητα GRE 25 ήταν κατά μέσο όρο 4 cm ψηλότερα από τον μάρτυρα, ενώ τα φυτά που φύτευσαν από σπορόφυτα, επεξεργασμένα με τον στρεπτομύκητα OL 7 ήταν μόλις κατά 0,37 cm ψηλότερα από τον μάρτυρα. Σύμφωνα με τα παραπάνω, φαίνεται ότι και οι δύο μικροοργανισμοί προωθούν τόσο τη φύτευση όσο και τις υπόλοιπες παραμέτρους αύξησης των φυτών τομάτας και μπορούν να χαρακτηριστούν ως αυξητικοί παράγοντες για το φυτό αυτό. Προκύπτει επίσης ότι ο στρεπτομύκητας GRE 25 προωθεί την αύξηση των φυτών τομάτας αλλά όχι των φυτών φασολιάς.

Πίνακας 3.45. Ποσοστό φύτευσης σπορόφυτων τομάτας σε αποστειρωμένο χώμα και παράμετροι φύτευσης που μετρήθηκαν (μέσο ύψος και μέσο βάρος) στα φυτά τομάτας που αναπτύχθηκαν

M: μη επεξεργασμένα σπορόφυτα τομάτας, φυτεμένα σε αποστειρωμένο χώμα

GRE 25: σπορόφυτα τομάτας, επεξεργασμένα με διάλυμα σπορίων του στρεπτομύκητα GRE 25, φυτεμένα σε αποστειρωμένο χώμα

OL 7: σπορόφυτα τομάτας, επεξεργασμένα με διάλυμα σπορίων του στρεπτομύκητα OL 7, φυτεμένα σε αποστειρωμένο χώμα

| | Ποσοστό φύτευσης (%) | Μέσο βάρος (g) | Μέσο ύψος (cm) |
|---------------|----------------------|----------------|----------------|
| M | 95 | 0,51 | 15,01 |
| GRE 25 | 100 | 0,79 | 19,00 |
| OL 7 | 100 | 0,69 | 15,38 |

4

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Εκπρόσωποι του γένους των Στρεπτομυκήτων έχουν ευρύτατα χρησιμοποιηθεί σε διάφορες μελέτες ως παράγοντες βιοελέγχου μεγάλης ποικιλίας φυτικών ασθενειών (Sowndhararajan και Kang, 2012, Oskay, 2009, Abd-Allah, 2001, Getha και Vikineswary, 2002, Neeno-Eckwall και συνεργάτες, 2001, Shekhar και συνεργάτες, 2006, Yuan και Crawford, 1995). Η απομόνωση μικροοργανισμών με αντιμυκητιακή δράση με σκοπό τη χρήση τους ως παραγόντων βιοελέγχου έχει αξιοποιήσει ριζόσφαιρες διάφορων φυτών, όπως της τομάτας (Goudjal και συνεργάτες, 2013, Cao και συνεργάτες, 2004), του πεύκου (de Vasconcellos και Cardoso, 2009) ή του καπνού (Huang και συνεργάτες, 2014). Ωστόσο, είναι περιορισμένες οι μελέτες, κατά τις οποίες ενδημικά στελέχη στρεπτομυκήτων απομονωμένα από διάφορα οικοσυστήματα έχουν εξεταστεί και αξιολογηθεί ως πιθανοί παράγοντες βιοελέγχου (Gomes και συνεργάτες, 2000, Neeno-Eckwall και συνεργάτες, 2001, Shekhar και συνεργάτες, 2006, Baniasadi και συνεργάτες, 2009).

4.1. ΕΠΙΛΟΓΗ ΣΤΡΕΠΤΟΜΥΚΗΤΩΝ ΜΕ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ ΤΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΤΩΝ ΦΥΤΟΠΑΘΟΓΟΝΩΝ ΜΥΚΗΤΩΝ

Στην παρούσα Διατριβή ένα σύνολο 606 στρεπτομυκήτων, οι οποίοι προέρχονται από δώδεκα διαφορετικά, ιδιαίτερα και σημαντικά ενδιαιτήματα από όλη την Ελλάδα ελέγχθηκε ως προς την ανταγωνιστική του ικανότητα έναντι των φυτοπαθογόνων μυκήτων *Rhizoctonia solani* DSM843 και *Fusarium oxysporum* DSM62059 και η αντιμυκητιακή δράση των μικροοργανισμών που επιλέχθηκαν διερευνήθηκε περαιτέρω και αξιολογήθηκε τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα προηγούμενων μελετών, οι στρεπτομύκητες της συλλογής του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας του Πανεπιστημίου Αθηνών, οι οποίοι χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα Διατριβή, ταξινομήθηκαν σε 19 διαφορετικές ομάδες με κριτήριο τα φαινοτυπικά (μορφολογικά και βιοχημικά) χαρακτηριστικά τους (Katsifas και συνεργάτες, 1999). Σύμφωνα με αυτή την ταξινόμηση, κάποια από τα είδη βακτηρίων που αναγνωρίστηκαν δείχθηκε να είναι παρόντα σε περισσότερα από ένα από τα ενδιαιτήματα και κάποια άλλα ήταν μοναδικά καθώς απομονώθηκαν μόνο από ένα ενδιαίτημα.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας Διατριβής προκύπτει ότι υψηλό ποσοστό των απομονωθέντων στρεπτομυκήτων επέδειξαν την ικανότητα να αναστέλλουν την ανάπτυξη του *Rhizoctonia solani* DSM843 καθώς και ότι η

διαταραγμένη καλλιεργήσιμη έκταση του Μαραθώνα, το νερό και το ίζημα από τις θερμοπηγές των Θερμοπυλών, η ριζόσφαιρα αείφυλλων θάμνων αυτοφυών σε νησί του Αιγαίου (Σάμος) και η ριζόσφαιρα του φυτού *Pinus brutia* (ενδημικό φυτό της Κρήτης) διαθέτουν ένα πλούσιο μικροβιακό φορτίο, το οποίο φιλοξενεί πληθώρα στρεπτομυκήτων με ανταγωνιστική δράση έναντι του φυτοπαθογόνου μύκητα *Rhizoctonia solani* DSM843, πολλοί από τους οποίους την εκφράζουν με μεγάλη ένταση.

Συγκεκριμένα, τα αποτελέσματα από τα πειράματα κατά τα οποία η αντιμυκητιακή δράση των στρεπτομυκήτων εξετάστηκε *in vitro*, έδειξαν ότι πάνω από το ένα τρίτο των βακτηρίων μπορούσαν να αναστείλουν την ανάπτυξη του μύκητα *Rhizoctonia solani* DSM843. Ένα τέτοιο ποσοστό (σχεδόν 35 %) επιβεβαιώνει ότι το γένος των στρεπτομυκήτων διαθέτει πολλούς εκπροσώπους στα ελλαδικά οικοσυστήματα, που έχουν χαρακτηριστικά κατάλληλα για βιοτεχνολογικές εφαρμογές και ιδιαίτερα για την αξιοποίησή τους στο πεδίο του βιοελέγχου. Το πλήθος και το ποσοστό των στρεπτομυκήτων με ανταγωνιστικές ιδιότητες που απομονώθηκε από τα οικοσυστήματα της Ελλάδας είναι υψηλό τόσο αξιολογώντας το μεμονωμένα όσο και συγκριτικά με τα αποτελέσματα ανάλογων μελετών σε ποικιλία οικοσυστημάτων άλλων περιοχών του πλανήτη, καθώς, για παράδειγμα, στην Αλγερία, όπου η δειγματοληψία από διάφορα ενδιαιτήματά της απέδωσε 133 στρεπτομύκητες, το 25 % των οποίων είχαν ανταγωνιστικές ιδιότητες (Yekkour και συνεργάτες, 2012), τη στιγμή που στη Σαουδική Αραβία (El-Naggar και συνεργάτες, 2012), στον Καναδά (Ciampi και Tewari, 1990) ή στο Ιράν (Sarani, 2012) το πλήθος των ανταγωνιστικών στρεπτομυκήτων είναι μονοψήφιο. Το παραπάνω εύρημα υποστηρίζεται επίσης από τα αποτελέσματα προηγούμενων μελετών στα ελλαδικά ενδιαιτήματα από όπου στρεπτομύκητες με έντονη και πλούσια μεταβολική δραστηριότητα απομονώθηκαν και μελετήθηκαν. Το 2006 ο Baur και οι συνεργάτες του απομόνωσαν από το στέλεχος *Streptomyces lavendulae* Acta 1383, το οποίο προερχόταν από τη ριζόσφαιρα του φυτού *Ebenus sibthorpii* (Fabaceae), μια ομάδα Φλουαστατινών, βιοενεργών ουσιών που εκδήλωσαν μικρή αντιμικροβιακή δράση αλλά ισχυρότατη κυτταροστατική δραστηριότητα έναντι διάφορων καρκινικών σειρών. Λίγο αργότερα, το 2008, ο Paululat και οι συνεργάτες του χαρακτήρισαν τέσσερις νέες ενώσεις, που παράγονται από στρεπτομύκητες απομονωμένους από ελλαδικά ενδιαιτήματα, οι οποίες δηλώνοντας την προέλευσή τους ονομάστηκαν Γκρεκοκετίδια και Γκρεκοκυκλίνες και οι οποίες περιγράφονται ως ισχυρά

αντιβιοτικά και κυτταροτοξίνες. Συνδυάζοντας τα παραπάνω ενισχύεται το συμπέρασμα ότι τα ενδημικά ελληνικά στελέχη Στρεπτομυκήτων είναι πολυπαραγωγικά σε σύγκριση με στρεπτομυκήτες απομονωμένους από άλλες χώρες (ACTAPHARM, Final Report, 2005, <http://cordis.europa.eu/library>).

Η Ελλάδα διαθέτει πολύ μεγάλη ποικιλία ζώων, φυτών, μυκήτων, φυκών, μικροοργανισμών και οικοσυστημάτων, από τις μεγαλύτερες στην Ευρώπη. Ευρισκόμενη στο σταυροδρόμι τριών ηπείρων, με ποικίλη γεωμορφολογία και μεγάλο κλιματολογικό εύρος, αλλά και με ιδιαίτερα μακρόχρονη ιστορία συνύπαρξης του ανθρώπου με τη φύση, έχει αποκτήσει μια ξεχωριστή βιοποικιλότητα με ιδιαίτερες φυτικές και ζωικές μορφές, αρκετές από τις οποίες δεν υπάρχουν πουθενά αλλού στον κόσμο (<http://www.biodiversity.gr/maindetails.php?recordID=3>). Η έντονη ποικιλομορφία των οικολογικών χαρακτηριστικών και η έντονη εναλλαγή αυτών από περιοχή σε περιοχή της Ελλάδας αντανακλούν σε αντίστοιχη ποικιλομορφία στη σύσταση της μικροβιακής κοινότητας σε κάθε περιοχή. Οι ιδιαίτερες περιβαλλοντικές συνθήκες κάθε ενδιαιτήματος αποτελούν κριτήριο για την αναζήτηση σε αυτό μικροοργανισμών με επιθυμητές και, κατά το πλείστον, βιοτεχνολογικά αξιοποιήσιμες ιδιότητες ενώ παράλληλα είναι σε θέση να εξηγήσουν τις συμπεριφορές των μικροοργανισμών που εποίκουν σε αυτά. Έτσι, το κλίμα του Αιγαίου Πελάγους, το οποίο περιγράφεται από υψηλές θερμοκρασίες και ξηρασία, έχει σαν αποτέλεσμα τα εδάφη των νησιών του Αιγαίου Πελάγους να στερούνται διαθέσιμων θρεπτικών συστατικών. Δημιουργούνται έτσι οι ιδανικές προϋποθέσεις για την εκδήλωση ανταγωνιστικών συμπεριφορών μεταξύ των μικροοργανισμών αυτών των οικοσυστημάτων λόγω της πίεσης που προκαλείται στην αναζήτηση θρεπτικών στοιχείων. Επικρατούν έτσι οι μικροοργανισμοί εκείνοι, οι οποίοι στον αγώνα για επιβίωση έχουν πλεονέκτημα διαθέτοντας ισχυρούς μηχανισμούς ανταγωνισμού με τα υπόλοιπα μικρόβια (Kanini και συνεργάτες 2013). Επιπρόσθετα, οι παραπάνω παρατηρήσεις σε συνδυασμό με το δεδομένο της έντονης ανθρωπογενούς δράσης στα νησιά του Αιγαίου εξηγούν τα υψηλά ποσοστά μικροοργανισμών με αντιμυκητιακή δράση *in vitro* έναντι του *Rhizoctonia solani* DSM843, που απομονώθηκαν από τη ριζόσφαιρα του φυτού *Pinus brutia*, που είναι ενδημικό της Κρήτης (Νότιο Αιγαίο) και από τη ριζόσφαιρα αειθαλών θάμνων, που φύονται στη Σάμο (Ανατολικό Αιγαίο). Απεναντίας, τόσο η ριζόσφαιρα του φυτού *Abies cefalonica* όσο και η ριζόσφαιρα αειθαλών θάμνων, που φύονται σε νησί του

Ιονίου (Καστός), οι οποίες επί τούτου επιλέχθηκαν να προέρχονται από φυτά, που αναπτύσσονται σε περιοχές με την ελάχιστη δυνατή τουριστική και γενικά ανθρώπινη δραστηριότητα, δεν απέδωσαν καθόλου σε στρεπτομύκητες με αντιμυκητιακή δράση, αποτέλεσμα που προφανώς οφείλεται στις εντελώς διαφορετικές συνθήκες, που επικρατούν σε αυτά τα εδάφη. Εκεί η υγρασία είναι υψηλότερη και ο ανθρώπινος παράγοντας απών. Δηλαδή οι παράγοντες που μπορούν να προκαλέσουν περιβαλλοντική πίεση είναι λιγότεροι μην ευνοώντας έτσι εκδήλωση ανταγωνιστικών συμπεριφορών μεταξύ των μελών της εξεταζόμενης μικροβιακής βιοκοινότητας.

Επίσης, υψηλά ποσοστά (53,8 %) στρεπτομυκήτων ανταγωνιστικών έναντι του φυτοπαθογόνου μύκητα *Rhizoctonia solani* DSM843 απομονώθηκαν από δείγμα που δεν ήταν ριζόσφαιρα κάποιου φυτού αλλά προερχόταν από καλλιεργούμενη έκταση στο Νομό Αττικής (Μαραθόνας). Τα εδάφη από τα οποία προέρχεται το δείγμα είναι ιδιαίτερος διαταραγμένα, λόγω της συστηματικής τους καλλιέργειας, η οποία τους απορροφά μεγάλο μέρος των διαθέσιμων θρεπτικών συστατικών. Ωστόσο, λόγω της μεγάλης ποσότητας φυτικής οργανικής ύλης που αποικοδομείται στα εδάφη αυτά αλλά και λόγω της, συνήθως αλόγιστης, χρήσης συνθετικών χημικών ουσιών, όπως φυτοφαρμάκων και λιπασμάτων, τελικά τα οικοσυστήματα είναι πλούσια, γεγονός που φαίνεται να ενισχύει τον φυσικό βιοέλεγχο. Οι Baker και Cook, από το 1974 είχαν παρατηρήσει ότι σε τέτοιες εκτάσεις οι παθογόνοι μικροοργανισμοί μικροοργανισμοί εκδήλωναν ελάχιστα ή και καθόλου την παθογόνο δράση τους παρά το γεγονός ότι οι συνθήκες ήταν ευνοϊκές για αυτούς. Τα εδάφη αυτά, στα οποία, λόγω συστηματικής εφαρμογής πρακτικών καλλιέργειας έχει μειωθεί η εκδήλωση φυτικών ασθενειών φαίνεται να είναι γενικά κατασταλτικά και αυτό συσχετίστηκε με την μικροχλωρίδα τους καθώς αυτά φιλοξενούσαν μεγαλύτερους πληθυσμούς ακτινοβακτηρίων και άλλων βακτηρίων. Ο εμπλουτισμός με οργανική ύλη αυξάνει γενικά τη μικροβιακή δραστηριότητα και όσο πιο δραστήριοι γίνονται οι μικροοργανισμοί τόσο πιθανότερο είναι να εκδηλώσουν ανταγωνιστική συμπεριφορά έναντι παθογόνων (Fry, 1982). Οι συνθήκες που δημιουργούνται, σε συνδυασμό και με τα φυσικά χαρακτηριστικά της περιοχής (κλίμα: μεσαίες-υψηλές θερμοκρασίες) επηρεάζουν τη σύσταση της μικροχλωρίδας αυτών των εδαφών, ευνοώντας και σε αυτή την περίπτωση ανταγωνιστικές συμπεριφορές. Εξηγείται έτσι η παρουσία και η απομόνωση πλήθους στρεπτομυκήτων με ικανότητα να ανταγωνίζονται και άρα να αναστέλλουν την ανάπτυξη του *Rhizoctonia solani* DSM843. Επίσης, ένα εντελώς διαφορετικό ενδιαίτημα, οι θερμοπηγές των Θερμοπυλών, αν και δεν απέδωσε

αριθμητικά σε στρεπτομύκητες, ωστόσο απέδωσε 100 % σε βιοενεργούς στρεπτομύκητες. Όλα τα απομονωθέντα στελέχη, αν και ήταν λίγα, ήταν σε θέση να αναστείλουν την ανάπτυξη του *Rhizoctonia solani* DSM843 *in vitro*. Οι περιβαλλοντικές συνθήκες, τις οποίες καλούνται να αντιμετωπίσουν οι μικροοργανισμοί αυτού του περιβάλλοντος είναι πολύ ιδιαίτερες. Η υψηλή θερμοκρασία καθώς και η υψηλή συγκέντρωση θείου και σιδήρου (Hannert, 2002) έχουν ως αποτέλεσμα βακτηριακή ποικιλότητα με ιδιαίτερη σημασία καθώς ενεργοποιούν μονοπάτια του μεταβολισμού των βακτηρίων χάρη στα οποία οι μικροοργανισμοί εκφράζουν ιδιαίτερες συμπεριφορές.

Το ποσοστό του συνόλου των στρεπτομυκήτων, που απομονώθηκαν και εξετάστηκαν *in vitro* ως προς την ικανότητά τους να παρεμποδίζουν την ανάπτυξη του μύκητα *Fusarium oxysporum* DSM62059, οι οποίοι είχαν αυτή την ικανότητα ανήλθε σε πολύ χαμηλότερα από τα αντίστοιχα των μικροοργανισμών που ανέστειλαν τον *Rhizoctonia solani* DSM843 καθώς δεν ξεπέρασαν το 7 %.

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων των *in vitro* δοκιμασιών ελέγχου της ανταγωνιστικής δράσης των ενδημικών στρεπτομυκήτων έδειξε ότι το υψηλότερο ποσοστό μικροοργανισμών με ικανότητα να αναστέλλουν την ανάπτυξη του *Fusarium oxysporum* DSM62059 προέκυψε από τη ριζόσφαιρα αειθαλών θάμνων, που φύονται σε νησί του Αιγαίου (Σάμος) ενώ η ισχυρότερη αντιμυκητιακή δράση καταμετρήθηκε σε μικροοργανισμούς που απομονώθηκαν από τη ριζόσφαιρα του φυτού *Pinus brutia* (Κρήτη). Επίσης, οι στρεπτομύκητες, που απομονώθηκαν από τη ριζόσφαιρα αειθαλών θάμνων, που φύονται σε νησί του Ιονίου, στερούνταν αντιμυκητιακής δραστηριότητας ενώ λίγα στελέχη με δυναμική να χρησιμοποιηθούν ως παράγοντες βιοελέγχου του *Fusarium oxysporum* DSM62059 αναδείχθηκαν από τη ριζόσφαιρα του φυτού *Ceratonia siliqua* ή από το έδαφος, που προερχόταν από καλλιεργούμενη έκταση του Μαραθώνα (Αττική).

Παρά το γεγονός ότι οι στρεπτομύκητες, που επέδειξαν ικανότητα ανταγωνισμού και αναστολής της ανάπτυξης του *Fusarium oxysporum* DSM62059 ήταν λίγοι, τόσο αντικειμενικά όσο και σε σύγκριση με τον αριθμό των μικροοργανισμών που ανέστειλαν την ανάπτυξη του μύκητα *Rhizoctonia solani* DSM843, ωστόσο, συνυπολογίζοντας και τα αποτελέσματα προηγούμενων παρατηρήσεων από τους Kanini και συνεργάτες (2013), Baur και συνεργάτες (2006) και Paululat και συνεργάτες (2008, 2010) υποστηρίζεται και ενισχύεται η υπόθεση ότι οι ενδημικοί

στρεπτομύκητες των ελληνικών οικοσυστημάτων είναι πολυπαραγωγικοί και κατά συνέπεια υποσχόμενοι ποικιλίας βιοτεχνολογικών εφαρμογών, συμπεριλαμβανομένου και του βιοελέγχου των παθογόνων μυκήτων, που προκαλούν επιβαρυντικές για το έδαφος ασθένειες.

Εστιάζοντας στα οικοφυσιολογικά χαρακτηριστικά των ενδαιτημάτων τα οποία φιλοξενούν του στρεπτομύκητες με την εντονότερη αντιμυκητιακή ικανότητα οδηγούμαστε και πάλι στο συμπέρασμα ότι οι περιοχές με τις εντονότερα αντίξοες συνθήκες φιλοξενούν μικροοργανισμούς με ισχυρότερα ανταγωνιστική συμπεριφορά. Έτσι, περιβάλλοντα που περιγράφονται από ακραίες θερμοκρασίες, έλλειψη νερού, φτωχά εδάφη ή έντονη ανθρωπογενή δραστηριότητα, όπως τα νησιά του Αιγαίου ή οι καλλιεργήσιμες εκτάσεις αναμένεται και δείχθηκε να είναι πηγές έντονα ανταγωνιστικών μικροοργανισμών. Αντίθετα, περιοχές με ευνοϊκότερα, για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών, χαρακτηριστικά, δηλαδή πλούσια εδάφη και απουσία της ανθρώπινης παρέμβασης, όπως τα νησιά του Ιονίου Πελάγους ή προστατευόμενες περιοχές (δάσος Καισαριανής) κάνουν τον ανταγωνισμό να ατονεί και την παρουσία πιθανών παραγόντων βιοελέγχου να περιορίζεται.

Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα και τα συμπεράσματα από τον έλεγχο της δυναμικής των ελλαδικών οικοσυστημάτων να φιλοξενούν στρεπτομύκητες με ικανότητα και προοπτική αξιοποίησής τους στο πεδίο του βιοελέγχου τόσο του μύκητα *Rhizoctonia solani* DSM843 όσο και του *Fusarium oxysporum* DSM62059, προκύπτει ότι η πιο έντονη αντιμυκητιακή δραστηριότητα έναντι και των δύο εξεταζόμενων καταγράφηκε σε περιοχές με κοινά οικοφυσιολογικά χαρακτηριστικά. Τα χαρακτηριστικά αυτά, όπως περιγράφηκε παραπάνω, είναι δυνατόν να ερμηνεύσουν τα αποτελέσματα, που προέκυψαν. Είναι αδύνατο, ωστόσο να μη σημειωθεί ότι ο αριθμός των στρεπτομυκήτων, που δείχθηκε να αναστέλλουν τον *Rhizoctonia solani* DSM843 ήταν πολλαπλάσιος του αριθμού των στρεπτομυκήτων, που επέδειξαν ικανότητα αναστολής του *Fusarium oxysporum* DSM62059. Η διαφορά αυτή μπορεί να ερμηνευθεί από το γεγονός ότι στα οικοσυστήματα που μελετήθηκαν η παρουσία του πρώτου μύκητα είναι συχνότερη από του τελευταίου. Η εντονότερη παρουσία του μύκητα αυτού στα εξεταζόμενα οικοσυστήματα μπορεί να υποστηριχθεί και από τις γνώσεις σχετικά με τον κύκλο ζωής του. Η επιβίωσή του για μεγάλα χρονικά διαστήματα στο έδαφος, σε λανθάνουσα κατάσταση, μέσω ανθεκτικών μορφών του

κάνει την παρουσία του να διαρκεί πολύ περισσότερο από ότι ο *Fusarium oxysporum*, ο οποίος διασπείρεται εύκολα στα εδάφη που μολύνει αλλά η ανθεκτικότητά του για μεγάλα διαστήματα δεν είναι τόσο μεγάλη (Ceresini και συνεργάτες, 1999). Κατά συνέπεια, η πίεση η οποία έχει ασκηθεί στα στελέχη της μικροχλωρίδας των εξεταζόμενων περιοχών συνολικά οδήγησε στην επικράτηση μικροοργανισμών με αναπτυγμένους μηχανισμούς ανθεκτικότητας στην παθογόνο δράση εκπροσώπων του γένους *Rhizoctonia*. Δηλαδή, διατηρώντας ως δεδομένο ότι τα επιλεγμένα περιβάλλοντα διαθέτουν μια πλούσια μικροχλωρίδα με ιδιαίτερα μεταβολικά χαρακτηριστικά συμπεριλαμβανομένης και της αντιμικροβιακής ικανότητας, η φυσική επιλογή ευνόησε και κατεύθυνε προς την επικράτηση τους στρεπτομύκητες με ικανότητα αντίστασης στον μύκητα *Rhizoctonia solani*. Έτσι, οι στρεπτομύκητες που εποικούν τα εξεταζόμενα περιβάλλοντα καλούνται σε διαρκή ανταγωνισμό με μύκητες του γένους *Rhizoctonia* και για αυτό το λόγο η αντιμυκητιακή τους δράση στοχεύει περισσότερο προς αυτή την κατεύθυνση. Ωστόσο, οι στρεπτομύκητες που αναστέλλουν την ανάπτυξη του *Fusarium oxysporum*, αν και λιγότεροι αριθμητικά, ανήκουν, σχεδόν όλοι, στη μεγαλύτερη ομάδα μικροοργανισμών, που αναστέλλουν την ανάπτυξη του *Rhizoctonia solani* και μάλιστα τα βακτήρια που παρουσίασαν την εντονότερη αντιμυκητιακή ικανότητα έναντι των δύο μυκήτων είναι κοινά, οδηγώντας έτσι στο συμπέρασμα ότι οι επιλεγμένοι μικροοργανισμοί διέπονται από μία ευρύτερη ανταγωνιστική συμπεριφορά. Αυτό φαίνεται και από τα αποτελέσματα δοκιμασιών που έδειξαν ότι οι ισχυρότεροι στρεπτομύκητες-ανταγωνιστές των μυκήτων είναι σε θέση να παρεμποδίζουν την ανάπτυξη και άλλων κατηγοριών μικροοργανισμών, όπως για παράδειγμα βακτηρίων και ζυμών. Είναι επομένως πολυπαραγωγικοί και ισχυρά ανταγωνιστικοί, με την ευρεία έννοια του όρου, γεγονός που σχετίζεται περισσότερο με το ιδιάζων και απαιτητικό περιβάλλον στο οποίο διαβιούν παρά με την εξειδικευμένη παρουσία του ενός ή του άλλου από τους εξεταζόμενους φυτοπαθογόνους μύκητες.

Εξετάζοντας την ποικιλότητα των εξεταζόμενων στρεπτομυκήτων, οι οποίοι εξέφρασαν ικανότητα αναστολής των φυτοπαθογόνων μυκήτων, μέσω της ανάλυσης του προτύπου ζωνών που παρέχει η BOX PCR αντίδραση, παρατηρείται μια αρκετά έντονη ποικιλομορφία στο γενετικό αποτύπωμα των μικροοργανισμών με τον ίδιο ή παραπλήσιο φαινότυπο. Πολύ από τους μικροοργανισμούς με ισχυρότερη

αντιμικροβιακή δράση σε σχέση με τους υπόλοιπους, που προέρχονταν από το ίδιο ενδιαίτημα ανήκαν σε μονομελής ομάδες, άρα χαρακτηρίζονται ως διαφορετικά στελέχη του είδους τους, απόλυτα διακριτά από τους υπόλοιπους στρεπτομύκητες που εξετάστηκαν, παρατήρηση που αντανακλά στην ιδιαίτερη, διαφορετική και έντονη συμπεριφορά που εκδήλωσαν. Ωστόσο, σε ορισμένα ενδιαίτηματα, παρατηρήθηκε ποικιλία την ένταση του αντιμυκητιακού χαρακτήρα μεταξύ στρεπτομυκήτων, οι οποίοι σύμφωνα με το αποτέλεσμα της BOX PCR αντίδρασης ομαδοποιούνται μαζί, είναι δηλαδή ίδια στελέχη του ίδιου είδους.

Πιο συγκεκριμένα, εξετάζοντας τα αποτύπωμα BOX PCR των μικροοργανισμών, οι οποίοι εξέφρασαν τον ισχυρότερο αντιμυκητιακό χαρακτήρα και οι οποίοι επιλέχθηκαν για τις επόμενες δοκιμές, παρατηρήθηκε πως οι δώδεκα αυτοί στρεπτομύκητες ομαδοποιούνται σε οκτώ ομάδες με βάση τον ραβδωτό κώδικα που προέκυψε, εκ των οποίων οι πέντε έχουν έναν μόνο αντιπρόσωπο. Φαίνεται με αυτό τον τρόπο πως στελέχη με διαφορετικό BOX PCR αποτύπωμα μοιράζονται κοινά φυσιολογικά χαρακτηριστικά (εν προκειμένω την ικανότητα αναστολής της ανάπτυξης φυτοπαθογόνων μυκήτων) και κατά συνέπεια κοινή βιοτεχνολογική συμπεριφορά. Επιπλέον, στελέχη όπως τα REA17 και CR14 καθώς και τα GRE25 και M33 εμφανίζουν ανά δύο όμοιο αποτύπωμα BOX PCR και παρόμοια φυσιολογικά χαρακτηριστικά αν και προέρχονται από διαφορετικά ενδιαίτηματα με διαφορετικές οικοφυσιολογικές ιδιότητες ενώ τέλος τα στελέχη OL80 και OL28, που προέρχονται από το ίδιο περιβάλλον (ριζόσφαιρα *Olea europaea*) συμφωνούσαν τόσο ως προς το BOX PCR αποτύπωμα όσο και ως προς την αντιμυκητιακή τους ικανότητα. Συγκρίνοντας, στη βάση του προτύπου ζωνών της BOX PCR αντίδρασης, τα επιλεγμένα βακτήρια με τα υπόλοιπα του ενδιαιτήματος από το οποίο προέρχονται, προκύπτει ότι ο στρεπτομύκητας REA17 απέδωσε μοναδικό προφίλ και απόλυτα διακριτό από των υπολοίπων της ριζόσφαιρας του ενδημικού φυτού *Ebenus siphthorpii*, από το οποίο προέρχεται, γεγονός που συνδυάζεται με τον πολύ διαφορετικό και έντονο, συγκριτικά, τρόπο με τον οποίο αναστέλλει των ανάπτυξη των φυτοπαθογόνων μυκήτων. Μοναδικός στο οικοσύστημα από το οποίο απομονώθηκε (ριζόσφαιρα κωνοφόρων δέντρων) ήταν και ο στρεπτομύκητας CR14, ο οποίος μοιράζεται κοινό προφίλ με τον REA17. Τα ενδιαίτηματα προέλευσης αυτών των μικροοργανισμών είναι διαφορετικά, αφού αποτελούν ριζόσφαιρα μεν αρκετά διαφορετικών φυτών δε, αλλά η συμπεριφορά τους παρόμοια. Αν επομένως εμπιστευτούμε το BOX PCR αποτέλεσμα και γίνει αποδεκτό το ότι οι

μικροοργανισμοί είναι ίδια στελέχη του ίδιου είδους, καταλήγουμε στο ότι αποτελούν διαδεδομένους μικροοργανισμούς με αντιμικροβιακό χαρακτήρα ανεξάρτητο του περιβάλλοντος προέλευσης. Σε μονομελείς ομάδες των στρεπτομυκήτων του οικοσυστήματος προέλευσής τους, ανήκουν και οι στρεπτομύκητες GRE25 και M33, οι οποίοι είναι όμοιοι σύμφωνα με το γενετικό προφίλ της BOX PCR αντίδρασης και οι οποίοι εκδήλωσαν ισχυρότατο αντιμυκητιακό χαρακτήρα. Τα δύο αυτά βακτήρια, με το ίδιο προφίλ ζωνών BOX PCR και τον ίδιο φαινότυπο (ισχυρή αντιμικροβιακή δράση) απομονώθηκαν από διαφορετικά και απομακρυσμένα μεταξύ τους περιβάλλοντα (GRE25: Κρήτη και M33: Μαραθώνας). Ωστόσο, η παρουσία τους σε αυτά εξηγείται από τα οικοφυσιολογικά χαρακτηριστικά των περιοχών αυτών, όπως αυτά αναλύθηκαν παραπάνω. Οι υπόλοιποι από τους επιλεγμένους στρεπτομύκητες είναι μοναδικοί στην παρουσία τους στα ενδιαίτηματα προέλευσής τους και αυτό συνάδει με την διαφορετική ως προς την έντασή της αντιμυκητιακή τους συμπεριφορά, που αποτέλεσε και το κριτήριο επιλογής τους για περαιτέρω δοκιμές. Παραφωνία σε αυτό αποτελεί ο στρεπτομύκητας OL7, ο οποίος ξεχωρίζει με μεγάλη διαφορά ως προς την αντιμυκητιακή του ισχύ από μια πολυμελή ομάδα στρεπτομυκήτων, οι οποίοι απέδωσαν ίδιο BOX PCR προφίλ. Φαίνεται δηλαδή ότι ο OL7 εκδηλώνει αποκλίνουσα συμπεριφορά από τα μέλη της ομάδας στην οποία ανήκει, δηλαδή με ίδια στελέχη του ίδιου είδους.

Επίσης, λαμβάνοντας υπόψη τα αποτελέσματα της ανάλυσης της αλληλουχίας του γονιδίου 16s rRNA για τα επιλεγμένα στελέχη, προκύπτει ότι μικροοργανισμοί με το ίδιο πρότυπο ζωνών BOX PCR δεν ανήκαν στο ίδιο είδος. Συγκεκριμένα, οι στρεπτομύκητες REA17 και CR14 ενώ από τα αποτελέσματα της BOX PCR αντίδρασης προέκυψε ότι ανήκουν στο ίδιο είδος, η ανάλυση της αλληλουχίας 16s rDNA έδειξε το αντίθετο. Τα παραπάνω ευρήματα εγείρουν αμφιβολίες σχετικά με την αξιοπιστία της μεθόδου BOX PCR για τη διάκριση των μικροοργανισμών μεταξύ τους. Η μέθοδος χρησιμοποιείται για τη διάκριση των μικροοργανισμών σε επίπεδο στελέχους και έχει με επιτυχία χρησιμοποιηθεί στο παρελθόν (Lanoot και συνεργάτες, 2004) για την ομαδοποίηση και τον διαχωρισμό στελεχών στρεπτομυκήτων. Ωστόσο, ο Raja και οι συνεργάτες του, το 2007, συγκρίνοντας διάφορες μεθόδους PCR ως προς την ικανότητά τους να ταυτοποιούν και να διακρίνουν μεταξύ τους μεθυλοβακτήρια συμπέραναν ότι η διακριτική ικανότητα της μεθόδου BOX PCR δεν ήταν ισχυρή ενώ με διαφορετικό τρόπο ομαδοποιήθηκαν από

τον Rai και τους συνεργάτες του το 2014, στρεπτομύκητες με αντιμικροβιακή ικανότητα χρησιμοποιώντας τα αποτελέσματα της BOX PCR αντίδρασης και με διαφορετικό τρόπο χρησιμοποιώντας τα αποτελέσματα της ανάλυσης της αλληλουχίας 16s rDNA.

Διερευνώντας τις συνθήκες καλλιέργειας των επιλεγμένων στρεπτομυκήτων, οι οποίες θα έχουν σαν αποτέλεσμα την αριστοποίηση της έκφρασης της ήδη πολύ έντονης αντιμυκητιακής τους δράσης, προέκυψε ότι η άριστη θερμοκρασία επώασης ήταν οι 28 °C και η άριστη τιμή pH καθορίστηκε στο 8. Η θερμοκρασία των 28°C είναι πολύ κοντινή στη μέση θερμοκρασία, που χαρακτηρίζει το Μεσογειακό κλίμα ενώ το pH8 είναι τιμή ελαφρώς υψηλότερη από αυτή που συνήθως μετράται στα καλλιεργήσιμα εδάφη της Ελλάδας (Gasparatos και συνεργάτες 2011). Είναι επομένως σημαντικό το γεγονός ότι η *in vitro* αντιμυκητιακή δράση του συνόλου των επιλεγμένων στρεπτομυκήτων εκδηλώνεται με τον βέλτιστο τρόπο σε συνθήκες που προσομοιάζουν με εκείνες των πραγματικών καλλιεργητικών συνθηκών της Ελλάδας. Υποστηρίζεται έτσι η προσπάθεια αξιοποίησης και εφαρμογής των συγκεκριμένων μικροοργανισμών ως παραγόντων βιοελέγχου των εξεταζόμενων φυτοπαθογόνων μυκήτων. Όσο αφορά στις θρεπτικές απαιτήσεις των επιλεγμένων στρεπτομυκήτων ώστε να μεγιστοποιηθεί η αντιμυκητιακή τους δράση *in vitro* βρέθηκε ότι η άριστη πηγή άνθρακα ήταν η γλυκόζη, ενώ η ισχύς της αντιμυκητιακής δράσης ήταν αντιστρόφως ανάλογος της περιεκτικότητας του θρεπτικού μέσου σε γλυκόζη. Η γλυκόζη είναι ο πιο κοινός μονοσακχαρίτης. Στο έδαφος απαντάται ως το προϊόν της αποικοδόμησης νεκρής οργανικής ύλης, κυρίως φυτικής προέλευσης. Άρα είναι μια πηγή άνθρακα, που προσφέρεται στους μικροοργανισμούς που εποίκουν το έδαφος. Το γεγονός ότι όχι μόνο δεν απαιτείται υψηλή συγκέντρωση γλυκόζης αλλά και ότι όσο αυτή μειώνεται ο ανταγωνισμός στρεπτομυκήτων-μυκήτων εντείνεται εξηγείται λόγω των συνθηκών έντονης πίεσης που προκαλούνται στην καλλιέργεια εξαιτίας της έλλειψης θρεπτικών. Προηγούμενες μελέτες (Agosin και συνεργάτες, 1997) έχουν δείξει πως τόσο το είδος της πηγής άνθρακα όσο και η συγκέντρωσή της επηρεάζουν πολύ τη δράση παραγόντων βιοελέγχου. Συγκεκριμένα, η γλυκόζη και μάλιστα σε μικρές συγκεντρώσεις ενισχύει την ικανότητα του *Trichoderma harzianum* να δρα σαν παράγοντας βιοελέγχου. Το αποτέλεσμα αυτό επίσης δηλώνει ότι σε πραγματικές συνθήκες καλλιέργειας, όπου τα εδάφη λόγω της συστηματικής χρήσης τους είναι φτωχά, οι επιλεγμένοι στρεπτομύκητες είναι δυνατό να είναι απόλυτα

αποτελεσματικοί ως παράγοντες βιοελέγχου χωρίς να απαιτούν ιδιαίτερη διαχείριση του εδάφους που θα τους φιλοξενήσει, όπως για παράδειγμα εμπλουτισμό με επιπλέον θρεπτικά συστατικά. Τέλος, εξετάζοντας την άριστη πηγή αζώτου, η οποία μπορεί να ενισχύσει την έκφραση του αντιμυκητιακού φαινοτύπου των επιλεγμένων στρεπτομυκήτων προέκυψε ότι η παρουσία αμμωνίας ως μοναδικής πηγής αζώτου κατέστειλε τον ανταγωνισμό μεταξύ των εξεταζόμενων μικροοργανισμών ενώ η ουρία και τα νιτρικά ιόντα τον διατηρούσαν. Η πηγή του αζώτου στο μέσο της καλλιέργειας εξεταζόμενων παραγόντων βιοελέγχου έχει δειχθεί από προηγούμενες μελέτες ότι είναι κρίσιμη για την αντιμικροβιακή δράση τους. Το είδος της πηγής αζώτου που ενισχύει την ανταγωνιστική τους δράση εξαρτάται από το είδος του παράγοντα βιοελέγχου, όπως έδειξαν οι Gao και Liu το 2010. Στην πλειοψηφία των δοκιμασιών που πραγματοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή, η παρουσία ουρίας στο θρεπτικό υλικό όπου συγκαλλιεργούνταν στρεπτομύκητες και μύκητας-στόχος ενίσχυε την αντιμυκητιακή δραστηριότητα των βακτηρίων. Τα αποτελέσματα αυτά υποστηρίζουν το προηγούμενο συμπέρασμα, κατά το οποίο φαίνεται ότι η δράση των υποψήφιων παραγόντων βιοελέγχου δεν απαιτεί ιδιαίτερη προετοιμασία του εδάφους που θα τους υποδεχτεί. Η ουρία είναι ένωση πλούσια σε άζωτο, η οποία εμπεριέχεται στις απεκκρίσεις των ανώτερων οργανισμών και άρα αποτελεί φυσική πηγή αζώτου του εδάφους. Όμως η αμμωνία και τα νιτρικά ιόντα είναι συστατικά των οργανικών λιπασμάτων, που συστηματικά χρησιμοποιούνται στη γεωργία και τα οποία φαίνονται όχι μόνο να μην βελτιστοποιούν την αντιμυκητιακή δράση των στρεπτομυκήτων αλλά ακόμα και να την εξαφανίζουν.

4.2. ΑΝΤΙΜΥΚΗΤΙΑΚΗ ΔΡΑΣΗ ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΩΝ ΣΤΡΕΠΤΟΜΥΚΗΤΩΝ *IN VIVO*

Τα αποτελέσματα, που ανέκυψαν από τις δοκιμασίες ανταγωνισμού μεταξύ των επιλεγμένων στρεπτομυκήτων και του φυτοπαθογόνου μύκητα-στόχου *Rhizoctonia solani* DSM843 είναι, σε πρώτη ανάγνωση, ενθαρρυντικά καθώς υποστηρίζουν την πιθανή συστηματική χρήση των επιλεγμένων μικροοργανισμών για την προστασία καλλιεργειών. Είναι γνωστό ότι η ανταγωνιστική δράση των μικροοργανισμών εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τις συνθήκες ανάπτυξής τους και υπάρχουν διαφορές στον τρόπο με τον οποίο αυτή εκφράζεται σε εργαστηριακές συνθήκες και σε *in vivo*

διεργασίες. Τα πειράματα *in vitro* είναι απαραίτητα για τον έλεγχο και την επιλογή των μικροοργανισμών με ανταγωνιστική δράση και στο πλαίσιο αυτό οι εργαστηριακές καλλιέργειες χρησιμοποιούνται ως μια αρχική ένδειξη για ανταγωνιστική συμπεριφορά από τους εξεταζόμενους μικροοργανισμούς, μιας και είναι ο μοναδικός τρόπος για επιλογή στελεχών για περαιτέρω μελέτη. Δείχθηκε, ωστόσο, ότι οι επιλεγμένοι στρεπτομύκητες ήταν σε θέση να εκφράσουν την αντιμυκητιακή τους δράση αρκετά καλά και σε δοκιμασίες *in vivo*. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι τα αποτελέσματα από αυτά τα πειράματα είναι σε συμφωνία με αντίστοιχα αποτελέσματα προηγούμενων μελετών, οι οποίες εξετάζουν την πιθανότητα χρήσης στρεπτομυκήτων ως παραγόντων βιοελέγχου. Για παράδειγμα, οι Mahadevan και Crawford (1997) ταυτοποίησαν τον στρεπτομύκητα *Streptomyces lydicus* ως παράγοντα βιοελέγχου με ευρύτατο φάσμα αντιμικροβιακής δράσης ενώ τα αποτελέσματα από τη μελέτη του Farrag (2011) ενίσχυσαν αυτό το εύρημα. Επιπλέον, οι Reddi και Rao (1971) ανέφεραν ότι στελέχη του *Streptomyces ambofaciens* αποδείχθηκαν ικανά να ελέγχουν συμπτώματα μαρασμού, που προκαλούνται από φυτοπαθογόνους μύκητες των γενών *Pythium* και *Fusarium* σε φυτά τομάτας και βαμβακιού αντίστοιχα, σε πειράματα που πραγματοποιήθηκαν σε έδαφος τεχνητά μολυσμένο με τους παθογόνους παράγοντες. Οι Rothrock και Gottlieb το 1984 έδειξαν ότι το βακτήριο *Streptomyces hygrosopicus* ήταν σε θέση να ελέγξει αποτελεσματικά τη σήψη των ριζών των φυτών μπιζελιάς, που προκαλεί ο μύκητας του γένους *Rhizoctonia*, σε πειράματα που πραγματοποιήθηκαν σε θαλάμους ανάπτυξης ενώ ο Maldonado και οι συνεργάτες του, το 2010, απέδειξαν ότι ένα στέλεχος στρεπτομύκητα, απομονωμένο από οικοσυστήματα της Αργεντινής ήταν ικανό να μειώσει την καταστροφή που προκαλούν οι μύκητες *P. digitatum* και *G. candidum* στα εσπεριδοειδή.

Σημαντικό εύρημα των δοκιμασιών που διενεργήθηκαν κατά τη διάρκεια της παρούσας διατριβής είναι και το ότι οι αντιμυκητιακές ουσίες που παράγονται από τους στρεπτομύκητες είναι δυνατό να εκφράσουν την προστατευτική τους δράση στο εξεταζόμενο φυτό απλά και μόνο με την κάλυψη των σπόρων του φυτού στόχου με διάλυμα σπορίων του στρεπτομύκητα πριν από τη φύτευση. Σε λίγες περιπτώσεις, ο τρόπος εφαρμογής του εξεταζόμενου παράγοντα βιοελέγχου δεν είχε ιδιαίτερη επίδραση στο ποσοστό φύτευσης ή στο ύψος και το βάρος των φυτών. Στις περισσότερες όμως περιπτώσεις, οι σπόροι των φυτών που είχαν υποστεί επεξεργασία, πριν τη φύτευση, με τα σπόρια του στρεπτομύκητα εξελίχθηκαν σε

φυτά περισσότερα, μεγαλύτερα και δυνατότερα από αυτά που προέκυψαν από μη επεξεργασμένους σπόρους και όπου ο παράγοντας ελέγχου είχε εφαρμοστεί στο έδαφος. Η μέθοδος εμβολιασμού του στρεπτομύκητα πάνω στον προς φύτευση σπόρο έχει αποδειχθεί, μέσω των αποτελεσμάτων προηγούμενων μελετών, ότι είναι πιο αποτελεσματική καθώς ο παράγοντας βιοελέγχου μπορεί γρήγορα και εκτεταμένα να καλύψει την επιφάνεια του σπόρου (Lu και συνεργάτες 2004). Η έγκαιρη εποίκιση του σπόρου από τον παράγοντα βιοελέγχου, συχνά, απαιτείται προκειμένου να καλυφθούν τα κρίσιμα σημεία του σπόρου και του νεαρού σπορόφυτου ώστε να είναι σε θέση να ανταγωνιστεί αποτελεσματικότερα των φυτοπαθογόνου μύκητα (Mitchell 1992). Έτσι, η επικάλυψη των σπόρων με βακτήρια ή μύκητες, πιθανούς παράγοντες βιοελέγχου, πολύ συχνά χρησιμοποιείται ή ακόμα και απαιτείται προκειμένου να ελεγχθούν επιθετικοί, ταχέως αναπτυσσόμενοι μικροοργανισμοί, που προκαλούν επιβαρυντικές για το έδαφος ασθένειες, όπως ο *Rhizoctonia solani* (Crawford και συνεργάτες 1993, Mitchell 1992, Nerey και συνεργάτες 2010). Είναι, βεβαίως, μεγάλης σημασίας το γεγονός ότι ένας τέτοιος τρόπος διαχείρισης και εφαρμογής του παράγοντα βιοελέγχου κρίνεται ευκολότερος και πρακτικότερος σε μεγάλης κλίμακας καλλιέργειες συγκρινόμενος με την κλασσική μέθοδο. Η τελευταία περιλαμβάνει τον εμπλουτισμό του εδάφους με τον παράγοντα βιοελέγχου και χαρακτηρίζεται τόσο ως χρονοβόρα όσο και ως δύσχρηστη σε πραγματικές συνθήκες καλλιέργειας (Whipps 2001, Yuan και Crawford 1995). Επίσης, αναλύοντας τα αποτελέσματα από τα πειράματα, που πραγματοποιήθηκαν με σκοπό την διερεύνηση της ικανότητας επιλεγμένων στρεπτομυκήτων να αναστέλλουν την ανάπτυξη τόσο του *Rhizoctonia solani* DSM843 όσο και του *Fusarium oxysporum* DSM62059 σε μη αποστειρωμένο έδαφος, ενισχύεται η πιθανότητα οι επιλεγμένοι στρεπτομύκητες να χρησιμοποιηθούν ως παράγοντες βιοελέγχου σε πραγματικές καλλιεργητικές συνθήκες. Αυτό προκύπτει αφού η συνύπαρξη των εξεταζόμενων μικροοργανισμών με την αυτόχθονο μικροχλωρίδα του εδάφους ενδυναμώνει την αντιμυκητιακή δράση των στρεπτομυκήτων *in vivo*. Ο τύπος του χώματος, που χρησιμοποιείται σε αντίστοιχες δοκιμασίες, ο οποίος αντανακλά την σύσταση της μικροχλωρίδας που φιλοξενεί, έχει αναφερθεί σαν ένας από τους κυρίαρχους παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν τα αποτελέσματα πειραμάτων βιοελέγχου *in vivo*. Εδάφη που χαρακτηρίζονται ως «κατασταλτικά» περιέχουν μικροοργανισμούς, οι οποίοι είτε είναι ανταγωνιστικοί έναντι του παθογόνου παράγοντα είτε προωθούν την αύξηση του φυτού στόχου (Whipps 2001). Η παρουσία τέτοιων μικροοργανισμών, σε συνδυασμό με τους

μεγάλους πληθυσμούς των εισαγόμενων παραγόντων βιοελέγχου, είναι δυνατό να ενισχυθεί η αντιμικροβιακή δράση των τελευταίων. Επιπρόσθετα, η αποστείρωση των εδαφών μέσω παστερίωσης, με τη χρήση καπνού ή αυτοκαύστου επιτρέπει στον φυτοπαθογόνο μικροοργανισμό να πολλαπλασιάζεται (Burgess και συνεργάτες 1988) ενώ στα μη αποστειρωμένα εδάφη, η αυτόχθονος μικροχλωρίδα καθυστερεί την ανάπτυξη του δίνοντας έτσι την ευκαιρία στον παράγοντα βιοελέγχου να εκδηλώσει την αντιμικροβιακή δραστηριότητά του με μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα. Η παρατήρηση αυτή μπορεί να οδηγήσει στο συμπέρασμα πως όχι μόνο η βλάστηση των σπόρων αλλά και η ανάπτυξη των φυτών μπορεί να ενισχυθεί *in situ* όταν οι σπόροι που φυτεύονται επεξεργάζονται με τους εξεταζόμενους στρεπτομύκητες. Ωστόσο, κάποια ερωτήματα προκύπτουν για την δυνατότητα και τα αποτελέσματα της εφαρμογής των επιλεγμένων εξεταζόμενων στρεπτομυκήτων ως παραγόντων βιοελέγχου του μύκητα *Rhizoctonia solani* σε πραγματικές συνθήκες καλλιέργειας, αλλά τα παραπάνω αποτελέσματα αποτελούν ένα πολλά υποσχόμενο πρώτο βήμα για την αγροτική-εμπορική εκμετάλλευσή τους, παρά το γεγονός ότι οι σχετικές δοκιμασίες πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση ενός μόνο τύπου εδάφους και ένα μόνο φυτικό είδος ως στόχο του μύκητα.

Από τη συνολική θεώρηση των αποτελεσμάτων των *in vivo* δοκιμασιών βιοελέγχου οδηγούμαστε στο συμπέρασμα ότι αποτελεσματικότερος παράγοντας βιοελέγχου του φυτοπαθογόνου μύκητα *Rhizoctonia solani* DSM843 είναι ο στρεπτομύκητας GRE 25 ενώ του φυτοπαθογόνου μύκητα *Fusarium oxysporum* DSM62059 είναι οι στρεπτομύκητες GRE 25 και OL 7 ενώ αποδοτικότερος τρόπος χρήσης τους είναι η κάλυψη φυτικών σπόρων με σπυριά τους πριν τη φύτευση. Παρέχονται, έτσι, οι οδηγίες για τη χρήση των μικροοργανισμών αυτών για την προστασία φυτικών καλλιεργειών, η οποία προοιωνίζεται αποτελεσματική.

Επιπλέον, από κατάλληλες πειραματικές δοκιμασίες *in vivo*, εξήχθησαν κάποιες πληροφορίες σχετικά με τον τρόπο δράσης του GRE 25 και του OL 7 στο έδαφος. Φάνηκε, λοιπόν, ότι και οι δύο μικροοργανισμοί προωθούν τόσο τη φύτευση όσο και τις υπόλοιπες παραμέτρους αύξησης των φυτών τομάτας και μπορούν να χαρακτηριστούν ως αυξητικοί παράγοντες για το φυτό αυτό. Προκύπτει επίσης ότι ο στρεπτομύκητας GRE25 προωθεί την αύξηση των φυτών τομάτας αλλά όχι των φυτών φασολιάς, άρα το μοτίβο της δράσης του ως αποτελεσματικού παράγοντα βιοελέγχου έναντι του *Rhizoctonia solani* στο έδαφος θα πρέπει να αναζητηθεί σε άλλη υπόθεση.

4.3. ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΩΝ ΒΙΟΕΝΕΡΓΩΝ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ ΤΩΝ ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΩΝ ΣΤΡΕΠΤΟΜΥΚΗΤΩΝ

Έχοντας υπόψη ότι ο μηχανισμός της αντιμυκητιακής δράσης, που εκφράζει ένας υποψήφιος παράγοντας βιοελέγχου, ποικίλει μεταξύ της παραγωγής αντιμικροβιακών ουσιών και υδρολυτικών ενζύμων, της προώθησης της φυτικής ανάπτυξης, την επαγωγή της ανθεκτικότητας των φυτών και τον μυκοπαρασιτισμό (Haas και Défago 2005), εξετάστηκε, η ενζυμική ενεργότητα και η αντιμυκητιακή δράση των εκχυλισμάτων τόσο υγρών όσο και στερεών καλλιεργειών των εξεταζόμενων στρεπτομυκήτων, σε μια προσπάθεια να αξιολογηθούν τα βιοχημικά χαρακτηριστικά των αντιμυκητιακών μεταβολιτών. Τα εκχυλίσματα των υγρών καλλιεργειών, που εξετάστηκαν ως προς την ενεργότητα υδρολυτικών ενζύμων, φάνηκαν να παρουσιάζουν σχετικά χαμηλή ενζυμική δράση. Στα εκχυλίσματα αυτά εντοπίστηκε ήπια ενεργότητα κυτταρινάσης, υψηλή ενεργότητα ξυλανάσης ενώ η ενεργότητα χιτινάσης μόλις που άγγιζε τα όρια ανίχνευσης. Οι ενεργότητες, που σαφώς ανιχνεύθηκαν (κυτταρινάση, ξυλανάση) καταδεικνύουν κυρίως τον τρόπο με τον οποίο οι στρεπτομυκήτες επιβιώνουν στο έδαφος αφού μπορούν με τα εξωκυτταρικά τους προϊόντα να υδρολύσουν και να αξιοποιήσουν βασικούς πολυσακχαρίτες του κυτταρικού τοιχώματος των φυτικών κυττάρων, όπως η κυτταρίνη και η ξυλάνη. Από την άλλη πλευρά, δεδομένου ότι η χιτίνη είναι βασικό συστατικό του κυτταρικού τοιχώματος των μυκήτων και η ενεργότητά της οριακά ανιχνεύθηκε μεταξύ των εκκρινόμενων μεταβολιτών συμπεραίνουμε ότι η παραγωγή αυτού του ενζύμου δεν μπορεί να εμπλέκεται στον μηχανισμό με τον οποίο οι περισσότεροι από τους εξεταζόμενους στρεπτομυκήτες ανταγωνίζονται τους φυτοπαθογόνους μύκητες. Ακόμα και στην περίπτωση του στρεπτομυκήτα AMO 58, στο εκχύλισμα της καλλιέργειας του οποίου ανιχνεύθηκε ενεργότητα χιτινάσης, αυτή δεν μπορεί να συσχετιστεί με την αντιμυκητιακή δράση του συγκεκριμένου μικροοργανισμού έναντι των φυτοπαθογόνων μυκήτων. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι όταν ίδιο εκχύλισμα δοκιμάστηκε έναντι των μυκήτων δεν ήταν δυνατό να αναστείλει την ανάπτυξη του μυκηλίου τους. Γενικά, τα εκχυλίσματα των υγρών καλλιεργειών των επιλεγμένων Στρεπτομυκήτων, ανεξαρτήτως της ενζυμικής σύστασής τους, δεν ήταν σε θέση να παρεμποδίσουν την ανάπτυξη των *Rhizoctonia solani* DSM843 και *Fusarium oxysporum* DSM62059. Αντίθετα, η επέκταση του μυκηλίου του *Rhizoctonia solani* DSM843 ανεστάλη από το εκχύλισμα στερεής καλλιέργειας

τεσσάρων από τους επιλεγμένους στρεπτομύκητες (OL 13, OL 28, OL 80 και GRE 25) ενώ του μυκηλίου του *Fusarium oxysporum* DSM62059 από έξι (OL 7, OL 13, OL 28, OL 80, GRE 25 και AMO 58). Το γεγονός ότι η αντιμυκητιακή δράση παρατηρήθηκε μόνο στα εκχυλίσματα των στερεών καλλιεργειών και όχι στο υπερκείμενο των υγρών καλλιεργειών των υποψήφιων παραγόντων βιοελέγχου, μπορεί να αποδοθεί στις εγγενείς διαφορές που παρουσιάζουν οι συνθήκες ανάπτυξης των μικροοργανισμών στους δύο τύπους καλλιέργειας, που έχει σαν αποτέλεσμα διαφορετικό προφίλ εκκριτικής δραστηριότητας σε κάθε περίπτωση. Για παράδειγμα, κατά τη διάρκεια μιας υγρής καλλιέργειας οι αντιμυκητιακοί μεταβολίτες είναι περισσότερο δεκτικοί σε ενζυμική αποικοδόμηση, ένα φαινόμενο το οποίο εκδηλώνεται με μικρότερη ένταση σε μια στερεή καλλιέργεια, κατά την οποία συμβαίνει συνεχής παραγωγή και διάχυση της αντιμικροβιακής ουσίας στο άγαρ (Buynitzky και συνεργάτες 1979). Ένας ακόμα σημαντικός παράγοντας, ο οποίος προκαλεί γενικές αλλαγές στον μεταβολισμό των μικροοργανισμών είναι η διαφορά στη διαθεσιμότητα του οξυγόνου, η οποία είναι μεγαλύτερη για μικροοργανισμούς, οι οποίοι αναπτύσσονται σε στερεό θρεπτικό υλικό. Έτσι, μπορεί να αλλάξουν τα επίπεδα της έκφρασης των διάφορων μεταβολιτών από τα στελέχη στρεπτομυκήτων. Αξίζει ακόμα να σημειωθεί ότι το φτωχό σε θρεπτικά συστατικά μικροπεριβάλλον, που δημιουργείται γύρω από μια αναπτυσσόμενη αποικία στην επιφάνεια ενός στερεού θρεπτικού μέσου μπορεί να επάγει την βιοσύνθεση δευτερογενών μεταβολιτών από τους καλλιεργούμενους μικροοργανισμούς (Buynitzky και συνεργάτες 1979, Doelle και συνεργάτες 1992, Lahlali και Hijri 2010). Τέλος, το γεγονός ότι η αντιμυκητιακή δραστηριότητα καταγράφηκε τόσο στα εκχυλίσματα καθαρών στερεών καλλιεργειών των στρεπτομυκήτων όσο και στα εκχυλίσματα στερεών συγκαλλιεργειών τους με τον καθένα από του φυτοπαθογόνους μύκητες καταδεικνύει ένα μη εξειδικευμένο πρότυπο επαγωγής των υπεύθυνων μεταβολιτών, το οποίο δε σχετίζεται με την ταυτόχρονη παρουσία του αναπτυσσόμενου μυκηλίου του φυτοπαθογόνου μύκητα στις στερεές καλλιέργειες. Δηλαδή, οι στρεπτομύκητες παράγουν τους αντιμυκητιακούς μεταβολίτες ανεξαρτήτως της παρουσίας του μύκητα-στόχου στο περιβάλλον τους.

Το γεγονός ότι η δραστηριότητα έναντι του φυτοπαθογόνου μύκητα *Rhizoctonia solani* DSM843 εντοπίστηκε μόνο στα χαμηλού μοριακού βάρους κλάσματα των εκχυλισμάτων των στερεών καλλιεργειών είναι δηλωτικό του ότι το βιοενεργό ή τα

βιοενεργά συστατικά πιθανά δεν είναι πρωτεΐνες (για παράδειγμα υδρολυτικά ένζυμα) αλλά μικρότερες οργανικές ενώσεις, όπως δευτερογενείς μεταβολίτες. Σχετικά με τη δράση έναντι του φυτοπαθογόνου μύκητα *Fusarium oxysporum* DSM62059, αυτή εκδηλώθηκε και στα δύο κλάσματα του εκχυλίσματος της στερεής καλλιέργειας των στρεπτομυκήτων OL 7, OL 13, OL 28, OL 80, GRE 25 και AMO 58. Σε αυτή την περίπτωση, η υπόθεση για τη συμμετοχή περισσότερων του ενός μεταβολιτών στην εκδήλωση του αντιμυκητιακής συμπεριφοράς των Στρεπτομυκήτων υποστηρίζεται έντονα. Φαίνεται πως τόσο μεγαλομοριακές ενώσεις, όπως πρωτεϊνικά μόρια όσο και μικρότερου μοριακού βάρους συστατικά, όπως δευτερογενείς μεταβολίτες, με ισχυρή αντιμυκητιακή δράση αμφότεροι, συνεργάζονται στην τελική έκφραση της ανταγωνιστικής συμπεριφορά των μελετούμενων στρεπτομυκήτων έναντι του *Fusarium oxysporum* DSM62059. Επίσης, από τα παραπάνω εξάγεται το συμπέρασμα ότι οι ίδιοι στρεπτομύκητες αναστέλλουν την ανάπτυξη καθενός από τους δύο φυτοπαθογόνους μύκητες με διαφορετικό τρόπο, δηλαδή η αντιμυκητιακή δράση τους εξειδικεύεται. Τέλος, το γεγονός ότι οι μεταβολίτες που εμπλέκονται στο μηχανισμό με τον οποίο οι επιλεγμένοι στρεπτομύκητες ελέγχουν, *in vitro*, τους φυτοπαθογόνους μύκητες δεν ήταν δυνατό να εκχυλιστούν σε οργανικό διαλύτη παρά μόνο σε νερό παρέχει αφενός μια ένδειξη της πολικότητας τους, υποστηρίζοντας περισσότερο έναν πολικό χαρακτήρα αφετέρου κάνει δυσκολότερη την περεταίρω ανάλυση τους, καθώς οι περισσότερες αναλυτικές μέθοδοι απαιτούν οργανικό διάλυμα της εκάστοτε εξεταζόμενης ουσίας.

5

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Abd-Allah, E. (2001) *Streptomyces plicatus* as a model biocontrol agent. Folia Microbiology (Praha) 46: 309-314.

Abd-Elsalam K.A., Omar M.R. and Aly A.A. (2010) First Report of *Rhizoctonia solani* AG-7 on Cotton in Egypt. Journal of Phytopathology 158: 307–309, DOI: 10.1111/j.1439-0434.2009.01611.x

Agosin E., Volpe D., Munoz G., San Martin R. and Crawford A. (1997) Effect of culture conditions on spore shelf life of the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*, World Journal of Microbiology & Biotechnology, 225-232.

Agrios G.N. (1988) Plant Pathology, 3rd edition. Academic Press, Inc: San Diego. 803 pp.

Agrios G.N. (1997) Plant Pathology, 4th edition. Academic Press, Inc: San Diego. 635pp.

Agrios G.N. (2005) Plant Pathology, 5th edition. Academic Press, Inc: San Diego.

Alexopoulos C.J. and Mims C.W. (1979) Introductory Mycology. New York:John Wiley & Sons.

Altschul S., Madden T., Schäffer A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acid Research 25: 3389-3402

Appel D.J. and Gordon T.R. (1996) Relationships among pathogenic and non-pathogenic isolates of *Fusarium oxysporum* based on the partial sequence of the intergenic spacer region of the ribosomal DNA. Molecular Plant-Microbe Interactions 9: 125-138

Armstrong G.M. and Armstrong J.K. (1981) Formae speciales and races of *Fusarium oxysporum* causing wilt diseases. In *Fusarium: Diseases, biology and taxonomy* (P.E. Nelson, T.A. Toussoun & R.J. Cook, eds): 391-399. The

Pennsylvania State University Press, University Park.

Atlas R.M. (2003) Handbook of microbiological media (Parks, L.C. Ed.) CRC Press, Boca Raton, USA.

Baayen R.P., O' Donnell K., Bonants P.J., Cigelnik L.P., Kroon L.P.N.M., Roebroek E.J.A. and Waalwijk C. (2000) Gene genealogies and AFLP analyses in the *Fusarium oxysporum* complex identify monophyletic and non-monophyletic formae speciales causing wilt and rot disease. *Phytopathology*, 90:891-900.

Baker K.F. and Cook R.J. (1974) Biological Control of Plant Pathogens, p 110

Bakker M.G., Glover J.D., Mai J.G., and Kinkel L.L. (2010). Plant community effects on the diversity and pathogen suppressive activity of soil streptomycetes. *Applied Soil Ecology*, 46(1):35-42. doi: 10.1016/j.apsoil.2010.06.003

Balali G.R. and Kowsari M. (2004) Pectic zymogram variation and pathogenicity of *Rhizoctonia solani* AG-4 to bean (*Phaseolus vulgaris*) isolates in Isfahan, Iran. *Mycopathologia* 158:377-84

Baniasadi F., Bonjar G.H.S., Karimi N.A., Jorjandi M., Aghighi S., Farokhi P.R. (2009) Biological control of *Sclerotinia sclerotiorum*, causal agent of sunflower head and stem rot disease, by use of soil borne actinomycetes isolates, *American Journal of Agricultural and Biological Sciences*, 4: 146-151.

Baur S., Niehaus J., Karagouni A.D., Katsifas E.A. Chalkou K., Meintanis C., Jones A.L., Goodfellow M., Ward A.C., Beil W., Schneider K., Süßmuth R.D. and Fiedler H.P. (2006) Fluostatins C-E, novel members of the fluostatin family produced by *Streptomyces* strain Acta 1383. *Journal of Antibiotics (Tokyo)* 59:293-7. doi: 10.1038/ja.2006.41

Becker B., Lechevalier M.P. and Lechevalier H.A. (1965) Chemical composition of cell wall preparations from stains of various form-genera of aerobic actinomycetes. *Applied Microbiology*, 13: 236-243.

Beckman C.H. (1987) The nature of wilt diseases on plants. American Phytopathological Society, St Paul. MN., USA. 175pp.

Beckman C.H. and Roberts E.M. (1995) On the nature and genetic basis for resistance and tolerance to wilt disease of plants. *Advances in Botanic Research* 21:35-77.

Beckman C.H., Halmos S. and Mace M.E. (1962) The interaction of host, pathogen, and soil temperature in relation to susceptibility to *Fusarium* wilt of bananas. *Phytopathology* 52 : 134-140.

Beckman C.H., Mace M.E., Halmos S. and McGahan M.W. (1961) Physical barriers associated with resistance in *Fusarium* Wilt of bananas. *Phytopathology* 51:507-515.

Bentley S.D., Chater K.F., Cerdeno-Tarraga A.M., Challis G.L., Thomson N.R., James K.D., Harris D.E., Quail M.A., Kieser H., Harper D., Bateman A., Brown S., Chandra G., Chen C.W., Collins M., Cronin A., Fraser A., Goble A., Hidalgo J., Hornsby T., Howarth S., Huang C.H., Kieser T., Larke L., Murphy L., Oliver K., O’Neil S., Rabinowitsch E., Rajandream M.A., Rutherford K., Rutter S., Seeger K., Saunders D., Sharp S., Squares R., Squares S., Taylor K., Warren T., Wietzorrek A., Woodward J., Barrell B.G., Parkhill J. and Hopwood D.A. (2002) Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2), *Nature*, 417 (6885), 141–147.

Ben-Yephet Y. and Shtienberg D. (1997) Effects of the host, the pathogen, the environment and their interactions on *Fusarium* wilt in carnation. *Phytoparasitica*, 25: 207-216.

Bigey F., Janbon G., Arnaud A. and Galzy P. (1995) Sizing of the *Rhodococcus* sp. R312 genome by pulsed-field gel electrophoresis. Localization of genes involved in nitrile degradation, *Antonie Van Leeuwenhoek*, 68 (2), 173–179.

Bignell D.E., Anderson J.M. and Crosse R. (1991) Isolation of facultatively aerobic actinomycetes from gut, parent soil and mound materials of termites *Procupitermes aburiensis* and *Cubitermes severus*. *FEMS Microbiol Ecology* 85, 151-160.

Bishop C.D. and Cooper R.M. (1983 α) An ultrastructural study of root invasion of three vascular wilt diseases. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 22:15-27.

Bishop C.D. and Cooper R.M. (1983 β) An ultrastructural study of root invasion in three vascular wilt diseases 1. Colonization of susceptible cultivars. *Physiology and Plant Pathology*, 23: 323-343.

Booth C. (1971) *The genus Fusarium*. Kew, UK: Commonwealth. Mycological Institute 237pp.

Bruehl G.W. (1987) *Soil Borne Plant Pathogens*, Macmillian, New York

Brusetti L., Malkhazova I., Gtari M., Tamagnini I., Borin S., Merabishvili M., Chanishvili N., Mora D., Cappitelli F. and Daffonchio D. (2008) "Fluorescent-BOX-PCR for resolving bacterial genetic diversity, endemism and biogeography." *BMC Microbiology* 8(1): 220.

Buchanan R.E. (1917). Studies on the nomenclature and classification of the bacteria. II. The primary subdivisions of the *Schizomycetes*. *Journal of Bacteriology* 2: 155-164.

Burgess L.W., Liddell C.M. and Summerell B.A. (1988) “Laboratory manual for *Fusarium* research”, 2nd ed. Univ. Sydney, Australia, pp. 156,

Buynitzky S., Howe H.B. and Shellhorse Y. (1979) Extraction and quantification of solutes of solidified agar culture media. *Applied and Environmental Microbiology*, 37(2): 202-207

Cao L., Qiu Z., You J., Tan H. and Zhou S. (2004) Isolation and characterization of endophytic *Streptomyces* strains from surface-sterilized tomato (*Lycopersicon esculentum*) roots. *Letters of Applied Microbiology*, 39: 425-430.

Ceresini P. (1999) *Rhizoctonia solani*. *Soilborne Plant Pathogens* PP-728

Chaconas G. and Chen C.W. (2005) Linear chromosomes in bacteria: no longer going around in circles. In the bacterial chromosome, Higgins N.P., ed. (Washington, D.C., American Society for Microbiology) pp. 525-539

Challis, G.L., Hopwood, D.A. (2003) Synergy and contingency as driving forces for the evolution of multiple secondary metabolite production by *Streptomyces* species. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 100(24), 14555-14561.

Chamberlain, K. and Crawford, D. (1999) *In vitro* and *in vivo* antagonism of pathogenic turfgrass fungi by *Streptomyces hygroscopicus* strains YCED9 and WYE53. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 23(1), 641-646.

Chater K.F. and Losick R. (1997). Multicellular lifestyle of *Streptomyces coelicolor* A3(2) and its relatives, p. 149–182. In J. A. Shapiro and M. Dworkin (ed.), *Bacteria as multicellular organisms*. Oxford University Press, New York, NY.

Chen Y.T. (2000) Linear chromosomes and linear plasmids in Actinomycetes. In Institute of Genetics, Taipei, National Yang-Ming University

Ciampi L. and Tewari J.P. (1990) Evaluation of soil microorganisms with inhibitory activity against *Rhizoctonia solani* causal agent of the damping-off of canola, *Archives Biol Med Exp (Santiago)*, 23(2): 101-12.

Cole S.T., Eiglmeier K., Parkhill J., James K.D., Thomson N.R., Wheeler P.R., Honore N., Garnier T., Churcher C., Harris D., Mungall K., Basham D., Brown D., Chillingworth T., Connor R., Davies R.M., Devlin K., Duthoy S., Feltwell T., Fraser A., Hamlin N., Holroyd S., Hornsby T., Jagels K., Lacroix C., Maclean J., Moule S., Murphy L., Oliver K., Quail M.A., Rajandream M.A., Rutherford K.M., Rutter S., Seeger K., Simon S., Simmonds M., Skelton J., Squares R., Squares S., Stevens K., Taylor K., Whitehead S., Woodward J.R. and Barrell B.G. (2001) Massive gene decay in the leprosy bacillus, *Nature*, 409 (6823): 1007–1011.

Cook R.J. and Baker K.F. (1983) *The Nature and Practice of Biological Control of Plant Pathogens*. APS Press, St. Paul, Minnesota, USA.539pp.

Correia A., Martin J.F. and Castro J.M. (1994) Pulsedfield gel electrophoresis analysis of the genome of amino acid producing corynebacteria: chromosome sizes and diversity of restriction patterns, *Microbiology*, 140, 2841– 2847.

Correll J.C. (1991) The relationship between formae speciales, races and vegetative compatibility groups in *Fusarium oxysporum*. *Phytopathology* 81: 1061-1064

Crameri R., Kieser T., Ono H., Sanchez J. and Hutter R. (1983) Chromosomal instability in *Streptomyces glaucescens*: mapping of streptomycinsensitive mutants, *Journal of General Microbiology*, 129 (Pt 2), 519–527.

Crandall L.W. and Hamill R.L. (1986) Antibiotics produced by *Streptomyces*: Major structural classes. In: *The bacteria*. Vol. 9:Antibiotic-producing *Streptomyces*. (Queener St.W. and Day L.E. Eds.) p. 355-401. Academic Press, Orlando, FL

Crawford D.L., Lynch J.M., Whipps J.M. and Ousley M.A. (1993) Isolation and characterization of actinomycete antagonists of a fungal root pathogen. *Applied and Environmental Microbiology* 59(11): 3899-3905.

Distler J., Braun C., Ebert A. and Piepersberg W. (1987) Gene cluster for streptomycin biosynthesis in *Streptomyces griseus*: analysis of a central region including the major resistance gene, *Molecular General Genetics*, 208 (1–2): 204–210

Doelle, H.W., Mitchell, D.A., Rolz, C.E. (1992) *Solid Substrate Cultivation*. Elsevier Applied Science, New York.

Doull J.L., Vats S., Chaliciopoulos M., Stuttard C., Wong K. and Vining L.C. (1986) Conjugational fertility and location of chloramphenicol biosynthesis genes on the chromosomal linkage map of *Streptomyces venezuelae*, *Journal of General Microbiology*, 132 (Pt 5), 1327–1338.

Dyson P. (2011) *Streptomyces: Molecular Biology and Biotechnology*. Caister Academic Press, Norwich.

Ebbole D. and Sachs M.S. (1990) A rapid and simple method of isolation of *Neurospora crassa* homokaryons using microconidia. *Fungal Genetics Newsletters* 37: 17-18.

Edwards U., Rogall T., Blöcker H., Emde M. and Böttger E.C. (1989) Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. *Nucleic Acids Research* 17(19): 7843-7853.

El-Naggar M., El-Deeb H. and Ragab S. (2012) Applied approach for controlling powdery mildew disease of cucumber under plastic houses. *Pakistan Journal of Agriculture: Agricultural Engineering Veterinary Sciences*: 28.

El-Tarabily K.A., Hardy G.E.St.G., Sivasithamparam K., Hussein A.M. and Kurtboke D.I. (1997) The potential of the biological control of cavity spot disease of

carrots, caused by *Pythium coloratum*, by streptomycete and non-streptomycete actinomycetes. *New Phytologist* 137: 495-507.

Farrag A.A. (2011) Efficiency of Different Biocontrol Agents on both Susceptible and Resistant Bean Plants and their Protein Pattern Consequences. *Journal of American Science*, 7(4): 7-14.

Fravel D.R., Olivain C. and Alabouvette C. (2003) *Fusarium oxysporum* and its biocontrol. *New Phytologist*, 157:493-502.

Fry W.E. (1982) *Principles of Plant Disease Management*, Academic Press, NY, p. 378

Gao L. and Liu X. (2010) Sporulation of several biocontrol fungi as affected by carbon and nitrogen sources in a two-stage cultivation system, *Journal of Microbiology* 48(6): 767-70. doi: 10.1007/s12275-010-0049-2.

Gasparatos D., Roussos P.A., Christofilopoulou E. and Haidouti C. (2011) Comparative effects of organic and conventional apple orchard management on soil chemical properties and plant mineral content under Mediterranean climate conditions, *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 11:105-117.

Getha K. and Vikineswary S. (2002) Antagonistic effects of *Streptomyces vidiceusniger* strain G10 on *Fusarium oxysporum* f.sp.cubense race 4: indirect evidence for the role of antibiosis in the antagonistic process. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 28(6): 303-10

Godoy-Lutz G., Kuninaga S., Steadman J.R. and Powers K. (2008) Phylogenetic analysis of *Rhizoctonia solani* subgroups associated with web blight symptoms on common bean based on ITS-5.8S rDNA, *Journal of General Plant Pathology*, 74(1): 32-40, DOI: 10.1007/s10327-007-0060-6

Gomes R.C., Semedo L.T., Soares R.M., Linhares L.F., Alviano C.S. and Coelho R.R. (2000) Chitinolytic activity of actinomycetes from a cerrado soil and their potential in biocontrol, *Letters of Applied Microbiology* 30(2): 146-150.

Gordon M.A. (1985) Aerobic pathogenic Actinomycetaceae. In: *Manual of clinical microbiology*, 4th ed. (Lennette E.H., Balows A., Hausler Jr W.J. and Shadomy H.J. Eds.) p. 249-262. American Society for Microbiology, Washington, DC

Griffin D.H. (1994) Introduction to the fungi. In *Fungal Physiology* 2nd Ed. (D.H. Griffin, eds): 1-20, Wiley-Liss, New York.

Goudjal Y¹, Toumatia O, Sabaou N, Barakate M, Mathieu F, Zitouni A. (2013) Endophytic actinomycetes from spontaneous plants of Algerian Sahara: indole-3-acetic acid production and tomato plants growth promoting activity, 10: 1821-1829, doi: 10.1007/s11274-013-1344-y.

Haas D. and Défago G. (2005) Biological control of soil-borne pathogens by *Fluorescent pseudomonas*. *Nature Reviews Microbiology* 3: 307-319. doi:10.1038/nrmicro1129

Hannert H.H. (2002) Bacterial and chemical iron oxide deposition in a shallow Bay on Palaea Kameni, Santorini, Greece: microscopy, electron probe microanalysis, and photometry of in situ experiments, *Geomicrobiology Journal*, 19: 317-342.

Hanson L.E. (2010) Interaction of *Rhizoctonia solani* and *Rhizopus stolonifer* causing root rot of sugar beet. *Plant Diseases* 94: 504-509

Hellenic Ministry of Rural Development and Food, Report on the treatment of soil-borne pests and diseases of greenhouse crops, <http://www.minagric.gr/en/index.html>

Hernández-Suárez, M., Hernández-Castillo, F.D., Gallegos-Morales, G. Hugo Lira-Saldivar, R., Rodríguez-Herrera, R., Aguilar, C.N. (2011) Biocontrol of soil fungi in tomato with microencapsulates containing *Bacillus subtilis*. *American*

Journal of Agricultural and Biological Sciences 6(2): 189-195, DOI: 10.3844/ajabssp.2011.189.195, 2011

Herron, P.R. and Wellington, E.M.H. (1990) New method for extraction of streptomycete spores from soil and application to the study of lysogeny in sterile amended and nonsterile soil. *Applied and Environmental Microbiology* 56(5), 1406-1412.

Hopwood D.A. (1959) Linkage and the mechanism of recombination in *Streptomyces coelicolor.*, *Annual N.Y. Academical Science*, 81, 887–898.

Hopwood D.A. and Kieser T. (1993) Conjugative plasmids of *Streptomyces*. In: Clewell DB (Ed) *Bacterial conjugation* (pp 293–311). Plenum Press, New York

Hopwood D.A., Bibb M.J., Chater K.F., Kieser T., Bruton C.J., Kieser H.M., Lydiate D.J., Smith C.P., Ward J.M. and Schrempf H. (1985) Genetic manipulation of *Streptomyces*. A laboratory manual. John Innes Foundation Norwich, UK

Hopwood D.A., Chater K. F. and Bibb M.J. (1995) Genetics of antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2), a model streptomycete, in *Genetics and Biochemistry of Antibiotic Production (Biotechnology, 28)* L.C.Vining and C.Stuttard, Ed., Butterworth-Heinemann, Toronto, 65–102.

Hopwood D.A., Kieser T., Wright H.M. and Bibb M.J. (1983) Plasmids, recombination and chromosome mapping in *Streptomyces lividans* 66, *Journal of General Microbiology*, 129 (Pt 7) , 2257–2

Hornby D. (1983) Suppressive soils. *Annual Review of Phytopathology* 21: 65-85

Huang C.H., Lin Y.S., Yang Y.L., Huang S.W. and Chen C.W. (1998) The telomeres of *Streptomyces* chromosomes contain conserved palindromic sequences

with potential to form complex secondary structures, *Molecular Microbiology* 28 (5), 905–916.

Huang J., Tauras J. and Chaloupka F.J. (2014) The impact of price and tobacco control policies on the demand for electronic nicotine delivery systems, *Tobacco Control*, 23: iii41-iii47, doi:10.1136/tobaccocontrol-2013-051515

Igarashi Y., Ogawa M., Sato Y., Saito N., Yoshida R., Kunoh H., Onaka H. and Furumai T. (2000) Fistupyrone, a novel inhibitor of the infection of Chinese cabbage by *Alternaria brassicicola*, from *Streptomyces* sp. TP-A0569. *Journal of Antibiotics* (Tokyo) 53:1117-1122.

Ikeda H., Ishikawa J., Hanamoto A., Shinose M., Kikuchi H., Shiba T., Sakaki Y., Hattori M. and Omura S. (2003) Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*. *National Biotechnology* 21:526–531

Janssen D. (2002) Tomatoes: Possible Causes of Sudden Wilt and Deathfile University of Nebraska. <http://lancaster.unl.edu/hort/Articles/2002/TomatoWilt.htm>. (7/12/2007)

Jasmin A.M., Poewll C.P. and Baucom J.N. (1972) Actinomycotic mycetoma in bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) due to *Nocardia paraguayensis*. *Veterinary Medical Small Animal Clinic* 67: 542-543

Kanini G.S., Katsifas E.A., Savvides A.L., and Karagouni A.D. (2013 a) *Streptomyces rochei* ACTA1551, an Indigenous Greek Isolate Studied as a Potential Biocontrol Agent against *Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici*, *BioMed Research International*, Volume 2013 (2013), Article ID 387230, [DOI 10.1155/2013/387230](https://doi.org/10.1155/2013/387230)

Kanini G.S., Katsifas E.A., Savvides A.L., Hatzinikolaou D.G. and Karagouni A.D. (2013) “Greek indigenous streptomycetes as biocontrol agents against the soil-

borne fungal plant pathogen *Rhizoctonia solani*”, Journal of Applied Microbiology. doi: 10.1111/jam.12138

Katan T. (1999) Current status of vegetative compatibility groups in *Fusarium oxysporum*. *Phytoparasitica* 27:51-64.

Katsifas E.A., Giannoutsou E.P. and Karagouni A.D. (1999) Diversity of streptomycetes among specific Greek terrestrial ecosystems. *Letters of Applied Microbiology*, 29(1): 48-51.

Keller U., Kregel U. and Haese A. (1985) Genetic analysis in *Streptomyces chrysomallus*, *Journal of General Microbiology*, 131 (Pt 5), 1181–1191.

Kieser H.M., Kieser T. and Hopwood D.A. (1992) A combined genetic and physical map of the *Streptomyces coelicolor* A3(2) chromosome, *Journal of Bacteriology*, 174 (17), 5496–5507.

Kirby R. (1978) An unstable genetic element affecting the production of the antibiotic holomycin by *Streptomyces clavuligerus*, *FEMS Microbiology Letters*, 3, 283–286.

Kistler H.C. (1997) Genetic diversity in the plant-pathogenic fungus *Fusarium oxysporum*. *Phytopathology* 87:474-479.

Kluth, C., Buhre, C., Varrelmann, M. (2010) Susceptibility of intercrops to infection with *Rhizoctonia solani* AG 2-2 IIIB and influence on subsequently cultivated sugar beet. *Plant Pathology* 59(4), 683–692.

Koeuth T., Versalovic J and Lupski J.R. (1995). "Differential subsequence conservation of interspersed repetitive *Streptococcus pneumoniae* BOX elements in diverse bacteria." *Genome Res*, 5(4): 408-418.

Koike S.T., Subbarao K.V., Davis R.M. and Turini T.A. (2007) Vegetable diseases caused by soilborne pathogens. University of California, Division of Agriculture and Natural Resources, Publication 8099

Kühn J. (1858) Der Schorf oder Grind der Kartoffel. Die Krankheiten Kulturgewächse, ihre Ursachen und ihre Verhütung. Berlin, Besselmann.

Labruyete R.E. (1971) Common scab and it's control in seed-potato crops. Agricultural Research Reports (Versl. Landbouwk. Onderz) 767. Centre for Agricultural Publishing and Documentation, Wageningen

Lahlali R. and Hijri M. (2010) Screening, identification and evaluation of potential biocontrol fungal endophytes against *Rhizoctonia solani* AG3 on potato plants, FEMS Microbiology Letters, 311(2): 152-159.

Lane D.J. (1991) 16S/23S rRNA Sequencing, in Nucleic acid techniques in bacterial systematics, E.Stackebrandt and M. Goodfellow, Editors., John Wiley & Sons Ltd: New York. p. 115-147.

Lapwood D.H. (1973) *Streptomyces scabies* and potato scab disease. In: Actinomycetales: Characteristics and practical importance. (Sykes, G and Skinner, F.A. Eds.) p. 253-260. Academic Press, London

Larkin P.R. and Fravel R.D. (1998) Efficacy of Various Fungal and Bacterial Biocontrol Organisms for Control of Fusarium Wilt of Tomato. Plant Disease / Vol. 82 No. 9, 1023-1028.

Larkin R. (2003) Biocontrol fungi for control of plant pathogens: a whole different biocontrol game. USDA-ARS, New England Plant, Soil, and Water Lab, Orono, ME

Lanoot B., Vancanneyt M., Dawyndt P., Cnockaert M., Zhang J., Huang Y., Liu Z. and Swings J. (2004) BOX-PCR fingerprinting as a powerful tool to reveal

synonymous names in the genus *Streptomyces*. Emended descriptions are proposed for the species *Streptomyces cinereorectus*, *S. fradiae*, *S. tricolor*, *S. colombiensis*, *S. filamentosus*, *S. vinaceus* and *S. phaeopurpureus*. *Systematic Applied Microbiology*, 27: 84–92.

Latorre B. (2004) *Enfermedades de las plantas cultivadas*. Ediciones Universidad Católica de Chile. 638 p. ISBN 956-14-0756-6

Lechevalier M.P and Lechevalier H.A. (1970α) Chemical composition as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes. *International Journal of Systematics and Bacteriology* 20: 435-443.

Lechevalier H.A. and Lechevalier M.P. (1970β) A critical evaluation of the genera of aerobic actinomycetes. In: *The Actinomycetales* (Prauser, H. Ed.) pp. 393-405. Gustav Fischer Verlag.

Lee J.Y. and Hwang B.K. (2002) Diversity of antifungal actinomycetes in various vegetative soils of Korea. *Canadian Journal of Microbiology* 25(11): 1310-1314

Leclere, V., Bechet M., Adam A., Guez J.S. and Wathelet B. (2005) Mycosubtilin overproduction by *Bacillus subtilis* BBG100 enhances the organism's antagonistic and biocontrol activities. *Applied and Environmental Microbiology*, 71: 4577-4584. DOI: 10.1128/AEM.71.8.4577-4584.2005

Lewis G.E., Fidler W.J.Jr and Crumrine M.H. (1972) Mycetoma in cat. *Journal of American Veterinary Medical Associates* 161: 500-503

Lu Z., Tombolini R., Woo S., Zeilinger S., Lorito M. and Jansson J.K. (2004) *In vivo* Study of *Trichoderma*-Pathogen-Plant interactions, using constitutive and inducible Green Fluorescent Protein reporter systems. *Applied and Environmental Microbiology* 70(5): 3073-3081. doi: 10.1128/AEM.70.5.3073-3081.2004

Lucas J.A. (1998). *Plant Pathology and Plant Pathogens* 3rd Edition. Blackwell Science, Oxford. 274pp.

MacHardy W.E. and Beckman C.H. (1981) Vascular wilt Fusaria: infection and pathogenesis. In *Fusarium: Diseases, Biology and Taxonomy* (Eds. P.E. Nelson, T.A. Toussoun and R.J. Cook), pp.365-390. The Pennsylvania State University Press, University Park and London.

Madduri K., Waldron C. and Merlo D.J. (2001) Rhamnose biosynthesis pathway supplies precursors for primary and secondary metabolism in *Saccharopolyspora spinosa*, *Journal of Bacteriology.*, 183 (19): 5632–5638.

Mahadevan B. and Crawford D.L. (1997) Properties of the chitinase of the antifungal biocontrol agent *Streptomyces lidicus* WYEC108. *Enzyme Microbiology and Technology* 20: 293-489.

Maiti N.K., Mandal A., Mohanty S. and Samanta M. (2008) "Comparative analysis of genome of *Edwardsiella tarda* by BOX-PCR and PCR-ribotyping." *Aquaculture* 280(1-4): 60-63.

Maldonado M.C., Orosco C.E., Gordillo M.A., Navarro A.R. (2010) *In vivo* and *in vitro* antagonism of *Streptomyces sp. RO3* against *Penicillium digitatum* and *Geotrichum candidum*. *African Journal of Microbiology Research*, 4(22): 2451-2456.

Malpartida F. and Hopwood D.A. (1984) Molecular cloning of the whole biosynthetic pathway of a *Streptomyces* antibiotic and its expression in a heterologous host, *Nature*, 309 (5967), 462–464.

Malpartida F. and Hopwood D.A. (1986) Physical and genetic characterisation of the gene cluster for the antibiotic actinorhodin in *Streptomyces coelicolor* A3(2), *Molecular General Genetics*, 205 (1), 66– 73.

Mao Y., Varoglu M. and Sherman D.H. (1999) Genetic localization and molecular characterization of two key genes (mitAB) required for biosynthesis of the antitumor antibiotic mitomycin C, *Journal of Bacteriology*, 181 (7), 2199–2208.

Marouli, E.I. and Tzavella-Klonari K. (2002) Control of *Rhizoctonia solani* (Kühn) damping-off in tomato seedbeds using alternative methods to methyl bromide. *Acta Hort. (ISHS)* 579:517-520 http://www.actahort.org/books/579/579_90.htm

Martin B., Humbert O., Camara M., Guenzi E., Walker K., Mitchell T., Andrew P., Prudhomme M., Alloing G., Hakenbeck R., Morrison D.A, Boulnois G.J. and Claverys J.P. (1992) "A highly conserved repeated DNA element located in the chromosome of *Streptococcus pneumoniae*." *Nucl. Acids Res.* 20(13): 3479-3483.

Martin M.F. and Liras P. (1989) Organization and expression of genes involved in the biosynthesis of antibiotics and other secondary metabolites, *Annual Review on Microbiology*, 43, 173–206.

Mazzola M. (2007) Manipulation of rhizosphere bacterial communities to induce suppressive soils. *The Journal of Nematology* 39(3): 213-220

McCarthy A.J. and Williams S.T. (1992) Actinomycetes as agents of biodegradation in the environment - a review. *Gene* 115(1-2): 189-192

Mendez C., Kunzel E., Lipata F., Lombo F., Cotham W., Walla M., Bearden D.W., Brana A.F., Salas J.A. and Rohr J. (2002) Oviedomycin, an Unusual Angucyclinone Encoded by Genes of the Oleandomycin-Producer *Streptomyces antibioticus* ATCC11891, *J Nat.Prod.*, 65 (5): 779–782.

Mengden K., Hahn M. and Deising H. (1996) Morphogenesis and mechanisms of penetration by plant pathogenic fungi. *Annual Reviews of Phytopathology* 34: 367-386.

Mishra S.K., Gordon R.E. and Barnett D.A. (1980) Identification of Nocardiae and streptomycetes of medical importance. *Journal of Clinical Microbiology* 11: 728-736

Mitchell D.A. (1992) Growth patterns, growth kinetics and the modeling of growth in solid-state cultivation. In: Doelle, H.W., Mitchell, D.A., Rolz, C.E. (Eds), *Solid Substrate Cultivation*. Elsevier Applied Science, New York, pp. 87–114.

Montealegre J., Valderrama L., Sanchez S., Herrera R., Besoain X. and Pérez, L.M. (2010) Biological control of *Rhizoctonia solani* in tomatoes with *Trichoderma harzianum* mutants. *Electronic Journal of Biotechnology* 13(2). doi: 10.2225/vol13-issue2-fulltext-6

Moss M.O. and Smith J.E. (1984) *The applied mycology of Fusarium: Symposium of the British mycology society held at Queen Mary College, London, September 1982*. Cambridge University Press: Cambridge. 264 pp.

Motamedi H. and Hutchinson C.R. (1987) Cloning and heterologous expression of a gene cluster for the biosynthesis of tetracenomycin C, the anthracycline antitumor antibiotic of *Streptomyces glaucescens*, *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A.*, 84 (13), 4445–4449.

Nameth S. (2001) Biofungicides. Updates for Ohio Commercial Floriculture. Volume 8 (6).

Nebel B. and Wright R. (1998) *Environmental Science*, 6th Edition, Prentice Hall.

Neeno-Eckwall, E., Kinkel, L., Schottel, J. (2001) Competition and antibiosis in the biological control of potato scab. *Canadian Journal Microbiology* 47: 332-340.

Nelson P.E., Horst R.K. and Woltz S.S. (1981) *Fusarium* diseases of ornamental plants. In *Fusarium: diseases, biology and taxonomy*. (Nelson PE, Toussoun TA and Cook RJ eds). Pennsylvania State University Press, University Park and London. 193pp.

Nelson P.E., Toussoun T.A. and Marasas W.F.O. (1983) *Fusarium* species: an illustrated manual for identification. University Park (PA): The Pennsylvania State University Press. 193 p.

Nerey Y., Pannecoucq J., Hernandez H.P., Diaz M., Espinosa R., De Vos S., Van Beneden S., Herrera L. and Höfte M. (2010) *Rhizoctonia* spp. Causing Root and Hypocotyl Rot in *Phaseolus vulgaris* in Cuba. *Journal of Phytopathology* 158(4): 236-243. doi: 10.1111/j.1439-0434.2009.01609.x

Ogawa K. and Komada H. (1984) Biological control of *Fusarium* wilt of sweet potato by non-pathogenic *Fusarium oxysporum*. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* 50: 1–9.

Ohnuki T., Imanaka T. and Aiba S. (1985) Self-cloning in *Streptomyces griseus* of an str gene cluster for streptomycin biosynthesis and streptomycin resistance, *Journal of Bacteriology*, 164 (1): 85–94.

Oskay M. (2009) Antifungal and antibacterial compounds from *Streptomyces* strains, *African Journal of Biotechnology*, 8(13): 3007-3017

Pape H. and Rehm H.J. (1986) *Biotechnology*, vol. 4. *Microbial Products II*. VCH (Verlag Chemie), Weinheim, Deerfield Beach, FL

Paradkar A., Trefzer A., Chakraborty R. and Diane Stassi (2003) *Streptomyces* Genetics: A Genomic Perspective, *Critical Reviews in Biotechnology*, 23(1):1–27.

Parag Y. (1978) Genetic recombination in *Streptomyces griseus*. *Journal of Bacteriology*, 133 (2), 1027–1031.

Parmeter J.R., Sherwood R.T. and Platt W.D. (1969) Anastomosis grouping among isolates of *Thanateporous cucumeris*. *Phytopathology* 59: 1270-1278

Patel J.B. (2001) "16S rRNA gene sequencing for bacterial pathogen identification in the clinical laboratory" Mol. Diagn. 6:313-321.

Paululat T., Kulik A., Hausmann H., Karagouni A.D., Zinecker H., Imhoff J.F., and Fiedler H.P. (2010) Grecoacyclines: New Angucyclines from *Streptomyces sp.* Acta 1362. European Journal of Organic Chemistry 12:2344–2350. doi: 10.1002/ejoc.201000054

Paululat T., Katsifas E., Karagouni A. and Fiedler H.P. (2008) Grecoaketides A and B: New Naphthoquinones from *Streptomyces sp.* Acta 1362. European Journal of Organic Chemistry, 5283-5288.

Petti and Cathy B.A. (2007) "Medical Microbiology: Detection and Identification of Microorganisms by Gene Amplification and Sequencing." Clinical Infectious Diseases 44(8): 1108-1114.

Philipp W.J., Nair S., Guglielmi G., Lagranderie M., Gicquel B. and Cole S.T. (1996) Physical mapping of Mycobacterium bovis BCG pasteur reveals differences from the genome map of Mycobacterium tuberculosis H37Rv and from M. bovis, Microbiology, 142, 3135–3145.

Pisabarro A., Correia A. and Martin J.F. (1998) Pulsedfield gel electrophoresis analysis of the genome of Rhodococcus fascians: genome size and linear and circular replicon composition in virulent and avirulent strains, Current Microbiology, 36 (5), 302–308.

Postma J. and Rattink H. (1992) Biological control of fusarium wilt of carnation with a nonpathogenic isolate of *Fusarium oxysporum*. Canadian Journal of Botany 70: 1199–1205.

Pridham T.G. and Tresner H.D. (1974) Genus I. Streptomyces Waksman and Henrici. In: Bergey's manual of determinative biotechnology, 8th ed. Williams and Wilkins (Buchanan R.E. and Gibbons N.E. Eds.) p. 748-829. Baltimore

Prillieux and Delacroix (1891) *Endoconidium temulentum*, champignon dormant au seigle des propriétés veneneuses. Bulletin de la Société Mycologique de France 7: 16-117

Puhalla, J.E. (1985) Classification of strains of *Fusarium oxysporum* on the basis of vegetative compatibility. Canadian Journal of Botany 63: 179–183.

Pulverer G. and Schaal K.P. (1978) Pathogenicity and medical importance of aerobic and anaerobic actinomycetes. In: *Nocardia and Streptomyces*. Proc. International Symposium on *Nocardia and Streptomyces*. Warsaw, 1976 (Mordrski M., Kurylowicz W. and Jeljaszewicz J. Eds.) p. 4127-427. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart

Raaijmakers J.M., Paulitz T.C., Steinberg C., Alabouvette C and Moenne-Loccoz Y. (2009) The rhizosphere: a playground and battlefield for soilborne pathogens and beneficial organisms, Plant and Soil, 321: 341-361

Raj A., Kumar S., Haq I. and Kumar M. (2014) Detection of Tannery Effluents Induced DNA Damage in Mung Bean by Use of Random Amplified Polymorphic DNA Markers, Hindawi Publishing Corporation, ISRN Biotechnology, Volume 2014, Article ID 727623, 8 pages, <http://dx.doi.org/10.1155/2014/727623>.

Raja A., Hattab K.O., Gurusamy L. and Suganya S. (2007) Sulphur levels on nutrient uptake and yield of sesame varieties and nutrient availability, International Journal of Soil Science, 2: 278-285.

Recorbet G. and Alabouvette C. (1997) Adhesion of *Fusarium oxysporum* conidia to tomato roots. Letters in Applied Microbiology, 25: 375-379.

Redenbach M. et al (2000) Chromosome topology and genome size of selected Actinomycetes species. Antonie Van Leeuwenhoek, 78: 227–235

Rothrock C.S. and Gottlieb D. (1984) Role of antibiosis in antagonism of *Streptomyces hygroscopicus* var. *geldanus* to *Rhizoctonia solani* in soil. Canadian Journal of Microbiology, 30: 1440–1447.

Sadeghi A., Hesan A., Askari H., Qomi D.N., Farsi M. and Hervan E.M. (2009) Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off of sugar beet with native *Streptomyces* strains under field conditions. Biocontrol Science and Technology 19(9):985–991. doi: 10.1080/09583150902912665

Sarani S. (2012) Introduction of some important antagonistic bacteria affecting on damping-off of canola, Communications In Agricultural and Applied Biological Sciences, 77(3): 275-80.

Scherwinski K., Grosch R. and Berg G. (2008) Effect of bacterial antagonists on lettuce: active biocontrol of *Rhizoctonia solani* and negligible, short-term effects on nontarget microorganisms. FEMS Microbiology and Ecology 64: 106–116. doi:10.1111/j.1574-6941.2007.00421.x

Schippers B. and Van Eck W.H. (1981) Formation and survival of chlamydospores in *Fusarium*, *Fusarium Diseases, Biology and Taxonomy* (Nelson, P.E., Toussoun, T.A. & Cook, R.J. Eds), The Pennsylvania State University Press, University Park, PA, pp. 250-260.

Sessitsch A., Reiter B., Pfeifer U. and 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 and Ecology 39, 23-32.

Shekhar N., Bhattacharya D., Kumar D. and Gupta R.K. (2006) Biocontrol of wood-rotting fungi with *Streptomyces violaceusniger* XL-2. Canadian Journal of Microbiology 52: 805-808.

Sherman D.H., Malpartida F., Bibb M.J., Kieser H.M., Bibb M.J. and Hopwood D.A. (1989) Structure and deduced function of the granaticin producing polyketide

synthase gene cluster of *Streptomyces violaceoruber* Tu22, EMBO Journal, 8(9): 2717–2725.

Shirling E.B. and Gottlieb D. (1968) Cooperative description of type cultures of *Streptomyces*. II. Species description from the first study. International Journal of Systematic Bacteriology 18, 69-189.

Shoseyov O. and Doi R.H. (1990) Essential 170-kDa subunit for degradation of crystalline cellulose by *Clostridium cellulovorans* cellulase. Processes in National Academy of Science USA, 87(6): 2192–2195

Simon H.M., Smith K.P., Dodsworth J.A., Guenther B., Handelsman J. and Goodman R.M. (2001) Influence of tomato genotype on growth of inoculated and native bacteria in the spermosphere. Applied and Environmental Microbiology, 67: 514–520.

Sivan A. and Chet I. (1989) The possible role of competition between *Trichoderma harzianum* and *Fusarium oxysporum* on rhizosphere colonization. Phytopathology, 79: 198-203.

Smith I.M., Dunez J., Phillips D.H., Lelliott R.A. and Archer S.A. (1988) European handbook of plant diseases. Blackwell Scientific Publications: Oxford. 583pp.

Smokvina T., Francou F. and Luzzati M. (1988) Genetic analysis in *Streptomyces ambofaciens*. Journal of General Microbiology 134 (Pt 2), 395–402.

Sneh B., Jabaji-Hare S., Neate S. and Dijst G. (1996) Rhizoctonia species: Taxonomy, Molecular Biology, Ecology, Pathology and Control. 578 pp. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands

Sosio M., Bossi E., Bianchi A. and Donadio S. (2000) Multiple peptide synthetase gene clusters in Actinomycetes. Molecular General Genetics, 264 (3): 213– 221.

Sowndhararajan K. and Kang S.C. (2012) *In vitro* antagonistic potential of *Streptomyces* sp. AM-S1 against plant and human pathogens. *Journal of Agricultural Chemistry and Environment*, 1:41–47.

Stover R.H. (1962 α) Studies on Fusarium wilt of bananas. VIII. Differentiation of clones by cultural interaction and volatile substances. *Canadian Journal of Botani*, 40: 1467-1471.

Stover R.H. (1962 β) Studies on Fusarium wilt of bananas. IX. Competitive saprophytic ability of *Fusarium oxysporium* f.sp. *Cubense*. *Canadian Journal Of Botany*, 40: 1373-1408.

Stover R.H. (1970) Banana root diseases caused by *Fusarium oxysporum f.sp. cubense*, *Pseudomonas solanacearum*, and *Radopholus similis*: A comparative study of life cycles in relation to control. In *Root diseases and soil-borne pathogens*, (T.A. Toussoun, R.V. Bega, & P.E. Nelson, eds): 197-200. University California Press.

Sullivan P. (2004) Sustainable management of soil-borne plant diseases. ATTRA Publication #IP173

Toussoun T.A. and Nelson P.E. (1968) A Pictorial Guide to the Identification of Fusarium species according to the taxonomic system of Snyder and Hansen. The Pennsylvania State Universtiy Press: University Park, Pennsylvania. 51 pp.

Tredway L.P. and Burpee L.L. (2001) Rhizoctonia diseases of turfgrass. *The Plant Health Instructor*. DOI: 10.1094/PHI-I-2001- 1109-01

Versalovic J., de Bruin F.J. and Lupski J.R. (1994) Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence based PCR. *Methodology of Cellular and Molecular Biology* 5: 25-40.

Vidhyasekaran P. (1997) Fungal pathogenesis in plants and crops : Molecular biology and host defense mechanisms. Marcel Dekker, New York pp. 553.

Visser M. (2003) *Molecular Biological Studies of the fusarium wilt Pathogen of Banana of South Africa*. Ph.D. Thesis University of Pretoria, South Africa: Chapter 6.

Waksman S.A and Woodruff H.B. (1941) Bacteriostatic and bacteriocidal substances produced by a soil actinomyces. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine 45, 609-614.

Waksman S.A. and Henrici A.T. (1943) The nomenclature and classification of the actinomycetes. Journal of Bacteriology 46, 337-341.

Walker, J. M., Belkum A. and Hermans P.W.M. (2001). BOX PCR Fingerprinting for Molecular Typing of *Streptococcus pneumoniae*. Antibiotic Resistance. S. H. Gillespie, Humana Press. 48: 159-168.

Wellington E.M.H. and Williams S.T. (1978) Preservation of Actinomycete inoculum in frozen glycerol. Microbiology Letters 6: 151-157.

Wellington E.M.H., Cresswell N. and Saunders V.A. (1990) Growth and survival of streptomycete inoculants and extent of plant transfer in sterile and non sterile soil. Applied and Environmental Microbiology, 56: 1413-1419

Whipps J.M. (2001) Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. Journal of Experimental Botany, 52: 487-511.

Williams S.T. and Wellington E.M.H. (1982) Principle and problems of selective isolation of microbes. In: Bioactive products: Search and discovery (Bu'Lock, J.D., Nisbet, L.J. & Winstanly, D.J. Eds.) p. 9-26. Academic Press, New York.

Wilson I.M. (1946) Observations on wilt disease in flax. Transactions of the British Mycological Society 29: 221-231.

Woo P.C.Y., Lau S.K.P., Teng J.L.L., Tse H. and Yuen K.Y. (2008) "Then and now: use of 16S rDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories." *Clinical Microbiology and Infection* 14(10): 908-934.

Wright F. and Bibb M.J. (1992) Codon usage in the G+C rich *Streptomyces* genome, *Gene*, 113 (1): 55–65.

Yekkour A., Sabaou N., Zitouni A., Errakhi R., Mathieu F. and Lebrihi A. (2012) Characterization and antagonistic properties of *Streptomyces* strains isolated from Saharan soils and evaluation of their ability to control seedling blight of barley caused by *Fusarium culmorum*, *Letters in Applied Microbiology*, 55: 427 –435

Yu T.W., Bai L., Clade D., Hoffmann D., Toelzer S., Trinh K.Q., Xu J., Moss S.J., Leistner E. and Floss H.G. (2002) The biosynthetic gene cluster of the maytansinoid antitumor agent ansamitocin from *Actinosynnema pretiosum*, *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A*, 99 (12), 7968–7973.

Yuan W. and Crawford D. (1995) Characterization of *Streptomyces lydicus* WYEC108 as a potential biocontrol agent against fungal root and seed rots. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(8): 3119-3128.

Ιστότοποι

<http://www.bacterialphylogeny.info/groupspecific/actinobacteria/actinobacteria.html>

<http://www.cbwinfo.com>

[http://www.google.gr/imgres?imgurl=http://openwetware.org/images/e/ef/Streptomyces_Life_Cycle_\(small\).gif](http://www.google.gr/imgres?imgurl=http://openwetware.org/images/e/ef/Streptomyces_Life_Cycle_(small).gif)

<http://geoplexus.wordpress.com>

<http://www.mycologia.org/cgi/content/full/100/5/746>

http://www.rogersadvantage.com/products/tomato_fusariumrace3.asp

<http://www.slhfarm.com/alfalfapest.html>

<http://www.usda.gov/wps/portal/usda/usdahome>

http://www.rbgsyd.nsw.gov.au/science/hot_science_topics/Soilborne_plant_diseases/Vietnam_template3/Fusarium. (7/12/2007) Botanic Garden Trust. *Fusarium* diseases. *Fusarium* wilt - *Fusarium oxysporum*.

ORIGINAL ARTICLE

Greek indigenous streptomycetes as biocontrol agents against the soil-borne fungal plant pathogen *Rhizoctonia solani*

G.S. Kanini, E.A. Katsifas, A.L. Savvides, D.G. Hatzinikolaou and A.D. Karagouni

Department of Botany, Microbiology Group, Faculty of Biology, National and Kapodistrian University of Athens, Athens, Greece

Keywords

actinobacteria, antifungal activity, biocontrol, phytopathogenic fungi, *Rhizoctonia solani*, *Streptomyces*.

Correspondence

Amalia D. Karagouni, Department of Botany, Microbiology Group, Faculty of Biology, National and Kapodistrian University of Athens, Panepistimioupolis, Zografou, 15781 Athens, Greece. E-mail: akar@biol.uoa.gr

2013/1342: received 26 July 2012, revised 31 December 2012 and accepted 6 January 2013

doi:10.1111/jam.12138

Abstract

Aims: To examine the biocontrol potential of multiactive Greek indigenous *Streptomyces* isolates carrying antifungal activity against *Rhizoctonia solani* that causes damping-off symptoms on beans.

Methods and Results: A total of 605 *Streptomyces* isolates originated from 12 diverse Greek habitats were screened for antifungal activity against *R. solani* DSM843. Almost one-third of the isolates proved to be antagonistic against the fungus. From the above isolates, six were selected due to their higher antifungal activity, identified by analysing their 16S rRNA gene sequence and studied further. The obtained data showed the following: firstly, the isolates ACTA1383 and ACTA1557 exhibited the highest antagonistic activity, and therefore, they were selected for *in vivo* experiments using bean seeds as target; secondly, in solid and liquid culture experiments under optimum antagonistic conditions, the medium extracts from the isolates OL80, ACTA1523, ACTA1551 and ACTA1522 suppressed the growth of the fungal mycelium, while extracts from ACTA 1383 and ACTA1557 did not show any activity.

Conclusions: These results corresponded important indications for the utility of two Greek indigenous *Streptomyces* isolates (ACTA1557 and ACTA1383) for the protection of the bean crops from *R. solani* damping-off symptoms, while four of them (isolates OL80, ACTA1523, ACTA1551 and ACTA1522) seem to be promising producers of antifungal metabolites.

Significance and Impact of the Study: This is the first study on the biocontrol of *R. solani* using multiactive *Streptomyces* isolates originated from ecophysiological special Greek habitats. Our study provides basic information to further explore managing strategies to control this critical disease.

Introduction

Among the most common phytopathogenic fungi, *Rhizoctonia solani* Kühn [teleomorph: *Thanatephorus cucumeris* (A.B. Frank) Donk; basidiomycetes] is an important soil-borne pathogen responsible for the 'damping-off' of many widely cultured plants, such as potato and tomato plant (De Curtis *et al.* 2010; Lahlali and Hijri 2010; Montealegre *et al.* 2010), bean plant (Balali and Kowsari 2004; Godoy-Lutz *et al.* 2008; Nerey *et al.* 2010) and cotton (Abd-Elsalam *et al.* 2010) thus constituting a financial threat for farmers. The 'damping-off' symptom

is characterized by the disability of seeds to shoot or by the mortification of seedlings either before or after their emergence. Especially for bean plants, 'damping-off' means the sudden decay of the young seedlings of the plant, a few days after their emergence (Balali and Kowsari 2004).

The pathogen is characterized by significant ecological advantages such as an extremely broad host range and a high survival rate of sclerotia, under various environmental conditions, and therefore, its control is difficult to accomplish. Currently, *Rhizoctonia* diseases are not adequately controlled and their severity can only be limited

through a combination of cultural and crop protection strategies. For instance, planting seeds in warm soils and covering them with as little soil as possible speeds the sprouting and development of the stem while reducing the risk of stem canker. Farmers also use chemical control and several products like azoxystrobin (Amistar; Syngenta), chlorothalonil (Daconil 2787; Aventis), cymoxanil (Curzate 50; Dupont), flutolanil (Monarch; Aventis), pencycuron (Monceren; Bayer) and propamocarb (Previcur N; Aventis) (van den Boogert and Lutikholt 2004), which have been developed for this purpose. They concern both seed treatment and soil application, although they resulted in poor *Rhizoctonia* control (Wharton *et al.* 2007).

In Greece, *Rhizoctonia solani* harms tobacco plants (northern Greece), tomato plants (northern and central Greece) and bean plants (central and southern Greece). The control of the soil-borne plant pathogens, including *R. solani*, is based mainly on cultural practices like decrease in soil moisture, soil coverage and the use of phytopathogen-resistant hybrids. Greek farmers also use chemical disinfectants with no significant effect, for example, metham sodium (Vapam), quintozone + etridiazole as Terrachlor Super-X and methyl bromide either prior to or after the infection, but their use is limited because of their high cost and their strong toxicity (Marouli and Tzavella-Klonari 2002). Also, due to the lack of coordination between the Greek Ministry of Agriculture and the agricultural cooperatives, the flow of information about treatment procedures is obscure and inadequate.

The increasing concern for environmental protection and demand for organic farming drives research towards alternative control measures, such as the use of natural antagonists to biologically control plant pathogens (De Curtis *et al.* 2010; Hernández-Suárez *et al.* 2011).

Actinobacteria and particularly members of the genus *Streptomyces* are characterized by their complex morphological differentiation and the ability to produce a wide variety of secondary metabolites (Challis and Hopwood 2003). These micro-organisms can be found in the rhizosphere of several plant species (Crawford *et al.* 1993; Kortemaa *et al.* 1994; Tokala *et al.* 2002; Ramakrishnan *et al.* 2009) behaving as endophytes that occur within the roots of barley (Sadeghi *et al.* 2009; Kluth *et al.* 2010) or the stems of potato (Sessitsch *et al.* 2002). Plant root exudates stimulate rhizosphere growth of streptomycetes that are strongly antagonistic to fungal pathogens (Yuan and Crawford 1995).

Several *Streptomyces* species such as *S. lydicus*, *S. lividans*, *S. olivaceoviridis*, *S. scabies*, *S. plicatus*, *S. hydrosopicus*, *S. violaceusniger*, *S. humidus*, *S. avermitilis*, *S. aurofaciens* and *S. roseoflavus* are well-known

producers of important compounds that are active against a wide variety of fungal pathogens (Taechowisan *et al.* 2009). These include a wide range of antibiotics as well as a variety of enzymes (i.e., chitinases), which degrade the fungal cell wall (Chamberlain and Crawford 1999; Gomes *et al.* 2000; Hwang *et al.* 2001; Getha and Vikineswary 2002; Taechowisan *et al.* 2003; De Souza *et al.* 2008). Metabolites from streptomycetes have been used in agriculture as growth promoters (Igarashi *et al.* 2000; El-Tarabily 2008; Ichinose *et al.* 2008; Schrey and Tarkka 2008) and selected strains of the genus also have been used as direct biocontrol agents for other plant diseases (Yuan and Crawford 1995; Neeno-Eckwall *et al.* 2001; Shekhar *et al.* 2006; Godoy-Lutz *et al.* 2008; Bakker *et al.* 2010).

The Greek territory, due to its geographical position that is characterized by the Mediterranean climate conditions, has been proved to be a rich habitat for streptomycete populations with biotechnological interest (Katsifas *et al.* 1999, 2000; Baur *et al.* 2006; Paululat *et al.* 2008, 2010).

In this study, we aimed to select Greek *Streptomyces* isolates from the Athens University Microbiology Laboratory Culture Collection for their antifungal activity against *Rhizoctonia solani* DSM843. Two of them were used for *in vivo* studies to control the phytopathogenic fungus *R. solani* DSM843 using the plant *Phaseolus vulgaris* L. (Fabaceae) as a model fungal target. In addition, medium extracts from solid and liquid cultures of selected isolates were investigated for their antifungal activity. Gel filtration fractions of the above extracts were also used for *in vitro* antifungal assays to provide initial information on the molecular features of the possible bioactive compounds.

Materials and methods

Microbial strains

A total of 605 bacterial isolates assigned to the genus *Streptomyces* on the basis of their phenotypic characteristics (Herron and Wellington 1990) were screened *in vitro* for antifungal activity against the phytopathogenic fungus *R. solani* DSM843 (Table 1). These strains were derived from the Athens University Microbiology Laboratory Culture Collection and have been isolated from 12 different Greek habitats using selective media (Katsifas *et al.* 1999). According to the 12 selected habitats, the samples are grouped into soil samples from the rhizospheres of indigenous plants (Table 1A) and nonrhizosphere samples (Table 1B). All isolates were maintained as spore suspensions in 30% (w/v) glycerol at -20°C (Herron and Wellington 1990).

Table 1 *Streptomyces* strains and their antifungal activity from each of the 12 studied Greek habitats

| Sampling area | Number of isolates tested | Number (percentage) of isolates with antifungal activity against <i>Rhizoctonia solani</i> DSM843 {highest – lowest – average}* |
|---|---------------------------|---|
| (A) Rhizosphere samples | | |
| 1. Rhizosphere of <i>Ebenus sibirici</i> | 39 | 10 (25.6%) {7.4; 1.3; 4.5} |
| 2. Rhizosphere of <i>Ceratonia silicva</i> | 47 | 9 (19.1%) {5.4; 1.3; 2.8} |
| 3. Rhizosphere of <i>Olea europea</i> | 75 | 25 (33.3%) {9.0; 1.3; 4.1} |
| 4. Rhizosphere of <i>Abies cefalonica</i> | 20 | 0 (0.0%) |
| 5. Rhizosphere of <i>Pinus brutia</i> from Crete | 24 | 12 (50.0%) {9.7; 1.9; 4.5} |
| 6. Rhizosphere of evergreen woody shrubs from an island of the Aegean Sea | 22 | 13 (59.1%) {11.5; 1.3; 5.0} |
| 7. Rhizosphere of evergreen woody shrubs from an island of the Ionian Sea | 30 | 0 (0.0%) |
| 8. Rhizosphere of coniferous trees (Arcadian forest) | 100 | 26 (26.0%) {7.6; 1.4; 3.7} |
| Rhizosphere subtotals | 357 | 95 (26.6%) |
| (B) Nonrhizosphere samples | | |
| 9. Hot spring water of thermopiles thermal springs (Viotia District) | 5 | 5 (100.0%) {7.0; 2.2; 5.1} |
| 10. Sediment from a volcanic area (Santorini Island – Aegean Sea) | 30 | 1 (3.3%) {5.6; 5.6; 5.6} |
| 11. Soil derived from cultivated area (Marathon, Attica District) | 186 | 100 (53.8%) {9.2; 1.3; 3.9} |
| 12. Soil from protected natural forest area (Kessariani, Attica District) | 27 | 12 (44.4%) {9.6; 2.5; 5.4} |
| Nonrhizosphere subtotals | 248 | 118 (47.6%) |
| Total | 605 | 213 (35.2%) |

*Antagonistic activity levels as expressed by the quotient of the inhibition zone area over streptomycete colony area (See *In vitro* antagonism bioassays).

Rhizoctonia solani DSM843 that was used as target fungus for the antagonism bioassays belonged to the anastomosis group 1 (AG-1) and was maintained on potato dextrose agar (PDA) suggested by DSMZ, Germany, at 4°C.

Preparation of inoculum of biocontrol agents and fungi

Streptomycete aliquots (30 µl) from a spore suspension in 30% (w/v) glycerol were used as inoculum for all *in vitro* antagonism bioassays. For the same test, we used two full loops of *R. solani* mycelium from a 5-day-old culture on PDA.

For *in vivo* antagonism tests, a suspension of streptomycetes spores in Ringer ¼ salt solution (NaCl 2.15 g l⁻¹, KCl 0.15 g l⁻¹, CaCl₂ 0.075 g l⁻¹, K₂HPO₄ 0.5 g l⁻¹ according to Wellington *et al.* 1990) (10⁹ spores per ml) was prepared from a 5-day-old culture on arginine–glycerol–salt agar (AGS), as described by Herron and Wellington (1990), and used for the bean seed treatments. *Rhizoctonia solani* was cultured in nutrient broth (NB, Biokar Diagnostics, Beauvais, France) for 5 days at 28°C and 180 rpm. The mycelium was aseptically collected on filter paper and washed with three culture volumes of

deionized sterile water. Three grams of wet mycelium (dry weight, 15–18% w/w) was resuspended in 1000 ml deionized sterile water and was thoroughly mixed with 1 kg of either sterile or nonsterile soil (Lu *et al.* 2004).

In vitro antagonism bioassays

Antifungal antagonism was determined using a modified agar plate antagonism bioassay (Crawford *et al.* 1993). All streptomycetes were spot inoculated in the centre of NA agar plates (triplicate plates). Plates were incubated at 28°C for 2 days prior to fungal inoculation. The phytopathogenic fungus was inoculated in two antidiagonal positions, 1 cm from the plate edge. Following fungal inoculation, the plates were incubated at 28°C for 5 days. Antagonistic activity of the streptomycetes was determined by measuring the inhibition zone, the presence of which characterized the strain as positive.

Antagonism strength was determined by averaging (triplicate plates per strain x three independent experimental sets) the quotient of the area of the inhibition zone, which was formed around the streptomycetes colony, over the area of the streptomycetes colony itself [Antifungal activity = $\pi R_z^2 / \pi R_{str}^2$ (R_z = radius of

inhibition zone and R_{str} = radius of streptomycetes colony, modified from Seeley *et al.* 1990)].

Taxonomy of streptomycetes

The 22-mer BOX A1R oligonucleotide (5'-CTACGGCAA GGCGACGCTGACG-3') was used to generate BOX-PCR profiles (Versalovic *et al.* 1991; Martin *et al.*, 1992). Amplification reactions were performed in volumes of 25 μ l, containing 2 μ mol l⁻¹ of the single BOX primer, 200 μ mol l⁻¹ each of dATP, dCTP, dGTP and dTTP (Bioprobe Systems/Quantum, Paris, France), PCR buffer [10 mmol l⁻¹ Tris-HCl (pH 9.0), 50 mmol l⁻¹ KCl, 1.5 mmol l⁻¹ MgCl₂, 0.1% Triton X-100 and 0.2 mg ml⁻¹ bovine serum albumin], 1.5 units of Taq DNA polymerase (Biotools, Surrey, UK) and 40 ng template DNA. After initial denaturation for 7 min at 95°C, samples were cycled for 35 cycles using the following profile: denaturation for 1 min at 94°C, primer annealing for 1 min at 53°C and primer extension for 8 min at 65°C, with a final elongation step of 16 min at 65°C. The BOX-PCR was repeated twice and yielded consistent results. We analysed the BOX-PCR profile of the isolates that showed the highest *in vitro* antifungal activity and selected for further studies. The same isolates were further characterized through the amplification of their 16S rRNA gene. The 16S rDNA fragment was amplified by PCR using two universal primers (Edwards *et al.* 1989; Lane 1991): pA (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3') and R1492 (5'-TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T-3'). Amplification reactions were performed in volumes of 50 μ l containing 40 ng template DNA, 0.4 μ mol l⁻¹ of each primer, 1X buffer with Mg²⁺, 1 unit of Taq DNA Polymerase (Biotools) and 0.2 mmol l⁻¹ dNTPs. Nucleases-free water was used to bring the reaction volume to 50 μ l. After initial denaturation at 95°C for 2 min, samples were cycled for 30 PCR cycles using the following cycle profile: 95°C denaturation for 30 s, primer annealing at 53°C for 30 s and primer extension at 72°C for 2 min, plus a final 2-min elongation step at 72°C. Amplified PCR products were separated by gel electrophoresis on 1.2% (w/v) agarose gel and then purified using Nucleospin® Extract PCR kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany). The 16S rDNA fragment (>1400 bp) was fully sequenced (Macrogen, Seoul, Korea), and the results were used for strain identification following comparison with existing sequences of *Streptomyces* type strains (Altschul *et al.* 1997).

In vivo antagonism bioassays

Two *Streptomyces* isolates (ACTA1383 and ACTA1557) were selected for *in vivo* experiments due to the strong

suppression they caused to *R. solani* DSM843 growth *in vitro*. A sandy silt loam soil (ASTM classification) with a pH of 7.9 taken from an area under intense agricultural exploitation in the Marathon area (42 km NE from the centre of Athens) was used. Prior to its use, the soil was air-dried in the dark at 22°C for at least 3 months, passed through a 2-mm sieve and autoclaved twice (121°C, 60 min) on two separate days.

Bean seeds were sterilized for 30 min in a 20% (w/v) chlorine suspension and then dried under sterile conditions. A number of sterile seeds were immersed into a suspension of streptomycetes spores in Ringer ¼ salt solution (Wellington *et al.* 1990) (10⁹ spores per ml) for 30 min and then dried under sterile conditions. Untreated sterile bean seeds and sterile bean seeds treated with the selected streptomycetes were planted in pots containing sterile soil amended with *Rhizoctonia solani* (3 g of wet washed mycelium per kg of soil) or not (Lu *et al.* 2004). For every treatment, 24 seeds were planted in each pot (three replicates for each pot were prepared). Each full experiment was conducted in four different occasions, over a time period of 8 months. The pots were incubated at 28°C under fluorescent light, and moisture was controlled daily at the level of 40% (w/w) for 25 days. The number of seeds that survived and/or germinated was evaluated to estimate the ability of the examined streptomycetes to control the fungi *in vivo*. In addition, the height and weight of the emerged plants were measured for the estimation of the *in vivo* antagonism strength. The same set of experiments was carried out using nonsterile soil of the same origin.

Extraction and fractionation of streptomycetes metabolites from solid and liquid cultures

In parallel, the *Streptomyces* isolates that showed the highest antifungal activity *in vitro* were grown on SAB [Streptomyces antibiotic broth (Atlas 1993)] because it was selected as optimum medium for high antifungal activity expression by the *Streptomyces* isolates. The cultures were incubated at 28°C for 7 days in 1000-ml Erlenmeyer flasks containing 500 ml of liquid medium on orbital shaker S03, at 180 rpm. 500 μ l of 10⁸ spores ml⁻¹ suspension was used as inoculum. Cultures were centrifuged (Biofuge 28RS; Heraeus, Hanau, Germany) at 9000 g for 20 min. Supernatant was collected, concentrated by lyophilization (1 : 100) and filtered (0.45 μ m). For the determination of antifungal activity, 200 μ l from the concentrated culture supernatant was placed into wells on SAA (Streptomyces antibiotic agar) plates (formed using a cork borer – diameter 1 cm, depth 1 cm) that were inoculated with the fungus.

Additionally, the inhibition zones on SAA plates were removed and blended for 3 min. The slurry was centrifuged at $4000\times g$ for 60 min and the supernatant was collected. After filtration, 200 μ l was placed in a similar manner into wells on SAA agar plates inoculated with the fungus for the determination of the antifungal activity.

The extract from the solid culture of the four *Streptomyces* isolates (OL80, ACTA1523, ACTA1551 and ACTA1522) was fractionated into a high molecular weight (protein) and a low molecular weight (nonprotein) component on a PD-10 gel filtration column (GE Healthcare, Athens, Greece) using de-ionized water for elution, according to the manufacturer's recommendation. Each fraction was concentrated by lyophilization and examined for antifungal activity.

Data analysis

Statistical analysis of the various data sets was conducted through one-way ANOVA (with *post hoc* pairwise multiple comparisons by the Holm–Sidak method) and unpaired *t* tests using SigmaStat/Plot software program (ver. 12.0; Systat Software Inc., Chicago, IL, USA). In all runs, a significance level of <0.05 was used.

Results

In vitro antifungal activity of the streptomycetes

A total of 213 strains of 605 (Athens University Microbiology Laboratory Culture Collection) showed *in vitro* antagonistic activity against *R. solani* DSM843 (Table 1). None of the isolates from *Abies cefalonica* rhizosphere (sampling area 4) or from the rhizosphere of evergreen shrubs of Ionian Sea Island (sampling area 7) were able to suppress the phytopathogenic fungus, while only one isolate from the area of Santorini Island (sampling area 10) showed antifungal activity.

Analysing the level of antifungal activity of the antagonistic isolates, they ranged from the minimum detectable level of 1.3 to the maximum of 11.5. Comparing these results (Table 1), it was found that *Streptomyces* isolates with very high antagonistic activity against *R. solani* DSM843 originated from the rhizosphere of the indigenous plants *Olea europaea*, *Pinus brutia* and evergreen shrubs spontaneous of the Aegean Sea Island (sampling areas 3, 5 and 6).

Elaboration of the above findings and taking into account the results from previous studies by our group (Katsifas *et al.* 1999, 2000; Paululat *et al.* 2008; Baur *et al.* 2006; Paululat *et al.* 2010; ACTAPHARM-Project, Final Report, 2005, <http://cordis.europa.eu/library>) led to the selection of six isolates, for further studies. One

of them, encoded ACTA1383, was one among the 39 strains that were isolated from the rhizosphere of *Ebenus sibirthorpii* (*Fabaceae*), an endangered endemic plant found in low numbers in the Kaisariani area, a preserved forest site, 4 km SE from the centre of Athens (Katsifas *et al.* 1999). Two of the selected isolates, encoded ACTA1557 and ACTA1551, were among the 24 isolates, found in large numbers, in the rhizosphere of *Pinus brutia*, from a forest with coniferous trees on Crete Island (Katsifas *et al.* 1999). The remaining three isolates, encoded OL80, ACTA1522 and ACTA1523, derived from the rhizosphere of *Olea europaea*. All six isolates were among those that revealed the highest *in vitro* antifungal activity (>7) against *R. solani* DSM843 (Table 3). The antagonistic activities among the six isolates were statistically different as determined by one-way ANOVA ($F_{(5,12)} = 8.2887$, $P = 0.0014$). *Post hoc* paired comparisons (Holm–Sidak method) revealed statistically different antagonistic levels for all combinations of two among the six isolates ($P < 0.05$), except for pairs that included any two among the ACTA1551, ACTA1523 and OL80 ($P > 0.05$).

Considering the BOX-PCR fingerprints of the six selected micro-organisms, it was possible to group into four different profiles according to their bar code; three of these groups had only one representative (Fig. 1).

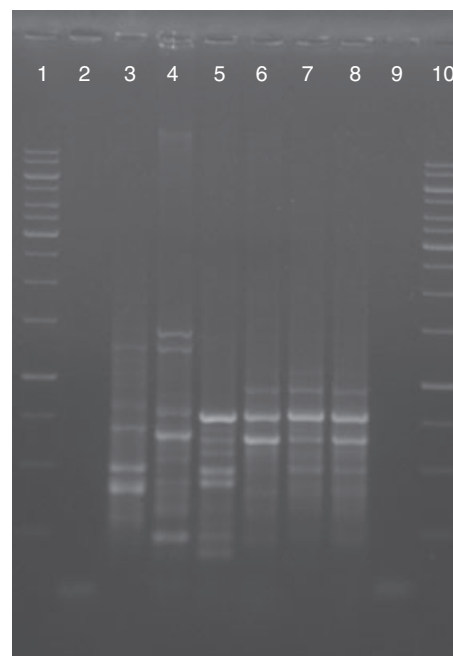


Figure 1 BOX-PCR-based fingerprinting analysis of the selected *Streptomyces* isolates. Lane 1: 1000-bp ladder, Lane 2: water (negative control), Lane 3: ACTA1383, Lane 4: ACTA1557, Lane 5: ACTA1551, Lane 6: ACTA1522, Lane 7: ACTA1523, Lane 8: OL80, Lane 9: water (negative control), Lane 10: 1000-bp ladder.

Three of the six isolates (ACTA1522, ACTA1523 and OL80) shared the identical BOX-PCR bar code and exhibited similar antifungal activity (Fig. 1). The rest of the isolates showed very high antifungal activity and revealed different BOX-PCR profiles, independently of their habitat of origin. 16S rRNA gene sequence data grouped the selected isolates to type strains of streptomycetes as shown in Table 2.

In vivo antifungal activity

Knowing that the culture medium is a crucial factor that can affect the antagonistic character that microbes express, we used the results from the *in vitro* antagonistic assay to lead us to the selection of ACTA1383 (*Streptomyces pseudovenezuelae*) and ACTA1557 (*Streptomyces fulvissimus*) so as to use them for *in vivo* studies. This selection was based on their very high antifungal activity expressed *in vitro* (Table 3) and the observation from previous work (Katsifas *et al.* 1999, 2000; Baur *et al.* 2006; Paululat *et al.* 2008, 2010) that they are multiproducers of bioactive substances. Thus, they characterized as promising biocontrol agents *in vivo*.

Analysis of particle size of the soil that used for this purpose indicated the presence (% dry weight) of sand, 50; silt, 36; clay, 14. Mineralogy analysis showed the presence of (% dry weight) illite, 65; chlorite, 7; kaolinite, 10; smectite, 12; talc, 6 and calcite <1. Phosphorus content was 124 mg l⁻¹ dry soil and organic carbon was 1.23% (dry weight).

Macroscopic observation from these experiments indicated that, although the *R. solani* DSM843 mycelium was developed in all cases, the extent of mycelial growth was strongly dependent on the presence of the streptomycetes.

In sterile soil experiments, germination of the streptomycete-treated seeds was markedly increased when compared to the untreated seeds (Table 4A), because untreated seeds planted in sterile soil and infected with the fungus (negative control A) showed very low levels of germination (only the 2.7% of the planted seeds germinated) and very poor plant growth. Almost 40% of

Table 3 Antagonistic activity levels of the selected isolates as expressed by the quotient of the inhibition zone area over streptomycete colony area (*In vitro* antagonism bioassays)

| Streptomyces isolates | Antagonistic level |
|---|--------------------|
| <i>Streptomyces pseudovenezuelae</i> ACTA1383 | 7.41 ± 0.05 |
| <i>Streptomyces fulvissimus</i> ACTA1557 | 9.70 ± 0.40 |
| <i>Streptomyces rochei</i> ACTA1551 | 9.01 ± 0.26 |
| <i>Streptomyces longisporoflavus</i> ACTA1522 | 8.68 ± 0.09 |
| <i>Streptomyces longisporoflavus</i> ACTA1523 | 9.08 ± 0.89 |
| <i>Streptomyces longisporoflavus</i> OL80 | 9.01 ± 0.47 |

the streptomycete-treated seeds, planted in the same *R. solani* DSM843-infected sterile soil, were able to germinate (Table 4A). Comparison of germination results between the two streptomycete treatments did not yield any statistically significant differences. The mean weights of plants were very similar among the positive control and the two streptomycetes-treated seeds. In fact, the plant weights between the positive control and ACTA1557-treated seeds did not significantly differ, while those of the ACTA1383-treated seeds were only 10% lower than the positive control. On the contrary, the plant heights of the streptomycete-treated seeds reached on average only the 15% the positive controls heights. This weight/height pattern of plants in the sterile soil experiment reflects the difference in the morphology of the treated seed plants that were generally 'shorter' and 'thicker' (Fig. 2).

The *in vivo* results for the nonsterile soil were similar to the sterile soil experiments as far as seed germination is concerned (Table 4B). The only statistically significant difference involved the reduced germination of the ACTA1557-treated seeds in nonsterile soil (as compared both against the same treatment in sterile soil and against ACTA1383 in nonsterile soil). This was also reflected in the plant weights where those of ACTA1557-treated seeds were significantly lower than those of the ACTA1383-treated seeds. Nonsterile soil environment in general, though, had a significant positive effect on plant weight and height of the positive controls and the streptomycete-treated seeds, when

Table 2 Taxonomy of the six selected streptomycetes by 16S rRNA gene sequence data

| Streptomyces isolates | Closest phylogenetic relative (GeneBank Accession number) | % Identity* | GeneBank Accession number |
|-----------------------|---|-------------|---------------------------|
| ACTA1383 | <i>Streptomyces pseudovenezuelae</i> (FR682807.1) | 99.0 | JN167527 |
| ACTA1557 | <i>Streptomyces fulvissimus</i> (AB184787.1) | 99.0 | JN167524 |
| ACTA1551 | <i>Streptomyces rochei</i> (HQ909756.1) | 99.0 | JN167525 |
| ACTA1522 | <i>Streptomyces longisporoflavus</i> (EF178687.1) | 99.0 | JN167526 |
| ACTA1523 | <i>Streptomyces longisporoflavus</i> (EF178687.1) | 99.0 | JN167528 |
| OL80 | <i>Streptomyces longisporoflavus</i> (EF178687.1) | 99.0 | JN167529 |

*The percentage identity with the 16 rDNA sequence of the closest phylogenetic relative.

Table 4 Germination data of bean seeds during *in vivo* antagonism bioassays. The total number of planted bean seeds was (24 per pot) × (three replicates for each pot) × (four independent experiments) = 288. Data from all experiments were combined for the analysis

| Experimental set (abbreviation) | Total number (percentage of germinated seeds) | Average of germinated seeds per pot* | Mean weight of plants (g)† | Mean height of plants (cm)‡ |
|---|---|--------------------------------------|----------------------------|-----------------------------|
| (A) Sterile soil | | | | |
| Positive control A (PcA)§ | 232 (80.6) | 19.33 ± 0.58 | 1.41 ± 0.20 | 31.6 ± 4.32 |
| <i>Streptomyces fulvisimus</i> ACTA1557 (1557A) | 116 (40.3) | 9.67 ± 0.58 | 1.30 ± 0.33 | 4.3 ± 0.75 |
| <i>S. pseudovenezuelae</i> ACTA1383 (1383A) | 100 (34.7) | 8.33 ± 1.53 | 1.27 ± 0.22 | 3.95 ± 0.84 |
| Negative control A (NcA)¶ | 8 (2.7) | 0.67 ± 0.58 | 0.39 ± 0.27 | 0.92 ± 0.65 |
| (B) Nonsterile soil | | | | |
| Positive control B (PcB)§ | 252 (87.5) | 21.00 ± 1.73 | 3.08 ± 0.43 | 36.4 ± 6.25 |
| <i>S. fulvisimus</i> ACTA1557 (1557B) | 76 (26.4) | 6.33 ± 1.15 | 2.06 ± 0.52 | 33.5 ± 8.57 |
| <i>S. pseudovenezuelae</i> ACTA1383 (1383B) | 128 (44.4) | 10.67 ± 1.53 | 2.75 ± 0.71 | 35.8 ± 9.90 |
| Negative control B (NcB)¶ | 8 (2.7) | 0.67 ± 0.58 | 0.32 ± 0.25 | 1.06 ± 0.91 |

*One-way ANOVA on the number of germinated seeds per pot: Sterile soil (A) groups: Differences in the mean values among the treatment groups [PcA, 1557A, 1383A and NcA] are statistically significant ($P < 0.001$), and the corresponding pairwise multiple comparisons (Holm–Sidak method) are all significantly different ($P < 0.001$) except 1557A vs 1383A, which was not statistically significant ($P = 0.155$). Nonsterile (B) soil groups: the differences in the mean values among the treatment groups [PcB, 1557B, 1383B and NcB] are statistically significant ($P < 0.001$) and the corresponding pairwise multiple comparisons (Holm–Sidak method) are all significantly different ($P < 0.001$). Pairwise comparisons among sterile (A) and nonsterile (B) groups: PcA vs PcB and 1383A vs 1383B, not significantly different ($P = 0.189$ and 0.135 , respectively). 1557B vs 1383B significantly different ($P = 0.011$).

†Unpaired *t*-test on plant weights: PcA vs 1557A and 1557A vs 1383A not significantly different ($P > 0.05$). PcA vs 1383A significantly different ($P < 0.001$). PcB vs 1557B or 1383B and 1557B vs 1383B, all significantly different ($P < 0.01$). PcA vs PcB, 1557A vs 1557B and 1383A vs 1383B all significantly different ($P < 0.001$).

‡Unpaired *t*-test on plant heights: PcA vs 1557A or 1383A significantly different ($P < 0.001$). 1557A vs 1383A, significantly different ($P < 0.02$). PcB vs 1557B or 1383B and 1557B vs 1383B all not significantly different ($P > 0.15$). PcA vs PcB, 1557A vs 1557B and 1383A vs 1383B all significantly different ($P < 0.001$).

§Positive control: Noninfected sterile (A) or nonsterile (B) soil planted with sterilized seeds.

¶Negative control: *Rhizoctonia solani*-infected sterile (A) or nonsterile (B) soil planted with sterilized seeds.



Figure 2 *In vivo* antifungal ability of the selected *Streptomyces* isolates in sterile soil experiments – Growth of the bean plants (from left to right). (a) Untreated seed planted in untreated sterile soil (positive control), (b) seed treated with *Streptomyces fulvisimus* ACTA1557 and planted in *Rhizoctonia solani* DSM843-infected soil, (c) seed treated with *Streptomyces pseudovenezuelae* ACTA1383 and planted in *R. solani* DSM843-infected soil and (d) untreated seed planted in *R. solani* DSM843-infected soil (negative control).

compared to sterile soil results. This was especially true for the heights of the plants that did not reveal any significant differences neither between the positive

controls and the treated seeds nor between the two treatments (Table 4B and Fig. 3).

These results showed that *Streptomyces pseudovenezuelae* ACTA1383 proved more effective as a biocontrol agent against *Rhizoctonia solani* in nonsterile processes because seeds treated with its spore suspension promoted better growth of the bean plants resulting in plants with improved height and weight (Figs 2 and 3).

Streptomycetes metabolites from solid and liquid cultures; fractionation of the extracts

The concentrated extracts from the liquid cultures did not show any significant antifungal activity, while the extracts taken from the agar inhibition zones of four of the six isolates could strongly suppress the growth of *R. solani* DSM843 (Fig. 4).

Following fractionation of the bioactive extracts in a gel filtration column, the antifungal activity was observed in the low molecular weight fractions.

Discussion

Selected *Streptomyces* sp. has been used in several studies for the direct biocontrol of various plant diseases (Yuan

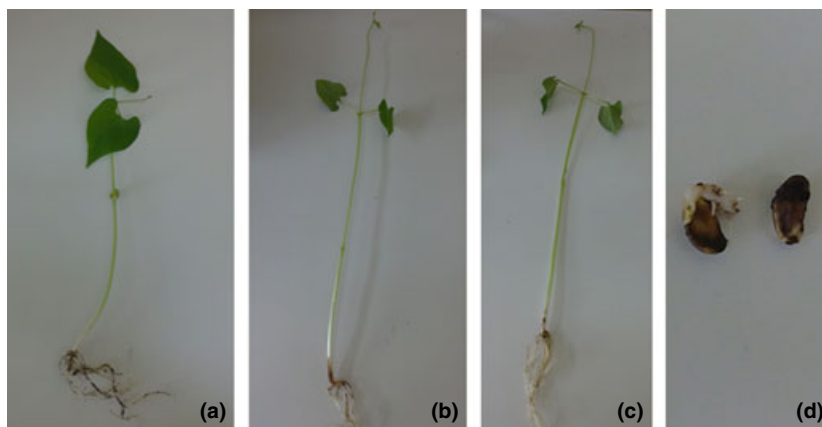


Figure 3 *In vivo* antifungal ability of the selected *Streptomyces* isolates in nonsterile soil experiments – Growth of the bean plants (from left to right). (a) Untreated seed planted in untreated sterile soil (positive control), (b) seed treated with *Streptomyces fulvisimus* ACTA1557 and planted in *Rhizoctonia solani* DSM843-infected soil, (c) seed treated with *Streptomyces pseudovenezuelae* ACTA1383 and planted in *R. solani* DSM843-infected soil and (d) Untreated seed planted in *R. solani* DSM843-infected soil (negative control).



Figure 4 Antifungal activity of the concentrated medium extracts derived from the solid cultures of four *Streptomyces*. Inhibition zone caused from (a) *S. longisporoflavus* ACTA1522 extract, (b) *S. longisporoflavus* ACTA1523 extract, (c) *S. longisporoflavus* OL80 extract, (d) *S. rochei* ACTA1551 extract and negative control (no streptomycete extract added) (e).

and Crawford 1995; Abd-Allah 2001; Neeno-Eckwall *et al.* 2001; Getha and Vikineswary 2002; Shekhar *et al.* 2006). In addition, selected ecosystems such as tomato plant rhizosphere (Cao *et al.* 2004), banana roots (Cao *et al.* 2005) and wheat root tissues (Coombs and Franco 2003) have been recently used as a source for the isolation of streptomycetes with antifungal activity. However, studies involving the evaluation and comparison of indigenous streptomycete potential as biocontrol agents from a variety of different ecosystems are limited in the literature (Gomes *et al.* 2000; Neeno-Eckwall *et al.* 2001; Shekhar *et al.* 2006). The present work involved the screening of 605 *Streptomyces* isolates, originating from 12 different and important habitats within the Greek territory, against phytopathogenic fungus *R. solani* DSM843 and the evaluation of the *in vitro* and the *in vivo* antifungal activity of selected streptomycetes. Previous work on *Streptomyces* isolates of the Athens University Microbiology Laboratory Culture Collection used in this study (Katsifas *et al.* 1999) grouped them into 19 different clusters according to phenotypic identification with some species to be present in more than one habitat and some others to be unique in some sites.

The data of this work, additionally to the above studies, suggested that sampling areas 1, 3 and 5 (Table 1) were a rich pool of not only diverse species, but also active species with high antagonistic activity, a suggestion that may reflect the relation of their features with the habitat of origin.

Particularly, the results from the *in vitro* antifungal activity experiments showed that almost one-third of the examined isolates could be antagonistic to *R. solani* DSM843. Such a percentage (about 35%) justified that the genus of *Streptomyces* could be the most appropriate and promising target for biotechnological applications and especially for biocontrol uses. In addition, it could support a hypothesis that the Greek soil is a convenient substrate for hosting such microbial communities' biocontrol agents (Baur *et al.* 2006; Paululat *et al.* 2008, 2010). The latter is in agreement with the previous observations that the Greek *Streptomyces* isolates are multiactive compared to isolates from other countries (ACTAPHARM, Final Report, 2005, <http://cordis.europa.eu/library>).

The Aegean Sea climate, characterized by its high temperatures and low humidity, results in a soil poor in

nutrients. This fact creates conditions of environmental stress on the indigenous populations of streptomycetes and possibly leads to the prevalence of micro-organisms with antagonistic properties. Furthermore, combined with the high anthropogenic impact on the Aegean Sea Islands, this could probably explain the high percentages of isolates collected from the rhizosphere soil of the plant *Pinus brutia* (indigenous plant of Crete) and of the evergreen shrubs that were antagonistic to *R. solani* *in vitro*. On the contrary, both the rhizosphere of *Abies cefalonica* and evergreen shrubs in the Ionian Sea Islands, which were deliberately selected from areas less touristic and less anthropogenically disturbed, did not yield any isolates with antifungal activity obviously as a result of the very different climatic conditions of the soil of origin (areas of high humidity and low anthropogenic impact).

High percentages (53.8%) of isolates antagonistic to the phytopathogenic fungi were also collected from a nonrhizosphere sample of an agricultural area in Marathon (Attica District). This result again may be due to the fact that the soil of origin was characterized by medium–high temperatures and human activity influence (use of fertilizers and synthetic fungicides).

The results from the *in vivo* antagonism tests were encouraging as they supported the possible systematic use of the two selected *Streptomyces* strains for crop protection. It is known that the antagonistic profile of the micro-organisms is strongly depended on the growth conditions and there are differences between laboratory cultures and *in vivo* processes. In addition, *in vitro* assays are necessary for the screening of the potential antagonistic strains. Therefore, laboratory cultures were used as an original indication as it was the only way to choose the strains for further research. It was shown that the selected strains could express their antifungal activity *in vivo* quite well. Interestingly, these results are in agreement with those from previous studies on the potential of *Streptomyces* isolates to be used as biocontrol agents. For instance, Mahadevan and Crawford (1997) found that *Streptomyces lydicus* was identified as a broad spectrum biocontrol agent while the results from Farrag (2011) enhanced that finding. Moreover, Reddi and Rao (1971) reported that isolates of *Streptomyces ambofaciens* were able to control *Pythium* damping-off in tomato plants and *Fusarium* wilt in cotton plants, in an artificially infested soil. Rothrock and Gottlieb (1984) showed that *S. hygroscopicus* could effectively control *Rhizoctonia* root rot in pea plants in growth chambers, and Maldonado *et al.* (2010) proved that a *Streptomyces* strain originated from Argentina reduced damage caused by *P. digitatum* and *Geotrichum candidum* on citrus plants. These results correspond important indications for the utility of *Streptomyces fulvisimus*

ACTA1557 and *Streptomyces pseudovenezuelae* ACTA1383 for the protection of the bean crops. Of additional importance is that through our experimental approach, the antifungal compounds excreted by the streptomycetes can provide their protective action to the plant just by simple coating of the seeds with spore suspension prior to sowing. This inoculation method has been proved more effective as the biocontrol agent can rapidly and extensively cover the surface of the seeds (Lu *et al.* 2004). Early colonization by a biocontrol agent often is required to fill the critical niches and to effectively compete against pathogenic fungi (Mitchell 1992). Thus, seed coating with bacterial and fungal biocontrol agents often is utilized or required to control aggressive, rapidly growing soil-borne pathogens, such as *R. solani* (Mitchell 1992; Crawford *et al.* 1993; Nerey *et al.* 2010). Additionally, this procedure is much easier to implement and more applicable for large scale cultivation, compared to the classic one that includes enrichment of the soil with the biocontrol agents, which is both time-consuming and difficult to apply in real farming conditions (Yuan and Crawford 1995; Whipps 2001). Moreover, the data from the nonsterile soil experiments enhanced the potential of the selected streptomycetes to be used as biocontrol agents in real farming conditions as it was shown that the coexistence of the examined micro-organisms, especially *Streptomyces pseudovenezuelae* ACTA1383, with the native microflora of the soil, made the former more effective. The type of soil that reflects on its microflora composition has been referred as an important factor that affects the results of *in vivo* biocontrol procedures. Suppressive soils contain micro-organisms that are antagonistic to the pathogen or promote the growth of the target plant (Whipps 2001). The presence of these microbes, in combination with the high populations of the introduced biocontrol agents, can enhance the antimicrobial activity of the latter. Additionally, sterilization of soils by pasteurization, fumigation or autoclaving usually allows the pathogen to proliferate (Burgess *et al.* 1988), while in nonsterile soils, the native microflora slows up the growth of the pathogen giving the opportunity to the biocontrol agent to express its antimicrobial activity more effectively. This observation may lead to the conclusion that not only the germination of the seeds but also the growth of the plants could be enhanced *in situ* by planting bean seeds treated with *Streptomyces pseudovenezuelae* ACTA1383 in the crop. Some questions could be raised for the application of the selected *Streptomyces* isolates (*Streptomyces fulvisimus* ACTA1557 and *Streptomyces pseudovenezuelae* ACTA1383) as biocontrol agents against *Rhizoctonia solani* in real farming conditions, but the above results could be characterized as a promising first step against

the agricultural–commercial exploitation of the selected indigenous *Streptomyces* isolates, although the experiments were performed using only one type of soil and one plant type as fungal target.

Considering that the mechanism of the antifungal activity may vary among the production of antibiotic compounds, the promotion of plant growth, the induction of systemic resistance to plants and the mycoparasitism (Haas and Défago 2005), we examined, in parallel, the antifungal activity of both liquid culture concentrates and solid culture extracts, in an effort to evaluate the biochemical characteristics of the antifungal metabolites. The fact that antifungal activity was observed only in the solid culture extracts and not in the liquid culture supernatants may be attributed to the intrinsic differences between the two growth conditions that may very well result in different excretion phenotypes. For instance, in liquid cultures, the possible antifungal metabolites may be more susceptible to enzymatic breakdown, a phenomenon that is much less intense in solid media where the antifungal/microbial substances are continually diffusing into the agar (Buynitzky *et al.* 1979). The difference in oxygen availability, which is higher for micro-organisms growing in solid media, is another important factor that causes general changes in the metabolism that probably results in differences in the expression levels of the various metabolites by the streptomycete strains. In addition, the nutrient limitation in the microenvironment around a growing colony on solid agar media could induce the biosynthesis of secondary metabolites (Buynitzky *et al.* 1979; Doelle *et al.* 1992; Lahlali and Hijri 2010). Finally, the observation that the antifungal activity was present only in the solid media extracts and not in the concentrates of the streptomycete liquid cultures could also indicate a specific induction pattern that was caused by the simultaneous presence of a growing fungal mycelium on the agar plates.

The fact that the antifungal activity was detected at the low molecular weight fraction of the streptomycete solid medium extracts suggested that the active compound(s) was probably not a protein (hydrolytic enzyme) but rather a smaller organic compound, such as a secondary metabolite. Further biochemical analysis, using high-performance liquid chromatography fractionation coupled with mass spectrometry and nuclear magnetic resonance techniques, will allow us to refine its structure.

Acknowledgements

The study was supported by the National and Kapodistrian University of Athens' Special Account for Research Grants –'Kapodistrias' Code No 70/4/4242.

References

- Abd-Allah, E. (2001) *Streptomyces plicatus* as a model biocontrol agent. *Folia Microbiol (Praha)* **46**, 309–314.
- Abd-El Salam, K.A., Omar, M.R. and Aly, A.A. (2010) First report of *Rhizoctonia solani* AG-7 on cotton in Egypt. *J Phytopathol* **158**, 307–309.
- Altschul, S., Madden, T., Schäffer, A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. and Lipman, D. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acid Res* **25**, 3389–3402.
- Atlas, R.M. (1993) *Handbook of Microbiological Media*. ed. Parks, L.C. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Bakker, M.G., Glover, J.D., Mai, J.G. and Kinkel, L.L. (2010) Plant community effects on the diversity and pathogen suppressive activity of soil streptomycetes. *Appl Soil Ecol* **46**, 35–42.
- Balali, G.R. and Kowsari, M. (2004) Pectic zymogram variation and pathogenicity of *Rhizoctonia solani* AG-4 to bean (*Phaseolus vulgaris*) isolates in Isfahan, Iran. *Mycopathologia* **158**, 377–384.
- Baur, S., Niehaus, J., Karagouni, A.D., Katsifas, E.A., Chalkou, K., Meintanis, C., Jones, A.L., Goodfellow, M. *et al.* (2006) Fluostatins C-E, novel members of the fluostatin family produced by *Streptomyces* strain Acta 1383. *J Antibiot (Tokyo)* **59**, 293–297.
- van den Boogert, P.H.J.F. and Luttikholt, A.J.G. (2004) Compatible biological and chemical control systems for *Rhizoctonia solani* in potato. *Eur J Plant Pathol* **110**, 111–118.
- Burgess, L.W., Liddell, C.M. and Summerell, B.A. (1988) *Laboratory Manual for Fusarium Research*, 2nd edn. Sydney, NSW: Univ 156 p.
- Buynitzky, S., Howe, H.B. and Shellhorse, Y. (1979) Extraction and quantification of solutes of solidified agar culture media. *Appl Environ Microbiol* **37**, 202–207.
- Cao, L., Qiu, Z., You, J., Tan, H. and Zhou, S. (2004) Isolation and characterization of endophytic *Streptomyces* strains from surface-sterilized tomato (*Lycopersicon esculentum*) roots. *Lett Appl Microbiol* **39**, 425–430.
- Cao, L.X., Qiu, Z.Q., You, J.L., Tan, H.M. and Zhou, S.N. (2005) Isolation and characterization of endophytic streptomycete antagonists of *Fusarium* wilt pathogen from surface-sterilized banana roots. *FEMS Microbiol Lett* **247**, 147–152.
- Challis, G.L. and Hopwood, D.A. (2003) Synergy and contingency as driving forces for the evolution of multiple secondary metabolite production by *Streptomyces* species. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**, 14555–14561.
- Chamberlain, K. and Crawford, D. (1999) *In vitro* and *in vivo* antagonism of pathogenic turfgrass fungi by *Streptomyces hygroscopicus* strains YCED9 and WYE53. *J Ind Microbiol Biotechnol* **23**, 641–646.
- Coombs, J.T. and Franco, C.M.M. (2003) Isolation and identification of actinobacteria from surface-sterilized wheat roots. *Appl Environ Microbiol* **69**, 5603–5608.

- Crawford, D.L., Lynch, J.M., Whipps, J.M. and Ousley, M.A. (1993) Isolation and characterization of actinomycete antagonists of a fungal root pathogen. *Appl Environ Microbiol* **59**, 3899–3905.
- De Curtis, F., Lima, G., Vitullo, D. and DeCicco, V. (2010) Biocontrol of *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii* on tomato by delivering antagonistic bacteria through a drip irrigation system. *Crop Prot* **29**, 663–670.
- De Souza, R.F., Coelho, R.R.R., Macrae, A., Soares, R.M.A., Nery, D.C.M., Semedo, L.T.A.S., Alviano, C.S. and Gomes, R.C. (2008) *Streptomyces lunalinharesii* sp. nov., a chitinolytic streptomycete isolated from cerrado soil in Brazil. *Int J Syst Evol Microbiol* **58**, 2774–2778.
- Doelle, H.W., Mitchell, D.A. and Rolz, C.E. (1992) *Solid Substrate Cultivation*. New York: Elsevier Applied Science.
- Edwards, U., Rogall, T., Blöcker, H., Emde, M. and Böttger, E.C. (1989) Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. *Nucleic Acids Res* **17**, 7843–7853.
- El-Tarabily, K.A. (2008) Promotion of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) plant growth by rhizosphere competent 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase-producing streptomycete actinomycetes. *Plant Soil* **308**, 161–174.
- Farrag, A.A. (2011) Efficiency of different biocontrol agents on both susceptible and resistant bean plants and their protein pattern consequences. *J Am Sci* **7**, 7–14.
- Getha, K. and Vikineswary, S. (2002) Antagonistic effects of *Streptomyces violaceusniger* strain G10 on *Fusarium oxysporum* f.sp. cubense race 4: indirect evidence for the role of antibiosis in the antagonistic process. *J Ind Microbiol Biotechnol* **28**, 303–310.
- Godoy-Lutz, G., Kuninaga, S., Steadman, J.R. and Powers, K. (2008) Phylogenetic analysis of *Rhizoctonia solani* subgroups associated with web blight symptoms on common bean based on ITS-5.8S rDNA. *J Gen Plant Pathol* **74**, 32–40.
- Gomes, R.C., Semedo, L.T., Soares, R.M., Linhares, L.F., Alviano, C.S. and Coelho, R.R. (2000) Chitinolytic activity of actinomycetes from a cerrado soil and their potential in biocontrol. *Lett Appl Microbiol* **30**, 146–150.
- Haas, D. and Defago, G. (2005) Biological control of soil-borne pathogens by *Fluorescent pseudomonas*. *Nat Rev Microbiol* **3**, 307–319.
- Hernández-Suárez, M., Hernández-Castillo, F.D., Gallegos-Morales, G., Hugo, L., Lira-Saldivar, R., Rodríguez-Herrera, R. and Aguilar, C.N. (2011) Biocontrol of soil fungi in tomato with microencapsulates containing *Bacillus subtilis*. *Am J Agric Biol Sci* **6**, 189–195.
- Herron, P.R. and Wellington, E.M.H. (1990) New method for extraction of streptomycete spores from soil and application to the study of lysogeny in sterile amended and nonsterile soil. *Appl Environ Microbiol* **56**, 1406–1412.
- Hwang, B.K., Lim, S.W., Kim, B.S., Lee, J.Y. and Moon, S.S. (2001) Isolation and *in vivo* and *in vitro* antifungal activity of phenylacetic acid and sodium phenylacetate from *Streptomyces humidus*. *Appl Environ Microbiol* **67**, 3739–3745.
- Ichinose, M., Saito, M., Fujii, N., Ogawa, T., Hayashi, K., Kondo, N. and Nishiyasu, T. (2008) Modulation of the control of sympathetic nerve activity during incremental leg cycling. *J Physiol* **586**, 2753–2766.
- Igarashi, Y., Ogawa, M., Sato, Y., Saito, N., Yoshida, R., Kunoh, H., Onaka, H. and Furumai, T. (2000) Fistupyron, a novel inhibitor of the infection of Chinese cabbage by *Alternaria brassicicola*, from *Streptomyces* sp. TP-A0569. *J Antibiot (Tokyo)* **53**, 1117–1122.
- Katsifas, E.A., Giannoutsou, E.P. and Karagouni, A.D. (1999) Diversity of streptomycetes among specific Greek terrestrial ecosystems. *Lett Appl Microbiol* **29**, 48–51.
- Katsifas, E.A., Koraki, T.G. and Karagouni, A.D. (2000) Determination of metabolic activity of streptomycetes in soil microcosms. *J Appl Microbiol* **89**, 178–184.
- Kluth, C., Buhre, C. and Varrelmann, M. (2010) Susceptibility of intercrops to infection with *Rhizoctonia solani* AG 2–2 IIIB and influence on subsequently cultivated sugar beet. *Plant Pathol* **59**, 683–692.
- Kortemaa, H., Rita, H., Haahtela, K. and Smolander, A. (1994) Root-colonization ability of antagonistic *Streptomyces griseoviridis*. *Plant Soil* **163**, 77–83.
- Lahlali, R. and Hijri, M. (2010) Screening, identification and evaluation of potential biocontrol fungal endophytes against *Rhizoctonia solani* AG3 on potato plants. *FEMS Microbiol Lett* **311**, 152–159.
- Lane, D.J. (1991) *16S/23S rRNA Sequencing, in Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*. ed. Stackebrandt, E. and Goodfellow, M. pp. 115–147. New York: John Wiley & Sons Ltd.
- Lu, Z., Tombolini, R., Woo, S., Zeilinger, S., Lorito, M. and Jansson, J.K. (2004) *In vivo* Study of *Trichoderma*-Pathogen-Plant interactions, using constitutive and inducible Green Fluorescent Protein reporter systems. *Appl Environ Microbiol* **70**, 3073–3081.
- Mahadevan, B. and Crawford, D.L. (1997) Properties of the chitinase of the antifungal biocontrol agent *Streptomyces lidicus* WYEC108. *Enzyme Microbiol Technol* **20**, 293–489.
- Maldonado, M.C., Orosco, C.E., Gordillo, M.A. and Navarro, A.R. (2010) *In vivo* and *in vitro* antagonism of *Streptomyces* sp. RO3 against *Penicillium digitatum* and *Geotrichum candidum*. *Afr J Microbiol Res* **4**, 2451–2456.
- Marouli, E.I. and Tzavella-Klonari, K. (2002) Control of *Rhizoctonia solani* (Kühn) damping-off in tomato seedbeds using alternative methods to methyl bromide. *Acta Hort (ISHS)* **579**, 517–520. http://www.actahort.org/books/579/579_90.htm.
- Martin, B., Humbert, O., Camaram, M., Guenzi, E., Walker, J., Mitchell, T., Andrew, P., Prudhomme, M. et al. (1992)

- A highly conserved repeated DNA element located in the chromosome of *Streptococcus pneumoniae*. *Nucleic Acids Res* **20**, 3479–3483.
- Mitchell, D.A. (1992) Growth patterns, growth kinetics and the modeling of growth in solid-state cultivation. In *Solid Substrate Cultivation* eds. Doelle, H.W., Mitchell, D.A. and Rolz, C.E., pp 87–114. New York: Elsevier Applied Science.
- Montealegre, J., Valderrama, L., Sanchez, S., Herrera, R., Besoain, X. and Pérez, L.M. (2010) Biological control of *Rhizoctonia solani* in tomatoes with *Trichoderma harzianum* mutants. *Electron J Biotechnol* **13**, 1–11.
- Neeno-Eckwall, E., Kinkel, L. and Schottel, J. (2001) Competition and antibiosis in the biological control of potato scab. *Can J Microbiol* **47**, 332–340.
- Nerey, Y., Pannecoucq, J., Hernandez, H.P., Diaz, M., Espinosa, R., De Vos, S., Van Beneden, S., Herrera, L. et al. (2010) *Rhizoctonia* spp. causing root and hypocotyl rot in *Phaseolus vulgaris* in Cuba. *J Phytopathol* **158**, 236–243.
- Paululat, T., Katsifas, E., Karagouni, A. and Fiedler, H.P. (2008) Grecoketides A and B: new naphthoquinones from *Streptomyces* sp. Acta 1362. *Eur J Org Chem* **2008**, 5283–5288.
- Paululat, T., Kulik, A., Hausmann, H., Karagouni, A.D., Zinecker, H., Imhoff, J.F. and Fiedler, H.P. (2010) Grecocyclines: new angucyclines from *Streptomyces* sp. Acta 1362 *Eur J Org Chem* **12**, 2344–2350.
- Ramakrishnan, J., Shunmugasundaram, M. and Narayanan, M. (2009) *Streptomyces* sp. SCBT isolated from rhizosphere soil of medicinal plants is antagonistic to pathogenic bacteria. *Iran J Biotechnol* **7**, 75–81.
- Reddi, G.S. and Rao, A.S. (1971) Antagonism of soil actinomycetes to some soil-borne plant pathogenic fungi. *Indian Phytopathol* **24**, 649–657.
- Rothrock, C.S. and Gottlieb, D. (1984) Role of antibiosis in antagonism of *Streptomyces hygroscopicus* var. *geldanus* to *Rhizoctonia solani* in soil. *Can J Microbiol* **30**, 1440–1447.
- Sadeghi, A., Hesani, A., Askari, H., Qomi, D.N., Farsi, M. and Hervan, E.M. (2009) Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off of sugar beet with native *Streptomyces* strains under field conditions. *Biocontrol Sci Tech* **19**, 985–991.
- Schrey, S.D. and Tarkka, M.T. (2008) Friends and foes: streptomycetes as modulators of plant disease and symbiosis. *Antonie Van Leeuwenhoek* **94**, 11–19.
- Seeley, H.W., Vandemark, P.J. and Lee, J.J. (1990) *Microbes in Action. A Laboratory Manual of Microbiology*, 2nd edn, pp 413–415. New York: W.H. Freeman and Company.
- Sessitsch, A., Reiter, B., Pfeifer, U. and 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 Microbiol Ecol* **39**, 23–32.
- Shekhar, N., Bhattacharya, D., Kumar, D. and Gupta, R.K. (2006) Biocontrol of wood-rotting fungi with *Streptomyces violaceusniger* XL-2. *Can J Microbiol* **52**, 805–808.
- Taechowisan, T., Peberdy, J.F. and Lumyong, S. (2003) Chitinase production by endophytic *Streptomyces aureofaciens* CMUAc130 and its antagonism against phytopathogenic fungi. *Annu Microbiol* **53**, 447–461.
- Taechowisan, J.N., Chuaychot, S., Chanaphat, A., Wanbanjob, A. and Tantiwachwutikul, P. (2009) Antagonistic Effects of *Streptomyces* sp. SRM1 on *Colletotrichum musae*. *Biotechnology* **8**, 86–92.
- Tokala, R.K., Strap, J.L., Jung, C.M., Crawford, M.H.S., Deobald, L.A., Bailey, J.F. and Morra, M.J. (2002) Novel plant-microbe rhizosphere interaction involving *Streptomyces lydicus* WYEC108 and the pea plant (*Pisum sativum*). *Appl Environ Microbiol* **68**, 2161–2171.
- Versalovic, J., Koeuth, T. and Lupski, J.R. (1991) Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res* **19**, 6823–6831.
- Wellington, E.M.H., Cresswell, N. and Saunders, V.A. (1990) Growth and survival of streptomycete inoculants and extent of plant transfer in sterile and non sterile soil. *Appl Environ Microbiol* **56**, 1413–1419.
- Wharton, P.S., Kirk, W.W., Berry, D. and Tumbalam, P. (2007) Seed treatment application-Timing options for control of *Fusarium* decay and sprout rot of cut seed pieces. *Am J Potato Res* **84**, 237–244.
- Whipps, J.M. (2001) Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *J Exp Bot* **52**, 487–511.
- Yuan, W. and Crawford, D. (1995) Characterization of *Streptomyces lydicus* WYEC108 as a potential biocontrol agent against fungal root and seed rots. *Appl Environ Microbiol* **61**, 3119–3128.

Research Article

Streptomyces rochei* ACTA1551, an Indigenous Greek Isolate Studied as a Potential Biocontrol Agent against *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici

**Grammatiki S. Kanini, Efstathios A. Katsifas,
Alexandros L. Savvides, and Amalia D. Karagouni**

National and Kapodistrian University of Athens, Faculty of Biology, Department of Botany, Microbiology Group,
Panepistimioupolis, Zografou, 15781 Athens, Greece

Correspondence should be addressed to Amalia D. Karagouni; akar@biol.uoa.gr

Received 15 March 2013; Accepted 24 April 2013

Academic Editor: George Tsiamis

Copyright © 2013 Grammatiki S. Kanini et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Many studies have shown that several Greek ecosystems inhabit very interesting bacteria with biotechnological properties. Therefore *Streptomyces* isolates from diverse Greek habitats were selected for their antifungal activity against the common phytopathogenic fungus *Fusarium oxysporum*. The isolate encoded ACTA1551, member of *Streptomyces* genus, could strongly suppress the fungal growth when examined in antagonistic bioassays *in vitro*. The isolate was found phylogenetically relative to *Streptomyces rochei* after analyzing its 16S rDNA sequence. The influence of different environmental conditions, such as medium composition, temperature, and pH on the expression of the antifungal activity was thoroughly examined. *Streptomyces rochei* ACTA1551 was able to protect tomato seeds from *F. oxysporum* infection *in vivo* while it was shown to promote the growth of tomato plants when the pathogen was absent. In an initial effort towards the elucidation of the biochemical and physiological nature of ACTA1551 antifungal activity, extracts from solid streptomycete cultures under antagonistic or/and not antagonistic conditions were concentrated and fractionated. The metabolites involved in the antagonistic action of the isolate showed to be more than one and produced independently of the presence of the pathogen. The above observations could support the application of *Streptomyces rochei* ACTA1551 as biocontrol agent against *F. oxysporum*.

1. Introduction

Fusarium wilt diseases, including symptoms like wilting, chlorosis, necrosis, premature leaf drop, browning of the vascular system, stunting, and damping-off, were caused by pathogenic forma speciales of *Fusarium oxysporum*. These symptoms are the results of fungal spores and mycelium that block the xylem, toxin production and host defense responses such as tyloses, gums, and gels [1]. *Fusarium* wilting leads to severe losses in tomato and a variety of other crop plants [2].

Fusarium oxysporum f.sp. *lycopersici*, a soilborne plant pathogen in the class Hyphomycetes, causes *Fusarium* wilt specifically in tomato. This disease was first described by Masee in England in 1985 [3]. It is of worldwide economic importance as at least 32 countries, including Australia, Belgium, Canada, France, Germany, Greece, Israel, Italy, Japan,

Mexico, Spain, Sweden, The Netherlands, UK, and USA, had reported the disease [4, 5] and results in severe losses in the greenhouses, open field crops, and hydroponic cultures.

Like all formae speciales of *F. oxysporum*, this fungus is a soil inhabitant and extremely difficult to control [6, 7]. However, several control methods have been used so far. Chemical treatments using benomyl, carbendazim, prochloraz, fludioxonil, bromuconazole, or azoxystrobin [8] not only result in fungicide resistant pathogens [9] but also cannot be characterized from a wide range of action while they are involved directly in the atmospheric pollution, undesirable effects on nontarget organisms, and possible carcinogenicity [10–14]. Additionally, soil amendments have been used in order to reduce the severity of the pathogen in crops by increasing the soil pH using fertilizers containing nitrate nitrogen [15] or by crop rotation [16, 17], but they have

rarely provided long-term control in any production area. Currently, resistant cultivars have been used for the control of the disease [18, 19], but research was hampered by the lack of knowledge of the fungus genetic variability.

Thus, the above difficulties in controlling *Fusarium* wilt diseases have stimulated renewed interest in biological control as a disease management alternative [6]. For this purpose, root colonizing plant beneficial microorganisms have been used including species of *Pseudomonas* (*Pseudomonas fluorescens*, *P. putida*, *P. aureofaciens*) [20–24], *Bacillus* (*Bacillus subtilis*, *B. Polymyxa*, and *B. cereus*) [25–27], non-pathogenic *Fusarium* [28, 29], and Actinobacteria [30–33]. These microbes possess many traits that make them well suited as biocontrol and growth-promoting agents. These include the ability to (i) grow rapidly *in vitro* and to be mass produced; (ii) rapidly utilize seed and root exudates; (iii) colonize and multiply in the rhizosphere and spermosphere environments and in the interior of the plant; (iv) produce a wide spectrum of bioactive metabolites (i.e., antibiotics, siderophores, volatiles, and growth-promoting substances); (v) compete aggressively with other microorganisms and (vi) adapt to environmental stresses. The major weakness of pseudomonads as biocontrol agents is their inability to produce resting spores, which complicates formulation of the bacteria for commercial use [20]. *Bacillus* strains even if they are well equipped genetically to produce a vast array of antibiotics, only a limited part of this antibiotic-devoted genetic background may be readily expressed in soil and thus, only a part of this arsenal may be actually produced under natural conditions [34]. The nonpathogenic *Fusarium* strains need to be applied in large concentrations as the basic mode of action of these biocontrol agents is the competition of nutrients that leads to fungistasis (inhibition of chlamydospores germination).

The species of the genus *Streptomyces* belong to the phylum of Actinobacteria characterized by a wide range of modes of action like antibiotic production, lysis of fungal cell walls; competition and hyperparasitism have been proved to be effective biocontrol agents either alone or in combination with other biocontrol agents. Several *Streptomyces* species such as *S. lydicus*, *S. lividans*, *S. olivaceoviridis*, *S. scabies*, *S. plicatus*, *S. hydroscopicus*, *S. violaceusniger*, *S. humidus*, *S. avermitilis*, *S. aureofaciens*, and *S. roseoflavus* are well-known producers of important compounds that are active against a wide variety of fungal pathogens [35]. These include a wide range of antibiotics as well as a variety of enzymes (i.e., chitinases), which degrade the fungal cell wall [35–40]. Metabolites from streptomycetes have been used in agriculture as growth promoters [41–44] and selected strains of the genus also have been used as direct biocontrol agents for other plant diseases [30, 45–48].

In this study, a total of 528 *Streptomyces* isolates from the Athens University Microbiology Laboratory Culture Collection were examined for their antifungal activity against *Fusarium oxysporum*. The measurement of their antifungal strength *in vitro* resulted in the selection of *Streptomyces rochei* ACTA1551 as the isolate that expressed the higher antagonistic activity. *Streptomyces rochei* ACTA1551 was used for further studies evaluating the potential of its use as biocontrol agent. We employed determination of the range

and the optimal conditions of its antagonistic behavior, examination of culture extracts for antifungal activity, and studies to control the *Fusarium oxysporum in vivo*, using the plant *Lycopersicon esculentum* (Family: Solanaceae, Common name: Tomato) as a model target aiming to complete the profile of *Streptomyces rochei* ACTA1551 as biocontrol agent.

2. Materials and Methods

2.1. Microbial Strains. *Streptomyces* strains isolated from the rhizosphere of indigenous plants (Table 1(A)) and nonrhizosphere samples of special Greek habitats (Table 1(B)) were examined for their antifungal activity against *Fusarium oxysporum*. The streptomycetes were maintained as spore suspensions in 30% (w/v) glycerol at -20°C [49].

Fusarium oxysporum DSM62059 (*Fusarium oxysporum* Schlechtendahl: Fries f.sp. *lycopersici*, a laboratory strain provided by the DSMZ culture collection) was used as fungal target. The pathogenic fungal strain was grown on Potato Dextrose Agar (PDA) or in Potato Dextrose Broth (PDB) at 25°C and was maintained on PDA at 4°C .

2.2. Biocontrol Assay In Vitro. Streptomycete aliquots ($30\ \mu\text{L}$) from a spore suspension in 30% (w/v) glycerol were used as inoculum for all *in vitro* antagonism bioassays. For the same test we used two full-loops of *F. oxysporum* mycelium from a 5-day-old culture on PDA.

The ability of the *Streptomyces* isolates to inhibit the fungal growth was determined using an agar plate antagonism bioassay [33]. *F. oxysporum* inoculums was placed on either side of a two-days-old colony of each streptomycete. After incubation at 28°C for 5 days the inhibition zone was formed and its presence characterized the *Streptomyces* isolate as positive.

For the quantification of the antifungal activity the average (triplicate plates per strain \times three independent experimental sets) of the quotient of the area of the inhibition zone, which was formed around and over the area of the streptomycete colony itself, was calculated (Antifungal activity = $\pi R_z^2 / \pi R_{\text{str}}^2$ (R_z = radius of inhibition zone and R_{str} = radius of streptomycete colony)) [33].

2.3. Taxonomy of Streptomycetes. The selected isolate was further characterized through the amplification of its 16S rRNA gene. The 16S rDNA fragment was amplified by PCR using two universal primers [50, 51]: pA ($5'$ -AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG- $3'$) and R1492 ($5'$ -TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T- $3'$). Amplification reactions were performed in volumes of $50\ \mu\text{L}$ containing 40 ng template DNA, $0.4\ \mu\text{M}$ of each primer, 1X buffer with Mg^{2+} , 1 unit of Taq DNA Polymerase (Biotoools England) and 0.2 mM dNTPs. Nucleases free water was used to bring the reaction volume to $50\ \mu\text{L}$. After initial denaturation at 95°C for 2 min, samples were cycled for 30 PCR cycles using the following cycle profile: 95°C denaturation for 30 sec, primer annealing at 53°C for 30 sec, and primer extension at 72°C for 2 min, plus a final 2 min elongation step at 72°C . Amplified PCR products were separated by

TABLE 1: *Streptomyces* strains with antifungal activity originated from twelve studied Greek habitats.

| Sampling area | Number of isolates tested | Number (percentage) of isolates with antifungal activity against <i>F. oxysporum</i> DSM62059 [highest; lowest; average] ¹ |
|--|---------------------------|---|
| (A) Rhizosphere samples | | |
| (1) Rhizosphere of <i>Ebenus sibirhorpii</i> | 28 | 3 (10.7%) {2.36; 1.3; 1.5} |
| (2) Rhizosphere of <i>Ceratonia siliqua</i> | 42 | 1 (2.4%) {1.96; 1.96; 1.96} |
| (3) Rhizosphere of <i>Olea europea</i> | 73 | 6 (8.2%) {2.57; 2.13; 1.34} |
| (4) Rhizosphere of <i>Pinus brutia</i> from Crete | 20 | 3 (15.0%) {4.84; 3.26; 1.56} |
| (5) Rhizosphere of evergreen woody shrubs from an island of the Aegean Sea | 21 | 5 (23.8%) {2.69; 1.87; 1.47} |
| (6) Rhizosphere of evergreen woody shrubs from an island of the Ionian Sea | 28 | 0 (0.0%) |
| (7) Rhizosphere of coniferous trees (Arcadian forest) | 84 | 6 (7.1%) {2.91; 2.05; 1.56} |
| Rhizosphere subtotals | 296 | 21 (7.0%) |
| (B) Nonrhizosphere samples | | |
| (8) Hot spring water of Thermopiles thermal springs (Viotia district) | 22 | 2 (9.1%) {1.63; 1.46; 1.28} |
| (9) Sediment from a volcanic area (Santorini island—Aegean sea) | 5 | 1 (20%) {1.3; 1.3; 1.3} |
| (10) Soil derived from cultivated area (Marathon, Attica district) | 179 | 10 (5.6%) {2.25; 1.6; 1.25} |
| (11) Soil from protected natural forest area (Kessariani, Attica District) | 26 | 2 (7.7%) {1.39; 1.37; 1.34} |
| Nonrhizosphere subtotals | 232 | 15 (6.0%) |
| Total | 528 | 39 (7.0%) |

¹Antagonistic activity levels as expressed by the quotient of the inhibition zone area over streptomycete colony area (See Section 2.2).

gel electrophoresis on 1.2% (w/v) agarose gel and then purified using Nucleospin Extract PCR kit (Macherey-Nagel, Germany). The 16S rDNA fragment (>1400 bp) was fully sequenced (Macrogen, Republic of Korea) and the results were used for strain identification. For the detection of closest relatives, all sequences were compared with the BLAST function (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Sequence data were compiled using the MEGA 5.10 software [52] and aligned with sequences obtained from the GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) databases using the ClustalW aligning utility. Phylogenetic analysis was performed using neighbour joining method implemented in MEGA 5.10. One thousand bootstrap analyses (distance) were conducted.

2.4. Influence of Culture Conditions on Antagonistic Activity.

The agar plate antagonism bioassay was repeated for the selected *Streptomyces* isolate using five different solid media; PDA (Potato Dextrose Agar, DSMZ media no. 129), AGS (Arginine Glycerol Salts, [49]), NA (Nutrient Agar, Biokar Diagnostics, Beauvais, France), CzA (Czapek Agar, [53]) and SAA (Streptomyces Antibiotic Agar, [53]), and four different pH values (pH 6, pH 7, pH 8, and pH 9). All media—pH combination plates were incubated at 26°C, 28°C, and 30°C for 2 days prior to fungal inoculation and five days after that.

2.5. Biocontrol Assay In Vivo. For *in vivo* antagonism tests, a suspension of streptomycetes spores in Ringer 1/4 salt solution (NaCl 2.15 g/L, KCl 0.15 g/L, CaCl₂ 0.075 g/L, K₂HPO₄ 0.5 g/L according to Wellington et al., 1990 [54]) (10⁹ spores per mL) was prepared from a 5-day-old culture on Arginine Glycerol Salts Agar (AGS), as described by Herron

and Wellington (1990) [49] and used for the tomato seed treatments. *F. oxysporum* was cultured in Nutrient Broth (NB, Biokar Diagnostics, Beauvais, France) for 5 days at 28°C and 180 rpm. The mycelium was aseptically collected on filter paper and washed with three culture volumes of deionized-sterile water. Three grams of wet mycelium (dry weight 15 to 18% w/w) were resuspended in 1000 mL deionized sterile water and were thoroughly mixed with 1 kg of sterile soil [55].

Streptomyces isolate encoded ACTA1551 was selected for *in vivo* experiments due to the strong suppression it caused to *F. oxysporum* growth *in vitro*. A sandy silt loam soil (ASTM classification) with a pH of 7.9, taken from an area under intense agricultural exploitation in the Marathon area (42 km NE from the centre of Athens), was used. Prior to its use, the soil was air-dried in the dark at 22°C for at least 3 months, passed through a 2 mm sieve, and autoclaved twice (121°C, 60 min) on two separate days.

Tomato seeds were sterilised for 30 minutes in a 20% chlorine suspension and then dried under sterile conditions. A number of sterile seeds were immersed into a suspension of streptomycetes spores in Ringer 1/4 salt solution [54] (10⁹ spores per mL) for 30 minutes and then dried under sterile conditions. Untreated sterile tomato seeds and sterile tomato seeds treated with the selected streptomycetes were planted in pots containing sterile soil either amended with *F. oxysporum* (3 g of wet washed mycelium per kg of soil) or not [55]. For every treatment, 20 seeds were planted in each pot (three replicates for each pot were prepared). Each full experiment was conducted in four different occasions, over a time period of eight months. The pots were incubated at 28°C under fluorescent light, and moisture was controlled daily

at the level of 40% (w/w) for 25 days. The number of seeds that survived and/or germinated was evaluated in order to estimate the ability of the examined streptomycete to control the fungi *in vivo*. In addition, the height and weight of the emerged plants were measured for the estimation of the *in vivo* antagonism strength.

2.6. Extraction and Fractionation of Streptomycete Metabolites from Solid Cultures. In parallel, the selected *Streptomyces* isolate was grown on SAA (*Streptomyces* Antibiotic Agar, [53]) since it was selected as optimum medium for high antifungal activity expression. The cultures were incubated at 28°C for 7 days. The medium around the formed streptomycete colony in a radius of 2 cm was cut off and blended for three minutes. The slurry was centrifuged at 4.000 g for 60 min and the cell free supernatant was collected. For the determination of antifungal activity, 400 µL from the concentrated culture supernatant were placed into wells on SAA plates (formed using a cork borer—diameter 1 cm, depth 1 cm) that were inoculated with the fungus.

Additionally, the inhibition zones of cocultures of the selected streptomycete ACTA1551 and *F. oxysporum* on SAA plates were removed and blended for three minutes. The slurry was collected by centrifugation as described above. After filtration, 400 µL were placed in a similar manner into wells on SAA agar plates inoculated with the fungus for the determination of the antifungal activity.

All extracts from the solid cultures were fractionated into a high molecular weight (protein) and a low molecular weight (nonprotein) component on a Pharmacia PD-10 gel filtration column using de-ionized water for elution, according to the manufacturer's recommendation. Each fraction was concentrated by lyophilisation and examined for antifungal activity.

All the experiments performed were in three independent sets using triplicate plates.

2.7. Antimicrobial Activity of the Bioactive Extractions against Common Microbial Indicators. 400 µL from the agar extracts of the five streptomycetes were placed into wells (diameter 1 cm) of agar plates (triplicate plates, three individual experimental tests) inoculated with *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas fluorescens*, and *Saccharomyces cerevisiae*. The inhibition zones were observed and measured.

2.8. Data Analysis. Statistical analysis for the various data sets was conducted through paired/unpaired *t*-tests, using SifmaStat/Plot software program (ver. 12.0; Systat Software Inc., Chicago, IL, USA). In all runs, a significance level of <0.05 was used.

3. Results and Discussion

3.1. Biocontrol Assay In Vitro. A total of 528 streptomycetes were isolated using selective media, assigned to the genus *Streptomyces* on the basis of their phenotypic characteristics. Isolates with inhibitory characteristics were selected and screened by the agar plate assay. The total percentage of

antagonistic isolates was 7% (39 isolates out of the 528 tested could suppress the growth of *F. oxysporum*) (Table 1).

The sampling area that gave the higher percentage of isolates that could suppress the growth of *F. oxysporum* was the rhizosphere of evergreen woody shrubs from an island of the Aegean Sea but the strongest antifungal activity was observed by streptomycetes derived from the rhizosphere of *Pinus brutia* (Crete). The streptomycetes that were isolated from the rhizosphere of evergreen woody shrubs from an island of the Ionian Sea lacked any antifungal activity, whilst very low numbers of potential biocontrol agents rose from the rhizosphere of *Ceratonia siliqua* or the soil derived from cultivated area (Marathon, Attica District).

Although the percentage of the antagonistic isolates screened was low, these results in comparison with previous observations [33, 56–58] support the hypothesis that the Greek *Streptomyces* isolates are multiactive and promising for their application in several biotechnological processes, including biocontrol of soil borne fungal pathogens.

Focusing on the ecophysiological characteristics of the sampling areas that gave the most active isolates, we can conclude the following correlation: the Aegean Sea climate provides environmental stress on the indigenous *Streptomyces* populations as long as periods of high temperatures and drought are reflected in a soil poor in nutrients. Thus, the mentioned soil microorganisms with antagonistic properties seemed to be dominant. Furthermore the participation of the anthropogenic impact on the Aegean Sea islands, could probably explain the high percentages of isolates collected from the rhizosphere soil of the plant *Pinus brutia* (indigenous plant of Crete) and of the evergreen shrubs that were antagonistic to *F. oxysporum in vitro*. On the contrary, the very different climatic conditions of the soil of the rhizosphere of evergreen shrubs in the Ionian Sea islands (areas of high humidity and low anthropogenic impact) resulted in isolates which were not able to suppress the growth of the pathogenic target.

The analysis of the above data resulted in the selection of the isolate encoded ACTA1551, derived from the rhizosphere soil of the plant *Pinus brutia* (indigenous plant of Crete) and expressed the highest antifungal activity (4.84 ± 0.05) of all the 39 isolates that were antagonistic against *F. oxysporum*. Analysis of 16S rRNA gene sequence data grouped the selected isolate to the species of *Streptomyces rochei* (99% identity with the 16S rDNA sequence of the closest phylogenetic relative, GenBank accession Number JN167525). The position of the selected streptomycete among the phylum of Actinobacteria is shown in Figure 1.

3.2. The effect of Nutrients, Temperature, and pH on Antagonistic Activity. Incubation of the selected streptomycete on SAA, containing glucose as carbon source and peptone from soya as nitrogen source, at 28°C and pH 8, was determined as the optimum culture conditions for maximum antagonistic activity against *F. oxysporum* (Figure 2). The temperature of 28°C is very close to the average of Mediterranean climatic temperature, while pH 8 is the value that characterizes the Greek cultivar soil. Therefore, one might suggest that the antifungal activity of the selected streptomycete ACTA1551

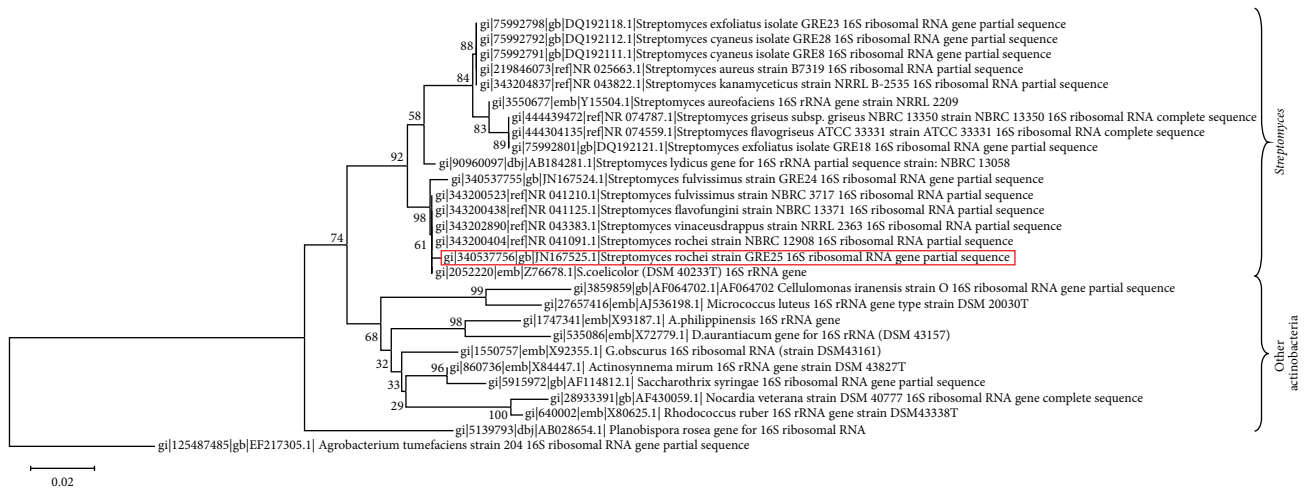


FIGURE 1: Phylogenetic tree of the 16S rDNA based on the neighbour-joining method, showing the position of the *Streptomyces rochei* ACTA1551. One thousand bootstrap analyses (distance) were conducted. The tree was rooted with *Agrobacterium tumefaciens*. Scale bar represents 2% estimated distance.

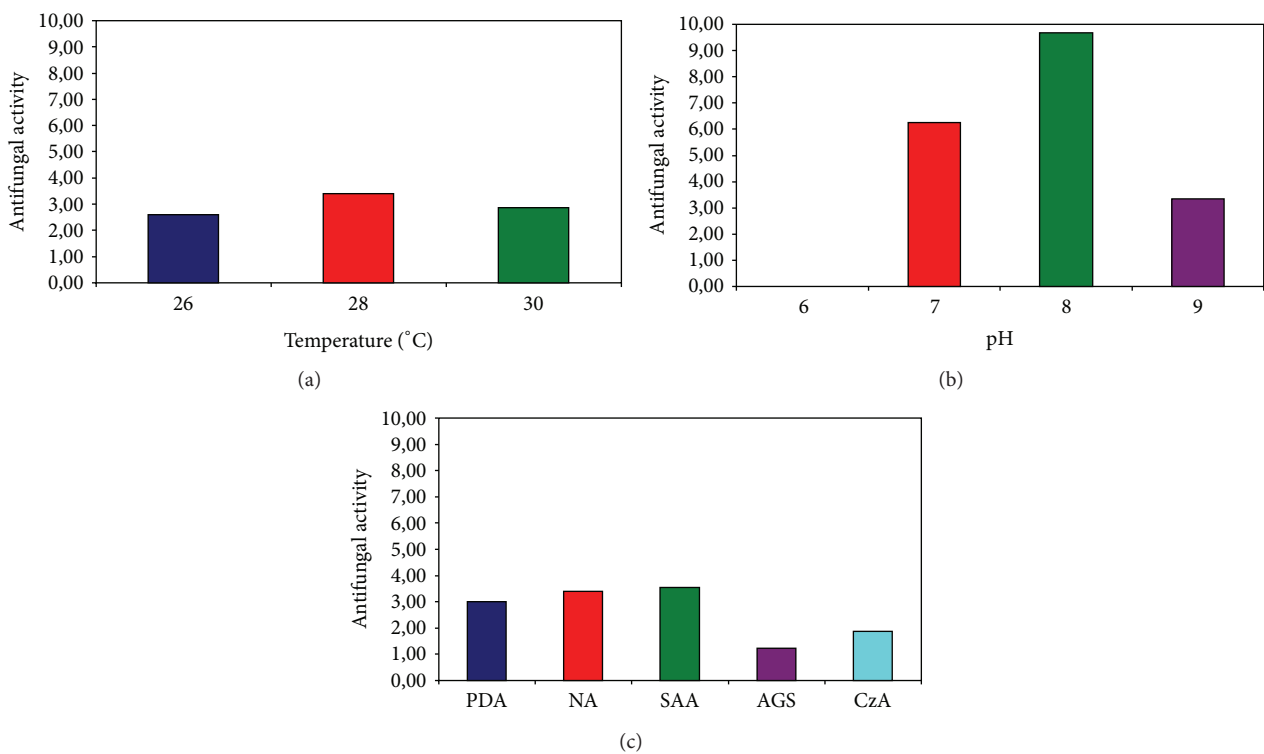


FIGURE 2: Influence of temperature, pH value, and media on the strength of antifungal activity expressed from ACTA1551 (*Streptomyces rochei*) on *Fusarium oxysporum*; (a) temperature effect, (b) pH effect, (c) carbon and nitrogen source effect.

could be enhanced under the above conditions which are similar to real farming processes.

3.3. *Biocontrol Assay In Vivo*. Using the results from the *in vitro* antagonistic assay we were led to the selection of ACTA1551 (*Streptomyces rochei*) so as to use it for *in vivo* studies. This selection was based on its very high antifungal

activity expressed *in vitro* (Table 2) and the observation from previous work [33, 56–60] that it is multiproducer of bioactive substances. Thus, it was characterized as promising biocontrol agent *in vivo*.

Analysis of particle size of the soil that was used for this purpose indicated the presence (% dry weight) of sand, 50; silt, 36; clay, 14. Mineralogy analysis showed the presence of (% dry weight) illite, 65; chlorite, 7; kaolinite, 10; smectite,

TABLE 2: Germination data of tomato seeds during *in vivo* antagonism bioassays. The total number of planted tomato seeds was (20 per pot) × (three replicates for each pot) × (four independent experiments) = 240. All experimental data were combined for the analysis.

| | Soil infected with <i>Fusarium oxysporum</i> | | | Soil not infected with <i>Fusarium oxysporum</i> | | |
|-----------------------------|--|-----------------------------------|-------------------------------------|--|-----------------------------------|-------------------------------------|
| | Number of planted tomato seeds | Number of germinated tomato seeds | Germination percentage ¹ | Number of planted tomato seeds | Number of germinated tomato seeds | Germination percentage ¹ |
| Seeds treated with ACTA1551 | 240 | 181 ± 2 | 75% | 240 | 218 ± 2.2 | 90% |
| Untreated tomato seeds | 240 | 108 ± 1 | 45% | 240 | 228 ± 1.9 | 95% |

¹Unpaired *t*-test on the number of germinated seeds: seeds treated with ACTA1551 in infected soil versus untreated tomato seeds in infected soil were significantly different ($P < 0.001$); seeds treated with ACTA1551 in noninfected soil versus untreated tomato seeds in noninfected soil were significantly different ($P < 0.001$).

TABLE 3: Mean height and weight data of tomato plants derived from emerged tomato seeds during *in vivo* antagonism bioassays. The total number of planted tomato seeds was (24 per pot) × (three replicates for each pot) × (four independent experiments) = 288. All experimental data were combined for the analysis.

| | Soil infected with <i>Fusarium oxysporum</i> | | Soil not infected with <i>Fusarium oxysporum</i> | |
|-----------------------------|--|------------------------------|--|------------------------------|
| | Mean height (cm) ¹ | Mean weight (g) ² | Mean height (cm) ¹ | Mean weight (g) ² |
| Seeds treated with ACTA1551 | 13.42 ± 0.1 | 0.58 ± 0.01 | 19 ± 0.2 | 0.79 ± 0.01 |
| Untreated tomato seeds | 11.16 ± 0.1 | 0.35 ± 0.01 | 15.01 ± 0.1 | 0.51 ± 0.01 |

¹Unpaired *t*-test on *plant heights*: seeds treated with ACTA1551 in infected soil versus untreated tomato seeds in infected soil were significantly different ($P < 0.001$); seeds treated with ACTA1551 in noninfected soil versus untreated tomato seeds in noninfected soil were significantly different ($P < 0.001$).

²Unpaired *t*-test on *plant weights*: seeds treated with ACTA1551 in infected soil versus untreated tomato seeds in infected soil significantly different ($P < 0.001$); seeds treated with ACTA1551 in noninfected soil versus untreated tomato seeds in noninfected soil were significantly different ($P < 0.001$).

12; talc, 6 and calcite <1. Phosphorus content was 124 mg/L dry soil and organic carbon was 1.23% (dry weight).

The first evidence of the effective usage of ACTA1551 as biocontrol agent *in vivo* came from macroscopic observations. The *F. oxysporum* infected soil, where untreated tomato seeds were planted, was fully cover by the white mycelium of the fungi, while only limited white spots of fungal mycelium were observed onto infected soil where ACTA1551 treated tomato seeds were planted.

Considering the emergence of the tomato plants, the *in vivo* experiments showed that the tomato seeds treated with ACTA1551 germinated in statistically significant ($P < 0.001$) higher rates into *F. oxysporum* infected soil compared to untreated seeds. Even if the germination of ACTA1551 treated tomato seeds was lower than the positive control treatment (untreated tomato seeds planted into noninfected soil), in a statistically significant level ($P < 0.001$), it is clearly higher compared to the results when ACTA1551 was absent. These results provide evidence for an effective antifungal behavior of the selected streptomycete *in vivo*. However, the presence of ACTA1551 on the tomato seeds couldnot enhance the germination rate when planted in noninfected soil (Table 2).

The analysis of the estimated values of mean weight and height of the emerged tomato plants showed that although the number of untreated plants that emerged in infected soil was low, the plants themselves were statistically significantly higher and stronger than the plants emerged from untreated seed in infected soil ($P < 0.001$). The treatment of the seeds with ACTA1551 enhanced the weight and the height of the plants compared to the negative control (untreated tomato seeds planted into infected soil). These results showed

the ability of ACTA1551 to protect tomato seed from the pathogenic effects of *F. oxysporum* (Table 3, Figure 3).

Moreover, the *in vivo* results for noninfected soil showed that the presence of ACTA1551 produced plants of statistically significantly higher mean values of weight and height ($P \leq 0.001$) compared to the positive controls (untreated tomato seeds planted into noninfected soil). The presence of ACTA1551 on the seeds promoted the growth of the emerged plants as the height of the treated plants in noninfected soil was greater than the height of untreated plants in noninfected soil and the treated plants were heavier than the untreated, in both cases, in a statistically significant level ($P \leq 0.001$) (Table 3, Figure 3).

The above results provided strong evidence that ACTA1551 could protect tomato plants from wilt symptoms caused from *F. oxysporum* under the studied conditions and are in agreement with those from previews studies on the potential of *Streptomyces* isolates to be used as biocontrol agents. For instance, Reddi and Rao [61] reported that isolates of *Streptomyces ambofaciens* were able to control *Pythium* damping-off in tomato plants and *Fusarium* wilt in cotton plants, in an artificially infested soil while Mahadevan and Crawford [62] found that *Streptomyces lydicus* was identified as a broad spectrum biocontrol agent and the work of Farrag [63] enhanced that finding.

Sterilization of soils by pasteurisation, fumigation, or autoclaving usually allows the pathogen to proliferate giving the opportunity to the biocontrol agent to express its antagonistic activity under optimal conditions for the target's growth. Thus, the results from these experiments clearly suggested the antagonistic relationship between the pathogen

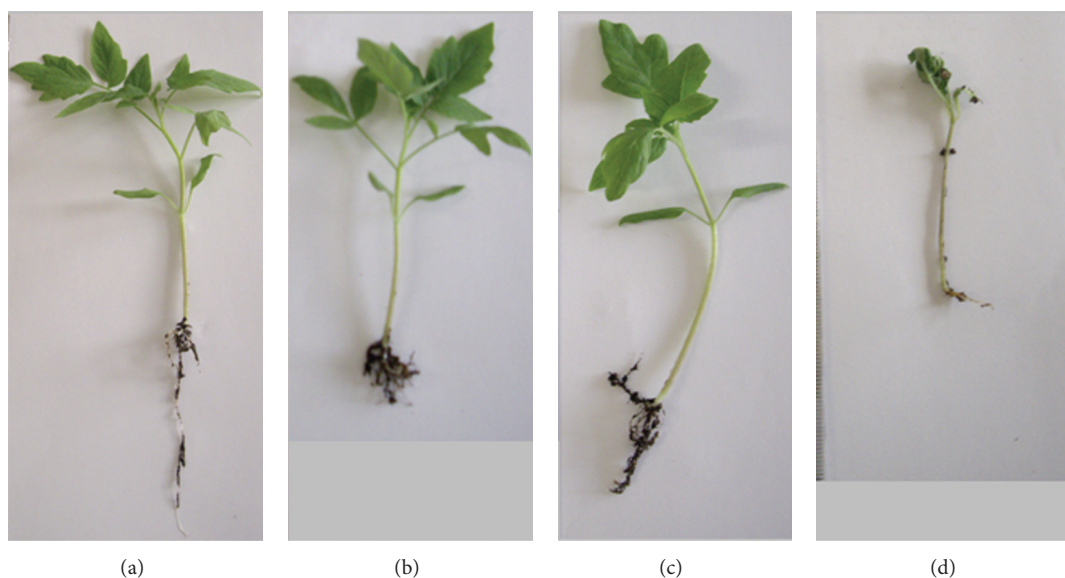


FIGURE 3: *In vivo* antifungal ability of ACTA1551 (*Streptomyces rochei*). Growth of the tomato plants (from left to right). (a) Untreated seed planted in untreated sterile soil (positive control), (b) seed treated with ACTA1551 (*Streptomyces rochei*) and planted in *F. oxysporum* infected soil, (c) seed treated with ACTA1551 (*Streptomyces rochei*) and planted in *F. oxysporum* noninfected soil, (d) untreated seed planted in *R. solani* DSM843 infected soil (negative control).

and the biocontrol agent. Other observations have noted that in nonsterile soils the native microflora slowed up the growth of the pathogen giving the opportunity to the biocontrol agent to express its antimicrobial activity more effectively [64]. Of additional importance, is that through our experimental approach, the streptomycete can protect the plant just by simple coating of the seeds with spore suspension prior to sowing. This inoculation method has been proved more effective as the biocontrol agent can rapidly and extensively cover the surface of the seeds [33, 55]. Early colonization by a biocontrol agent often is required to fill the critical niches and to effectively compete against pathogenic fungi [65]. Thus, seed coating with bacterial and fungal biocontrol agents often is utilized or required to control aggressive, rapidly growing soil-borne pathogens [65, 66]. Additionally, this procedure is much easier to implement and more applicable for large scale cultivation, compared to the classic one which includes enrichment of the soil with the biocontrol agents which is both time consuming and difficult to apply in real farming conditions [48, 67]. However, experiments of a larger scale under greenhouse conditions or in the field should support this potential in a more applicable way. The undeniable fact is that ACTA1551 strain meets the conditions of a promising biocontrol agent.

Additionally, the same results give some information about the mechanism of action of the selected streptomycete in soil. As it was shown, ACTA1551 could promote the growth of the tomato plants in statistically significant levels, when it was the only microorganism in the soil, leading the tomato plants to overcome the growth levels they reached with no pathogen in their environment. Therefore, the possibility of acting as a growth promoter could raise further examination.

3.4. Extraction and Fractionation of Streptomyces Metabolites from Solid Cultures. The concentrated extracts from the agar inhibition zones of the selected *Streptomyces* strain ACTA1551 (*Streptomyces rochei*) could strongly suppress the growth of *F. oxysporum* (Figure 4(a)). Additionally, the same antifungal activity was observed from the extracts of the solid culture of ACTA1551 without the presence of *F. oxysporum*. This observation may suggest that the streptomycete does not require the target fungus in its area to induce the production of the antifungal substances. The antifungal activity is fungus independent and the antifungal components may belong to the main metabolism of *Streptomyces rochei* ACTA1551.

Following fractionation of the bioactive extracts in a gel filtration column, the antifungal activity was observed in both the low molecular weight and the high molecular weight fractions (Figure 4(a)). These results provide a combined action of different antifungal compounds. Each of them can independently suppress the growth of the pathogen *in vitro*, but their combination (crude culture extract) can enhance the antifungal action. Although, further biochemical analysis, using High Performance Liquid Chromatography fractionation coupled with Mass Spectrometry and Nuclear Magnetic Resonance techniques will allow us to refine its structure.

Moreover, examining the antimicrobial activity of the bioactive extractions against common microbial indicators (*Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas fluorescens*, and *Saccharomyces cerevisiae*) it was shown that the agar extract from *S. rochei* (ACTA1551) was able to inhibit growth of all the examined indicator microorganisms (Figure 4(b)). Therefore the antifungal activity of the selected streptomycete has a wider antimicrobial activity.

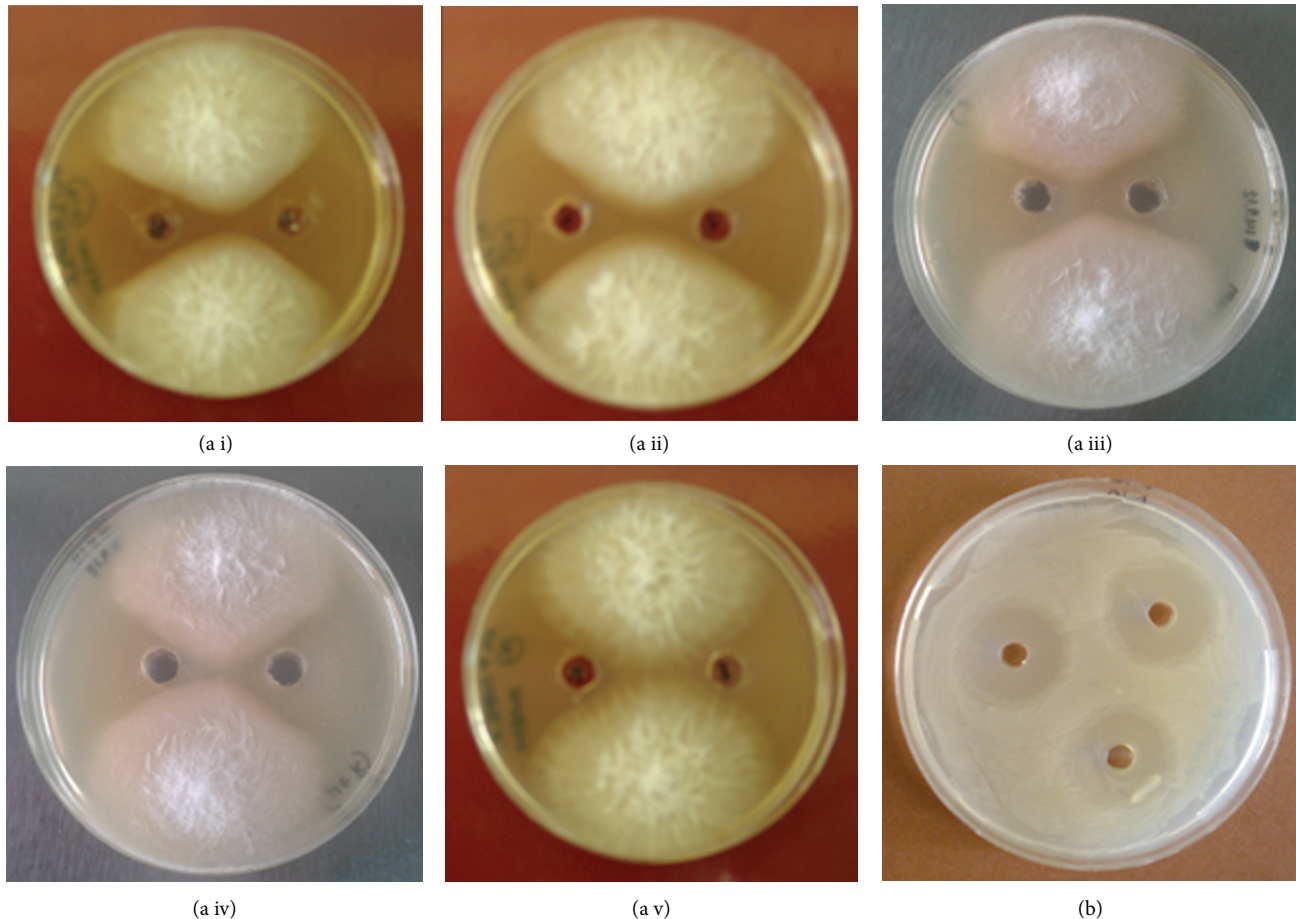


FIGURE 4: (a) Antifungal activity of the concentrated medium extracts derived from the solid culture of *Streptomyces rochei* ACTA1551 with or without *F. oxysporum*. Inhibition zone caused from (i) *Streptomyces rochei* ACTA1551 culture extract when *F. oxysporum* is present, (ii) *Streptomyces rochei* ACTA1551 culture extract when *F. oxysporum* is absent, (iii) *Streptomyces rochei* ACTA1551 low molecular weight fractions, (iv) *Streptomyces rochei* ACTA1551 high molecular weight fractions and negative control (no streptomycete extract added) (v). (b) Antifungal activity of the concentrated medium extracts derived from the solid culture of *Streptomyces rochei* ACTA1551 against *E. coli*.

4. Conclusion

This study focused on screening the special and biotechnologically interesting Greek *Streptomyces* microflora in order to detect strains able to control the phytopathogenic fungi *Fusarium oxysporum*. The best antifungal producer, *Streptomyces rochei* ACTA1551 from the rhizosphere soil of the plant *Pinus brutia* (indigenous plant of Crete), proved to be capable of protecting tomato plants from Fusarium wilting under laboratory conditions while evidence that it promoted the plants growth was derived. The same streptomycete strain showed to be a promising producer of metabolites of a wide range of antimicrobial activity. Therefore, the present study demonstrated that *Streptomyces rochei* ACTA1551 is a new potential biocontrol agent at least against the pathogenic fungus *Fusarium oxysporum*.

References

- [1] C. H. Beckman, *The Nature of Wilt Diseases of Plants*, APS Press, St. Paul, Minn, USA, 1987.
- [2] N. Ozbay and S. E. Newman, "Fusarium crown and root rot of tomato and control methods," *Plant Pathology Journal*, vol. 3, pp. 9–18, 2004.
- [3] G. E. Masee, *The British Fungus-Flora, a Classified Text Book of Mycology*, George Bell & Sons, London, UK, 1985.
- [4] D. Brayford, "*Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*, IMI descriptions of fungi and bacteria no. 1270," *Mycopathologia*, vol. 133, pp. 61–63, 1996.
- [5] W. R. Jarvis, "Fusarium crown and root rot of tomatoes," *Phytoprotection*, vol. 69, pp. 49–64, 1988.
- [6] C. Borrero, J. Ordovasa, M. I. Trillasb, and M. Avilés, "Tomato Fusarium wilt suppressiveness. The relationship between the organic plant growth media and their microbial communities as characterised by biology," *Soil Biology & Biochemistry*, vol. 38, pp. 1631–1637, 2006.
- [7] W. H. Elmer, D. A. Johnson, and G. I. Mink, "Epidemiology and management of the diseases causal to asparagus decline," *Plant Disease*, vol. 80, pp. 117–125, 1996.
- [8] Y. Uesugi, "Fungicide classes: chemistry, uses and mode of action," in *Fungicidal Activity: Chemical and Biological Approaches To Plant Protection*, D. Hutson and J. Miyamoto, Eds., pp. 23–56, John Wiley & Sons, New York, NY, USA, 1998.

- [9] B. C. Baldwin and W. G. Rathmell, "Evolution of concepts for chemical control of plant disease," *Annual Review in Phytopathology*, vol. 26, pp. 265–283, 1988.
- [10] G. N. Agrios, *Plant Pathology*, Academic Press, New York, NY, USA, 3rd edition, 1988.
- [11] R. J. Cook, "Making greater use of microorganisms for biocontrol of plant pathogens," *Annual Reviews in Phytopathology*, vol. 31, pp. 53–80, 1993.
- [12] A. Heydari, "Biological control of turfgrass fungal diseases," in *Turfgrass Management and Physiology*, M. Pessarakli, Ed., CRC Press, Boca Raton, Fla, USA, 2007.
- [13] A. Heydari, I. J. Misaghi, and G. M. Balestra, "Pre-emergence herbicides influence the efficacy of fungicides in controlling cotton seedling damping-off in the field," *International Journal of Agricultural Research*, vol. 2, no. 12, pp. 1049–1053, 2007.
- [14] M. Hernandez-Suarez, F. D. Hernandez-Castillo, G. Gallegos-Morales, R. H. Lira-Saldivar, and R. Rodriguez-Herrera, "Biocontrol of soil fungi in tomato with microencapsulates containing *Bacillus subtilis*," *American Journal of Agricultural and Biological Sciences*, vol. 6, pp. 189–195, 2011.
- [15] K. Handreck and N. Black, *Growing Media For Ornamental Plants and Turf*, University of New South Wales Press, Sydney, Australia, 3rd edition, 2002.
- [16] C. Y. Shen, "Integrated management of *Fusarium* and *Verticillium* wilts of cotton in China," *Crop Protection*, vol. 4, no. 3, pp. 337–345, 1985.
- [17] A. Miguel, J. V. Maroto, A. San Bautista et al., "The grafting of triploid watermelon is an advantageous alternative to soil fumigation by methyl bromide for control of *Fusarium* wilt," *Scientia Horticulturae*, vol. 103, no. 1, pp. 9–17, 2004.
- [18] S. C. Hwang, "Recent development in *Fusarium* research & development of banana in Taiwan," in *Banana Fusarium Wilt Management: Towards Sustainable Cultivation: Proceedings of the International Workshop on Banana Fusarium Wilt Disease*, A. B. Molina, N. H. N. Masdek, and K. W. Liew, Eds., pp. 39–49, INIBAP, Montpellier, France, 1999.
- [19] M. Ulloa, J. M. Stewart, E. A. Garcia-Castañeda, S. GodoyAvila, A. Gaytan-Mosqueta, and S. Acosta-Nuñez, "Cotton genetic resources in the western states of Mexico: *In situ* conservation status and germplasm collection for ex situ preservation," *Genetic Resources and Crops Evolution*, vol. 53, pp. 653–668, 2006.
- [20] D. M. Weller, "Pseudomonas biocontrol agents of soilborne pathogens: looking back over 30 years," *Phytopathology*, vol. 97, no. 2, pp. 250–256, 2007.
- [21] L. C. Dekkers, I. H. M. Mulders, C. C. Phoelich, T. F. C. Chin-A-Woeng, A. H. M. Wijffes, and B. J. J. Lugtenberg, "The *sss* colonization gene of the tomato-*Fusarium oxysporum* f. sp. *radicislycopersici* biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* WCS365 can improve root colonization of other wild-type *Pseudomonas* spp. bacteria," *Molecular Plant-Microbe Interactions*, vol. 13, no. 11, pp. 1177–1183, 2000.
- [22] Z. Zhang and L. S. Pierson, "A second quorum-sensing system regulates cell surface properties but not phenazine antibiotic production in *Pseudomonas aureofaciens*," *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 67, no. 9, pp. 4305–4315, 2001.
- [23] A. Bolwerk, A. L. Lagopodi, A. H. M. Wijffes et al., "Interactions in the tomato rhizosphere of two *Pseudomonas* biocontrol strains with the phytopathogenic fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*," *Molecular Plant-Microbe Interactions*, vol. 16, no. 11, pp. 983–993, 2003.
- [24] A. Heydari and M. Pessarakli, "A review on biological control of fungal plant pathogens using microbial antagonists," *Journal of Biological Sciences*, vol. 10, no. 4, pp. 273–290, 2010.
- [25] Y. J. Zhang, P. S. Fan, X. Zhang, C. J. Chen, and M. G. Zhou, "Quantification of *Fusarium graminearum* in harvested grain by real-time polymerase chain reaction to assess efficacies of fungicides on fusarium head blight, deoxynivalenol contamination, and yield of winter wheat," *Phytopathology*, vol. 99, no. 1, pp. 95–100, 2009.
- [26] V. K. Chebotar, N. M. Makarova, A. I. Shaposhnikov, and L. V. Kravchenko, "Antifungal and phytostimulating characteristics of *Bacillus subtilis* Ch-13 rhizospheric strain, producer of bio-preparations," *Applied Biochemistry and Microbiology*, vol. 45, no. 4, pp. 419–423, 2009.
- [27] V. Nihorimbere, M. Ongena, H. Cawoy et al., "Beneficial effects of *Bacillus subtilis* on field-grown tomato in Burundi: reduction of local *Fusarium* disease and growth promotion," *African Journal of Microbiology Research*, vol. 4, no. 11, pp. 1135–1142, 2010.
- [28] C. Olivain, C. Humbert, J. Nahalkova, J. Fatehi, F. L'Haridon, and C. Alabouvette, "Colonization of tomato root by pathogenic and nonpathogenic *Fusarium oxysporum* strains inoculated together and separately into the soil," *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 72, no. 2, pp. 1523–1531, 2006.
- [29] K. He, E. B. Rimm, A. Merchant et al., "Fish consumption and risk of stroke in men," *Journal of the American Medical Association*, vol. 288, no. 24, pp. 3130–3136, 2002.
- [30] M. G. Bakker, J. D. Glover, J. G. Maib, and L. L. Kinkela, "Plant community effects on the diversity and pathogen suppressive activity of soil streptomycetes," *Applied Soil Ecology*, vol. 46, pp. 35–42, 2010.
- [31] S. Compant, B. Reiter, A. Sessitsch, J. Nowak, C. Clément, and E. A. Barka, "Endophytic colonization of *Vitis vinifera* L. by plant growth-promoting bacterium *Burkholderia* sp. strain PsJN," *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 71, no. 4, pp. 1685–1693, 2005.
- [32] A. Minuto, D. Spadaro, A. Garibaldi, and M. L. Gullino, "Control of soilborne pathogens of tomato using a commercial formulation of *Streptomyces griseoviridis* and solarization," *Crop Protection*, vol. 25, no. 5, pp. 468–475, 2006.
- [33] G. S. Kanini, E. A. Katsifas, A. L. Savvides, D. G. Hatzinikolaou, and A. D. Karagouni, "Greek indigenous streptomycetes as biocontrol agents against the soil-borne fungal plant pathogen *Rhizoctonia solani*," *Journal of Applied Microbiology*, vol. 114, no. 5, pp. 1468–1479, 2013.
- [34] H. Cawoy, W. Bettiol, P. Fickers, and M. Ongena, *Pesticides in the Modern World—Pesticides Use and Management*, InTech, Rijeka, Croatia, 2011, Edited by: M. Stoytcheva.
- [35] T. Taechowisan, N. Chuaychot, S. Chanaphat, A. Wanbanjob, and P. Tantiwachwutikul, "Antagonistic effects of *Streptomyces* sp. SRM1 on *Colletotrichum musae*," *Biotechnology*, vol. 8, no. 1, pp. 86–92, 2009.
- [36] K. Chamberlain and D. L. Crawford, "*In vitro* and *in vivo* antagonism of pathogenic turfgrass fungi by *Streptomyces* hygroscopicus strains YCED9 and WYE53," *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, vol. 23, no. 1, pp. 641–646, 1999.
- [37] R. F. de Souza, R. R. R. Coelho, A. Macrae et al., "*Streptomyces lunalinharesii* sp. nov., a chitinolytic streptomycete isolated from cerrado soil in Brazil," *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, vol. 58, no. 12, pp. 2774–2778, 2008.

- [38] K. Getha and S. Vikineswary, "Antagonistic effects of *Streptomyces violaceusniger* strain G10 on *Fusarium oxysporum* f.sp. cubense race 4: indirect evidence for the role of antibiosis in the antagonistic process," *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, vol. 28, no. 6, pp. 303–310, 2002.
- [39] R. C. Gomes, L. T. A. S. Semêdo, R. M. A. Soares, C. S. Alviano, L. F. Linhares, and R. R. R. Coelho, "Chitinolytic activity of actinomycetes from a cerrado soil and their potential in biocontrol," *Letters in Applied Microbiology*, vol. 30, no. 2, pp. 146–150, 2000.
- [40] B. K. Hwang, S. W. Lim, B. S. Kim, J. Y. Lee, and S. S. Moon, "Isolation and *in vivo* and *in vitro* antifungal activity of phenylacetic acid and sodium phenylacetate from *Streptomyces humidus*," *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 67, no. 8, pp. 3739–3745, 2001.
- [41] K. A. El-Tarabily, "Promotion of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) plant growth by rhizosphere competent 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase-producing streptomycete actinomycetes," *Plant and Soil*, vol. 308, no. 1-2, pp. 161–174, 2008.
- [42] Y. Igarashi, M. Ogawa, Y. Sato et al., "Fistupyrone, a novel inhibitor of the infection of Chinese cabbage by *Alternaria brassicicola*, from *Streptomyces* sp. TP-A-0569," *Journal of Antibiotics*, vol. 53, no. 10, pp. 1117–1122, 2000.
- [43] M. Ichinose, M. Saito, N. Fujii et al., "Modulation of the control of muscle sympathetic nerve activity during incremental leg cycling," *Journal of Physiology*, vol. 586, no. 11, pp. 2753–2766, 2008.
- [44] S. D. Schrey and M. T. Tarkka, "Friends and foes: streptomycetes as modulators of plant disease and symbiosis," *Antonie van Leeuwenhoek*, vol. 94, no. 1, pp. 11–19, 2008.
- [45] G. Godoy-Lutz, S. Kuninaga, J. R. Steadman, and K. Powers, "Phylogenetic analysis of *Rhizoctonia solani* subgroups associated with web blight symptoms on common bean based on ITS-5.8S rDNA," *Journal of General Plant Pathology*, vol. 74, no. 1, pp. 32–40, 2008.
- [46] E. C. Neeno-Eckwall, L. L. Kinkel, and J. L. Schottel, "Competition and antibiosis in the biological control of potato scab," *Canadian Journal of Microbiology*, vol. 47, no. 4, pp. 332–340, 2001.
- [47] N. Shekhar, D. Bhattacharya, D. Kumar, and R. K. Gupta, "Biocontrol of wood-rotting fungi with *Streptomyces violaceusniger* XL-2," *Canadian Journal of Microbiology*, vol. 52, no. 9, pp. 805–808, 2006.
- [48] W. M. Yuan and D. L. Crawford, "Characterization of *Streptomyces lydicus* WYEC108 as a potential biocontrol agent against fungal root and seed rots," *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 61, no. 8, pp. 3119–3128, 1995.
- [49] P. R. Herron and E. M. H. Wellington, "New method for extraction of streptomycete spores from soil and application to the study of lysogeny in sterile amended and nonsterile soil," *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 56, no. 5, pp. 1406–1412, 1990.
- [50] U. Edwards, T. Rogall, H. Blöcker, M. Emde, and E. C. Böttger, "Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA," *Nucleic Acids Research*, vol. 17, no. 19, pp. 7843–7853, 1989.
- [51] D. J. Lane, "16S/23S rRNA sequencing," in *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*, E. Stackebrandt and M. Goodfellow, Eds., pp. 115–147, John Wiley & Sons, New York, NY, USA, 1991.
- [52] K. Tamura, D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei, and S. Kumar, "MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance and maximum parsimony methods," *Molecular Biology and Evolution*, vol. 28, no. 10, pp. 2731–2739, 2011.
- [53] R. M. Atlas, *Handbook of Microbiological Media*, CRC Press, Boca Raton, Fla, USA, 1993, Edited by: L. C. Parks.
- [54] E. M. H. Wellington, N. Cresswell, and V. A. Saunders, "Growth and survival of streptomycete inoculants and extent of plasmid transfer in sterile and nonsterile soil," *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 56, no. 5, pp. 1413–1419, 1990.
- [55] Z. Lu, R. Tombolini, S. Woo, S. Zeilinger, M. Lorito, and J. K. Jansson, "In vivo study of *Trichoderma*-pathogen-plant interactions, using constitutive and inducible green fluorescent protein reporter systems," *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 70, no. 5, pp. 3073–3081, 2004.
- [56] S. Baur, J. Niehaus, A. D. Karagouni et al., "Fluostatins C-E, novel members of the fluostatin family produced by *Streptomyces* strain acta 1383," *Journal of Antibiotics*, vol. 59, no. 5, pp. 293–297, 2006.
- [57] T. Paululat, E. A. Katsifas, A. D. Karagouni, and H. P. Fiedler, "Grecoketides A and B: new naphthoquinones from *Streptomyces* sp. Acta 1362," *European Journal of Organic Chemistry*, vol. 2008, no. 31, pp. 5283–5288, 2008.
- [58] T. Paululat, A. Kulik, H. Hausmann et al., "Grecocyclines: new angucyclines from *Streptomyces* sp. Acta 1362," *European Journal of Organic Chemistry*, no. 12, pp. 2344–2350, 2010.
- [59] E. A. Katsifas, E. P. Giannoutsou, and A. D. Karagouni, "Diversity of streptomycetes among specific Greek terrestrial ecosystems," *Letters in Applied Microbiology*, vol. 29, no. 1, pp. 48–51, 1999.
- [60] E. A. Katsifas, T. G. Koraki, and A. D. Karagouni, "Determination of metabolic activity of streptomycetes in soil microcosms," *Journal of Applied Microbiology*, vol. 89, no. 1, pp. 178–184, 2000.
- [61] G. S. Reddi and A. S. Rao, "Antagonism of soil actinomycetes to some soil-borne plant pathogenic fungi," *Indian Phytopathology*, vol. 24, pp. 649–657, 1971.
- [62] B. Mahadevan and D. L. Crawford, "Properties of the chitinase of the antifungal biocontrol agent *Streptomyces lydicus* WYEC108," *Enzyme Microbiology and Technology*, vol. 20, pp. 293–489, 1997.
- [63] A. A. Farrag, "Efficiency of different biocontrol agents on both susceptible and resistant bean plants and their protein pattern consequences," *Journal of American Science*, vol. 7, no. 4, pp. 7–14, 2011.
- [64] L. W. Burgess, C. M. Liddell, and B. A. Summerell, *Laboratory Manual For Fusarium Research*, University of Sydney, Sydney, Australia, 2nd edition, 1988.
- [65] D. A. Mitchell, "Growth patterns, growth kinetics and the modeling of growth in solid-state cultivation," in *Solid Substrate Cultivation*, H. W. Doelle, D. A. Mitchell, and C. E. Rolz, Eds., pp. 87–114, Elsevier Applied Science, New York, NY, USA, 1992.
- [66] Y. Nerey, J. Pannecouque, H. P. Hernandez et al., "*Rhizoctonia* spp. causing root and hypocotyl rot in *Phaseolus vulgaris* in Cuba," *Journal of Phytopathology*, vol. 158, no. 4, pp. 236–243, 2010.
- [67] J. M. Whipps, "Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere," *Journal of Experimental Botany*, vol. 52, pp. 487–511, 2001.

This article was downloaded by: [Nat and Kapodistrian University of Athens]

On: 01 September 2014, At: 00:11

Publisher: Taylor & Francis

Informa Ltd Registered in England and Wales Registered Number: 1072954 Registered office: Mortimer House, 37-41 Mortimer Street, London W1T 3JH, UK



Geomicrobiology Journal

Publication details, including instructions for authors and subscription information:

<http://www.tandfonline.com/loi/ugmb20>

Bacterial Deterioration of Marble Monuments: A Case Study of the Conservation Project of Acropolis Monuments

Alexandros L. Savvides^a, Theodora L. Nikolakopoulou^a, Nikolaos Kyratsous^a, Efstathios A. Katsifas^a, Grammatiki Kanini^a & Amalia D. Karagouni^a

^a Microbiology Group, Department of Botany, Faculty of Biology, National and Kapodistrian University of Athens, Athens, Greece

Accepted author version posted online: 19 Feb 2014. Published online: 12 Aug 2014.

To cite this article: Alexandros L. Savvides, Theodora L. Nikolakopoulou, Nikolaos Kyratsous, Efstathios A. Katsifas, Grammatiki Kanini & Amalia D. Karagouni (2014) Bacterial Deterioration of Marble Monuments: A Case Study of the Conservation Project of Acropolis Monuments, *Geomicrobiology Journal*, 31:8, 726-736, DOI: [10.1080/01490451.2014.885618](https://doi.org/10.1080/01490451.2014.885618)

To link to this article: <http://dx.doi.org/10.1080/01490451.2014.885618>

PLEASE SCROLL DOWN FOR ARTICLE

Taylor & Francis makes every effort to ensure the accuracy of all the information (the "Content") contained in the publications on our platform. However, Taylor & Francis, our agents, and our licensors make no representations or warranties whatsoever as to the accuracy, completeness, or suitability for any purpose of the Content. Any opinions and views expressed in this publication are the opinions and views of the authors, and are not the views of or endorsed by Taylor & Francis. The accuracy of the Content should not be relied upon and should be independently verified with primary sources of information. Taylor and Francis shall not be liable for any losses, actions, claims, proceedings, demands, costs, expenses, damages, and other liabilities whatsoever or howsoever caused arising directly or indirectly in connection with, in relation to or arising out of the use of the Content.

This article may be used for research, teaching, and private study purposes. Any substantial or systematic reproduction, redistribution, reselling, loan, sub-licensing, systematic supply, or distribution in any form to anyone is expressly forbidden. Terms & Conditions of access and use can be found at <http://www.tandfonline.com/page/terms-and-conditions>

Bacterial Deterioration of Marble Monuments: A Case Study of the Conservation Project of Acropolis Monuments

ALEXANDROS L. SAVVIDES, THEODORA L. NIKOLAKOPOULOU, NIKOLAOS KYRATSOUS, EFSTATHIOS A. KATSIFAS, GRAMMATIKI KANINI, and AMALIA D. KARAGOUNI*

Microbiology Group, Department of Botany, Faculty of Biology, National and Kapodistrian University of Athens, Athens, Greece

Received July 2013, Accepted January 2013

The deterioration of the Acropolis monuments' surface can be attributed to a combination of mechanical, physical, chemical and biological factors. The aim of this work was to investigate the potential use of biocides suitable for marble surface in order to confront the biodeterioration phenomenon due to heterotrophic bacteria. Surface bacterial populations were studied in respect to the application of three biocide agents. A significant decrease of the bacterial counts was occurred after the biocides' application and remained less compared with the counts occurred on the untreated surfaces for more than 14 months. A gradual diminution of bacterial diversity was also observed leading to the survival of specific Gram positive strains.

Keywords: Ancient Marble, Acropolis, deterioration, bacteria diversity

Introduction

The Acropolis monuments represent an important part of Greece's cultural heritage. As all historical buildings, the monuments are suffering by deterioration processes caused by environmental and biological factors (Papida et al. 2000). The most important biological deterioration factor is the microbial colonization on marble monuments (Warscheid and Braams 2000).

The microflora that may be found on the surface of marble/stone monuments includes autotrophic and heterotrophic bacteria, fungi, algae and lichens (Gaylarde et al. 2001; Lamprinou et al. 2011; McNamara et al. 2006; Videla et al. 2000). This consortium of heterogeneous microbial species forms a biofilm that holds extracellular polymeric substances at the underlying surface. The effects of these biofilms are the discoloration of stone surface (presence of photosynthetic microorganisms) and the physical alteration of the material structure (penetration of bacterial and fungal hyphae). Biofilm formation also chemically modifies the mineral support, leading to acidolytic and oxidoreductive corrosion processes generated by the products of the microbial metabolism (Warscheid and Braams 2000).

Heterotrophic bacteria play an important role to marble deterioration although their abundance is connected to the

water availability and the climatic conditions (Warren-Rhodes et al. 2006). Among the most important groups of heterotrophic bacteria involved in marble deterioration are the phylum of Actinobacteria, Firmicutes and Proteobacteria (Heyrman et al. 1999). Actinobacteria penetrate their substrate and have been found as important endoliths in various types of built stone (McNamara et al. 2006; Narváez-Zapata et al. 2005) where they form, a whitish veil or, in other cases, they produce various water-soluble dark pigments. As has been reported, their acidic metabolic products hydrolyze silicate minerals and chelate metal ions of the stones (Kumar and Kumar 1999).

Organisms of the phylum Firmicutes have been also frequently identified on stone buildings (Gaylarde et al. 2001; Heyrman and Swings 2001; Laiz et al. 2003; Ortega-Morales et al. 2004). Exposure to high levels of solar radiation with subsequent drying of the substrate, leads to preferential growth of spore forming bacteria, such as *Bacillus* and heat tolerant actinomycetes, over Gram negative bacteria (Scheerer et al. 2009). They also tend to predominate over Gram-negative bacteria on exposed stone surfaces (Dornieden et al. 2000; Saarela et al. 2004; Warscheid and Braams 2000). Another important group that may be present on marble surface is that of Proteobacteria. In some cases, this group is predominant in limestone biofilm and considered as the most metabolically active (Berdoulay and Salvado 2009; Portillo et al. 2009).

Actions for the removal of the microbial community can be divided into four major categories: (1) indirect control by altering environmental conditions; (2) mechanical removal of biodeteriogens; (3) physical eradication methods; (4) use of biocides (Scheerer et al. 2009). In any case, the removal has to be performed by personnel with microbiological background,

*Address correspondence to Amalia D. Karagouni, Microbiology Group, Department of Botany, Faculty of Biology, National and Kapodistrian University of Athens, 15781 Athens, Greece; Email: akar@biol.uoa.gr

Color versions of one or more of the tables in the article can be found online at www.tandfonline.com/ugmb.

and must be carefully evaluated considering the history and condition of the artifact, as well as physical and chemical damaging factors. Several studies have been performed on the effectiveness of the control of microbial growth using the above mentioned strategy.

Every one of the four mentioned categories has some disadvantages. In some cases the results had some detrimental effects on the marbles; for example, microbial growth was prevented by altering growth supporting conditions (e.g., introduction of a drainage system). It has been reported that physical methods such as UV light, had long treatment times and low penetration depth (Van der Molen et al. 1980), while cleaning with water, enhance microbial growth (Young 1997). Although the use of biocides eliminate microbial growth on marbles and artifacts (Caneva et al. 2008; Pinna et al. 2012; Stupar et al. 2012) in some cases, a discoloration and a salt formation of the marble were observed after an application of biocide (Caneva et al. 1991; Cameron et al. 1997; Kumar and Kumar 1999; Warscheid and Braams 2000).

Interventions and conservation works on Acropolis monuments involved several mechanical and chemical procedures (www.ysma.gr). The Acropolis Restoration Service (Y.S.M.A.), aiming to limit microbial growth on the marble surface, decided to perform a field study by investigating whether three selected biocides could be effective. Three biocides were selected out of eight after preliminary laboratory studies. Total bacterial counts as well as bacterial diversity was examined before and after each biocide application throughout a 14-month period. Results are discussed with respect to seasonal variation of microbial populations.

Materials and Methods

Culture Media

Media used for isolation and cultivation of the bacterial isolates were Nutrient Agar (NA) (Atlas 1993) and Thiobacillus medium (Atlas 1993) containing (gL^{-1}): NH_4Cl 0.1, K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.02, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.02, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1, CaCl_2 0.1 and agar 10. All microbial isolates were recovered from the Acropolis monuments, Athens, Greece.

Application of Biocides

A total of 100 mL of each biocide solution were applied on the surface, via a fine painting brush, in horizontal, vertical and orbicular movements. The three biocides solution used were: a D/2 Architectural Biocide solution (Sunshine Makers Inc., USA) without any dilution, a 4% (v/v) absolute ethanol solution of PREVENTOL R80 (Bayer Inc., Germany) and a sterile water solution of Algophase 3% (v/v) (Phase Company, Firenze, Italy).

Site Description and Sampling Procedure

Three sampling areas were chosen for this study by the Acropolis Restoration Service (Y.S.M.A.) and researches of our Microbiology group. Sampling was performed in collaboration to conservators of Y.S.M.A. by scraping off material from the stone surface of marbles with a sterile scalpel. All the marble stones were close to the ground and have never been under interventions or conservation. Furthermore they are not under a conservation schedule for the next period.

Sampling site A was located in Propylaea monument ($37^\circ 58' 17.4'' \text{ N } 23^\circ 43' 34.32'' \text{ E}$). It was a marble stone at the north wing of the monument, under shade for most of the day, receiving sunlight in the afternoon hours (Table 1). Sampling sites B and C were both situated at Erechtheion temple ($37^\circ 58' 19'' \text{ N } 23^\circ 43' 35'' \text{ E}$). Site B was a marble stone located in the interior of the temple, always under shade and exposed to rain and wind. Sampling site C was a surface located on the south porch of the temple, receiving sunlight for most of the day.


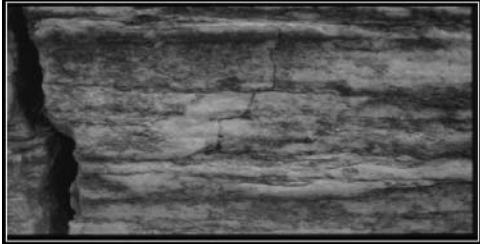

A surface of 800 cm^2 ($20 \times 40 \text{ cm}$) was selected as the sampling site of each area. Each sampling site was divided into four distinct subsampling sites (1 to 4) of 200 cm^2 each ($20 \times 10 \text{ cm}$). Each subsampling sites 1–3 was treated with a biocide and subsampling site 4 remained untreated and was used as a control. The sampling procedure was performed according to a two-dimensional matrix. Five samples of 4 cm^2 were collected from each subsampling site (Figure 1). Each of the five samples was placed separately in preweighed sterile conical bottom tube and transferred in the Microbiology Laboratory (Department of Botany, Faculty of Biology, National and Kapodistrian University of Athens) for processing. The five individual samples of every subsampling site were mixed to provide the so called “laboratory sample.” In all cases, the laboratory sample weighed from 0.5 g to 0.8 g. The material was consisting of biofilm and marble powder that was scraped from the surface (around to 1–2 mm) of every individual sample.

The 1st sampling was performed 27 days (Day-27) before the application of the antimicrobial agents (November 2007). The application of the three biocides was performed in the chosen sampling areas and in different surfaces one next to the other, two times within a period of 24 h during December of 2007. The 2nd sampling was performed 2 days after the first application (December 2007, Day 2). The 3rd and 4th samplings were performed 22 (Day 24) and 40 (Day 42) days respectively after the application (January 2008). The 5th sampling was performed 105 days after the application (April 2008, Day 107). The 6th and 7th samplings took place 178 (Day 180) and 412 (Day 414) days, respectively, after the application (June 2008 and February 2009). All samples were collected between 8 a.m. to 10 a.m. from November 2007 to February 2009. The monitoring of the bacterial population was carried out by our research group until March of 2010.

Isolation of Bacterial Strains

Every “laboratory sample” of each sampling site was mixed with 10 mL of sterile Ringer’s solution (0.25 strength) and

Table 1. Sites used for the study of the effect of the biocides which were introduced for the control of microbial growth (further information about the sampling sites can be found at <http://www.ysma.gr/ysma>)

| Monument | Sample | Sampling site | Description of the sampling area |
|---|----------|---|---|
| Propylaia, north wing, marble stone
<i>BAO6_{εσ}</i> . | sample A |  | Marble with grey and black colored epilithic layers, with many crusts and cracks. The marble stone is under shade for most of the day, receiving sunlight in the afternoon hours. The application of biocides was performed only on the west site of the marble rock. |
| Erechtheion, Interior of temple, Ionian post, marble stone placed on the keystones of the temple. | sample B |  | Marble with black colored epilithic layers, with many crusts and cracks. The marble stone is not exposed to the sunlight at all but is exposed at rain and wind. The application was performed on all sites of the stone except the upper surface. |
| Erechtheion, south porch, post 534. | sample C |  | Marble with brown and beige colored surface, with many crusts. The sampling area was exposed to sun during the daytime and to rain and wind. The application was performed on all sites of the stone except the upper and the north surface. |

shaken on an orbital shaker at 100 rev min^{-1} for 2 h. Mixtures were allowed to settle before making serial dilutions (up to 10^{-5}) of the supernatant fluids and plating on agar media (NA and *Thiobacillus* medium) in triplicate. Agar plates were incubated for 10 days at 30°C in the dark before the bacterial colonies were counted. Total bacterial concentrations were expressed as \log_{10} CFU per gram of material removed from marble surface. Thereafter, each morphologically different colony was picked up and purified further by BOX-PCR analysis and molecular characterization analysis. All isolates were preserved in 30% (w/v) glycerol solution as a protective agent at -80°C .

DNA Extraction

Isolates were harvested from 1 mL overnight culture in the appropriate medium at 30°C and 200 rev min^{-1} . DNA extraction was performed following the protocol of Haught et al. (1994). DNA concentration was determined with a spectrofluorometer and adjusted to 40 ng mL^{-1} for BOX-PCR and characterization analysis.

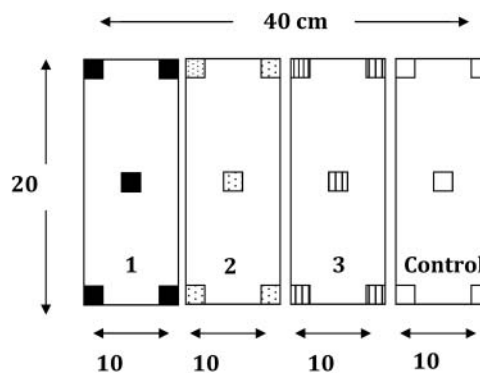


Fig. 1. Schematic presentations of sampling sites the antimicrobial agents were introduced. The sampling site was divided into: sub-sampling site 1 was treated with a D/2 Architectural Biocide solution without any dilution, sub-sampling site 2 was treated with a 4% (v/v) absolute ethanol solution of PREVENTOL R80, sub-sampling site 3 was treated with a sterile water solution of Algophase 3% (v/v) and the control sub-sampling site which remained untreated (sub-sampling site 4). From each sub-sampling sites, five individual samples of 4 cm^2 were collected.

BOX-PCR Analysis

BOX sequences are part of one out of three groups of repeated sequences that have been described for the prokaryotic genome. These sequences contain palindromic parts of 35–40 bp in size. The BOX-PCR method is using specific primer for high conserved and repeated DNA sequences that exist in multiple copies in specific intergenic areas at the genome of the most Gram positive and negative bacteria. The BOX element (BOX1A) was amplified using the BOXA1R primer 5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3' (Rademaker and de Bruijn 1997). The PCR amplification procedure was performed as described by Rademaker and Bruijn (1997). The BOX products were electrophorized in a 1.5% (w/v) agarose gel for 16 h at 1.9 V cm⁻¹ in 1 × TAE. The PCR reaction for each isolate was repeated three times for reproducibility.

Molecular Characterization Analysis of Isolates

The 16S rRNA amplification, 16S rRNA PCR products gel extraction and sequencing were performed according to Savvides et al. (2011). The size of each sequence was approximately 950 bp and sequence comparisons were performed using BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov). The sequences have been submitted to GenBank and assigned accession no. JQ649387 to JQ649408. Sequence data were compiled using the MEGA 5.10 software (Tamura et al. 2011) and aligned with sequences obtained from the GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) databases using the ClustalW aligning utility. Phylogenetic analysis was performed using neighbor-joining method implemented in MEGA 5.10. One thousand bootstrap analyses (distance) were conducted.

Results and Discussion

Microbial Community of Propylaea, North Wing (A)

Total bacterial counts were studied on untreated subsampling site at the north wing of Propylaea (Figure 2). Results showed that the mean value of the bacterial counts did not fluctuate more than $\pm 0.31 \log_{10} \text{ cfu g}^{-1}$, throughout the 14-month period, indicating that there was no significant seasonal effect on the bacterial population. Same level of bacterial counts were observed during preliminary estimation tests performed in November 2003 and in March 2004 (data not shown). The above result is in agreement with May and coworkers (2000) who pointed out that in the warm Mediterranean climate, no seasonal changes were observed in heterotrophic bacteria. Anagnostidis et al. (1992) who studied 13 samples from Propylaea and Parthenon of Acropolis monuments in April and June 1991 obtained similar bacterial counts, although different selective media and sampling sites were chosen.

The application of the three biocides resulted in a significant decrease of the total bacterial counts in all cases (Figure 2). It was clear that although the use of the biocides decreased the total bacterial counts on the screened surfaces,

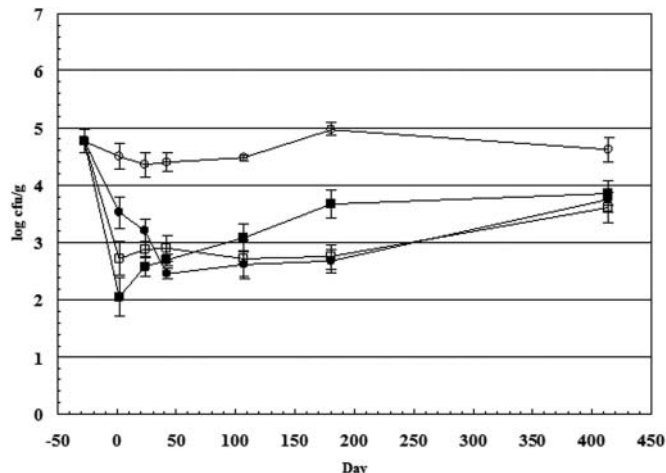


Fig. 2. Effect of the application of biocides on the bacterial population of the Propylaea, north wing (sampling site A). Sub-sampling site used as control (○), D/2 Architectural Biocide® solution without any dilution (●), absolute ethanol solution of PREVENTOL R80® 4% (v/v) (□), sterile water solution of Algophase® 3% (v/v) (■).

each one biocide displayed a different activity pattern. A 2.3 order of magnitude decrease in bacterial population after 40 days of the application of D/2 Architectural Biocide occurred in comparison to the control surface.

During the following 6 months counts remained relatively stable. Seven months after the biocide use and until the end of the experiment an increase of 1.1 orders of magnitude was noticed and always about 0.87 orders of magnitude lower compared to the untreated surface values. PREVENTOL R80 and Algophase resulted in a 2.0 and 2.7 orders of magnitude decrease of bacterial counts respectively after 2 days of the application. Total bacterial counts remained constant at the surface coated with PREVENTOL R80 from day 2 to 180 with small variations. Thereafter, and by the time of 14 months, an increase of 1.15 orders of magnitude occurred. In the case of Algophase treatment, there was a 1.80 orders of magnitude increase from day 2 till the end of monitoring. Data of all surfaces that were treated with biocides, showed that the bacterial counts were about 0.76 (Algophase) to 1.0 (PREVENTOL R80) orders of magnitude less compared to the counts of the control surface on day 414. This result indicated that even after 14 months both biocides were still effective.

Microbial Community of Erechtheion, Interior of Temple (B)

At the interior of Erechtheion temple, total bacterial counts on untreated subsampling site (Figure 3) revealed that the mean value of the bacterial counts did not fluctuate more than $\pm 0.26 \log_{10} \text{ cfu g}^{-1}$, throughout the 14-month period, confirming that there was no obvious seasonal change in the bacterial counts.

A sharp decrease (2.2 orders of magnitude) occurred after the application of D/2 Architectural Biocide (Figure 3).

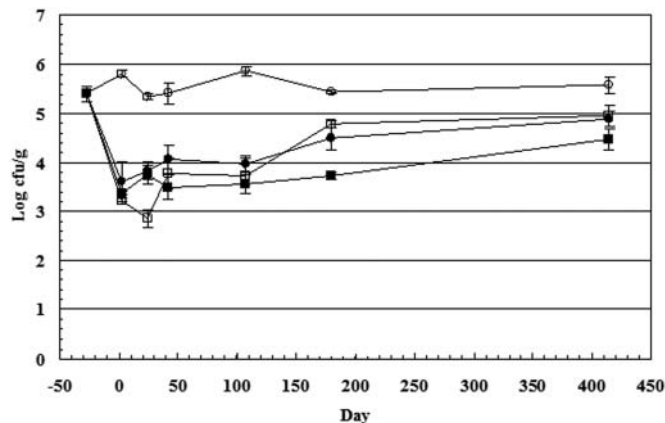


Fig. 3. Effect of the application of biosides on the bacterial population of the Erechtheion, interior of temple (sampling site B). Sub-sampling site used as control (○), D/2 Architectural Biocide® solution without any dilution (●), absolute ethanol solution of PREVENTOL R80® 4% (v/v) (□), sterile water solution of Algophase® 3% (v/v) (■).

Thereafter, a total increase of 1.3 orders of magnitude was monitored from day 2 and until the end, but still 0.7 orders of magnitude lower than the values related to the untreated area. In the case of PREVENTOL R80, bacterial counts were continuously decreasing (2.5 orders of magnitude) until day 24 and then from day 24 to 42, counts increased by 0.9 orders. Within the following one year, counts showed a 1.2 orders of magnitude increase.

The application of PREVENTOL R80 as well as D/2 Architectural Biocide, led to decreased counts (about 0.7 orders) in comparison to the control ones by the end of the experiment. In the case of Algophase treatment, a clear decrease (2.0 orders of magnitude) of bacterial counts occurred immediately after its application, followed by a gradual increase (1.1 order of magnitude) towards the final sampling (day 414). Data revealed that when Algophase was applied on sample area B, bacterial counts were lower compared to the respective values originated from the untreated surface of the monument.

Microbial Community of Erechtheion, South Porch (C)

At the south porch of Erechtheion temple, total bacterial counts of the untreated subsampling site remained stable at a value of $\pm 0.25 \log_{10} \text{cfu g}^{-1}$ throughout the whole screening period, in accordance to the results of the previously described samplings (Figure 4).

There was a decrease (2.4 orders of magnitude) of bacterial counts 2 days after the application of D/2 Architectural Biocide (Figure 4). This effect remained steady for 40 days and then counts were continuously increasing, reaching the final value of $4.01 \log_{10} (\text{cfu g}^{-1})$ on the final sampling. This value was 0.3 orders of magnitude lower than the value of untreated area. PREVENTOL R80 application diminished bacterial counts about 2.01 orders of magnitude in a period of 22 days.

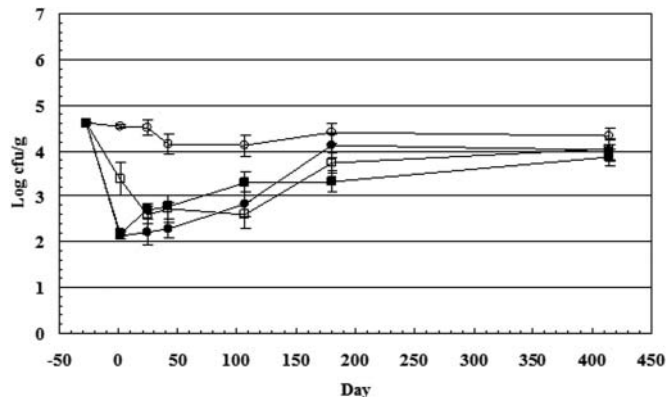


Fig. 4. Effect of the application of biocides on the bacterial population of the Erechtheion, south porch (sampling site C). Sub-sampling site used as control (○), D/2 Architectural Biocide® solution without any dilution (●), absolute ethanol solution of PREVENTOL R80® 4% (v/v) (□), sterile water solution of Algophase® 3% (v/v) (■).

This value remained stable until the day 107 and at day 414 presented an increase of 4.04 log values, nearly reaching the counts of the untreated area at the same sampling. In regard to the application of Algophase, the severe fall of the total bacterial counts identical to that of D/2 Architectural Biocide results was observed. Progressively, counts increased reaching a final value of $3.85 \log_{10} (\text{cfu g}^{-1})$ at the last sampling, but still below the counts of the control surface (Figure 4) about 0.4 orders of magnitude lower compared to the untreated area. It seems that in Erechtheion, south porch (C) site, biocide application was less effective to bacterial population after a period of 14 months in comparison to the other two studied sites.

We believe that the effectiveness of biocides is highly related to the microclimatic conditions such as sunlight, rain/humidity and wind, present at the monuments' microhabitats. All three agents used were able to diminish bacterial counts at least about $1 \log_{10} (\text{cfu g}^{-1})$ and were active even after one year.

Characterization of Isolates

Classic microbiological techniques resulted in a collection of 279 morphologically different bacterial colonies originated from the three sampling sites of the monuments. Using BOX-PCR analysis, the 279 isolates produced 23 different band profiles which revealed 23 different phylotypes. In order to further characterize bacterial communities, 16S rRNA clones of the 23 distinct groups were partially sequenced (Table 2). One of them contained chimeric sequences and was discarded from the analysis. Pairwise alignments of sequences, using 97% similarity as the cut-off, allowed relating them to taxonomically described bacteria. On the whole, bacterial analysis revealed a relatively low bacterial diversity, which is not surprising, as the stone surfaces are oligotrophic substrata (Berdoulay and Salvado 2009). Additionally the position of the isolated bacterial strains and their phylogenetic relation is shown in Figure 5.

Table 2. Abundance of characterized bacterial isolates on sampling sites A, B and C (November 2007—sampling from untreated areas and before the use of biocides)

| | A | B | C |
|------------------------------------|--|---|---|
| November 2007 | | | |
| Nontreated monument | <i>Bacillus infantis</i> strain acr08 (JQ649393)
<i>Bacillus safensis</i> strain acr19 (JQ649404)
<i>Lysinibacillus sphaericus</i> strain acr06 (JQ649391)
<i>Microbacterium imperiale</i> strain acr16 (JQ649401)
<i>Paenibacillus peoriae</i> strain acr09 (JQ649394)
<i>Paenibacillus xylanilyticus</i> strain acr13 (JQ649398)
<i>Pseudomonas koreensis</i> strain acr01 (JQ649387)
<i>Staphylococcus warneri</i> strain acr22 (JQ649407)
<i>Lysinibacillus sphaericus</i> strain acr06 (JQ649391) | <i>Bacillus endophyticus</i> strain acr10 (JQ649395)
<i>Bacillus humi</i> strain acr18 (JQ649403)
<i>Kocuria rosea</i> strain acr20 (JQ649405)
<i>Pseudomonas koreensis</i> strain acr12 (JQ649397)
<i>Pseudomonas lutea</i> strain acr02 (JQ649388)
<i>Terribacillus saccharophilus</i> strain acr14 (JQ649399) | <i>Bacillus subtilis</i> strain acr04 (JQ649389)
<i>Bacillus subtilis</i> strain acr05 (JQ649390)
<i>Staphylococcus succinus</i> strain acr07 (JQ649392)
<i>Bacillus subtilis</i> strain acr11 (JQ649396)
<i>Bacillus megaterium</i> strain acr15 (JQ649400)
<i>Bacillus subtilis</i> strain acr17 (JQ649402)
<i>Bacillus niacini</i> strain acr23 (JQ649408) |
| Biocide application (after 2 days) | | | |
| D/2 Architectural Biocide | <i>Staphylococcus warneri</i> strain acr22 (JQ649407)
<i>Bacillus infantis</i> strain acr08 (JQ649393)
<i>Lysinibacillus sphaericus</i> strain acr06 (JQ649391) | <i>Terribacillus saccharophilus</i> strain acr14 (JQ649399) | <i>Bacillus subtilis</i> strain acr04 (JQ649389) |
| PREVENTOL R80 | <i>Staphylococcus warneri</i> strain acr22 (JQ649407)
<i>Bacillus infantis</i> strain acr08 (JQ649393)
<i>Lysinibacillus sphaericus</i> strain acr06 (JQ649391) | <i>Bacillus humi</i> strain acr18 (JQ649403)
<i>Bacillus endophyticus</i> strain acr10 (JQ649395)
<i>Terribacillus saccharophilus</i> strain acr14 (JQ649399) | <i>Bacillus subtilis</i> strain acr17 (JQ649402)
<i>Pseudomonas koreensis</i> strain acr01 (JQ649387)
<i>Bacillus subtilis</i> strain acr04 (JQ649389) |
| Algophase | | | |
| D/2 Architectural Biocide | <i>7Staphylococcus warneri</i> strain acr22 (JQ649407) | <i>Bacillus humi</i> strain acr18 (JQ649403) | <i>Bacillus niacini</i> strain acr23 (JQ649408)
<i>Bacillus subtilis</i> strain acr17 (JQ649402)
<i>Bacillus subtilis</i> strain acr04 (JQ649389) |
| PREVENTOL R80 | | | |
| Algophase | <i>Bacillus infantis</i> strain acr08 (JQ649393) | <i>Bacillus endophyticus</i> strain acr10 (JQ649395)
<i>Microbacterium imperiale</i> strain acr16 (JQ649401)
<i>Terribacillus saccharophilus</i> strain acr14 (JQ649399) | <i>Bacillus subtilis</i> strain acr04 (JQ649389) |

(continued on next page)

Table 2. Abundance of characterized bacterial isolates on sampling sites A, B and C (November 2007—sampling from untreated areas and before the use of biocides) (*Continued*)

| | A | B | C | |
|--|--------------------------------------|--|---|---|
| Biocide application (after 40 days) | D/2 Architectural Biocide | <i>Lysinibacillus sphaericus</i> strain acr06 (JQ649391) | <i>Bacillus endophyticus</i> strain acr10 (JQ649395) | |
| | | | <i>Pseudomonas lutea</i> strain acr02 (JQ649388) | |
| | PREVENTOL R80 | <i>Arthrobacter agilis</i> strain acr21 (JQ649406) | <i>Terribacillus saccharophilus</i> strain acr14 (JQ649399) | <i>Bacillus subtilis</i> strain acr04 (JQ649389) |
| | | <i>Bacillus safensis</i> strain acr19 (JQ649404) | <i>Bacillus humi</i> strain acr18 (JQ649403) | <i>Staphylococcus succinus</i> strain acr07 (JQ649392) |
| | | | <i>Bacillus subtilis</i> strain acr04 (JQ649389) | <i>Bacillus megaterium</i> strain acr15 (JQ649400) |
| | | | <i>Kocuria rosea</i> strain acr20 (JQ649405) | <i>Bacillus subtilis</i> strain acr11 (JQ649396) |
| | | | <i>Staphylococcus succinus</i> strain acr07 (JQ649392) | <i>Staphylococcus succinus</i> strain acr07 (JQ649392) |
| | | | | <i>Bacillus subtilis</i> strain acr04 (JQ649389) |
| | Algophase | <i>Bacillus infantis</i> strain acr08 (JQ649393) | <i>Arthrobacter agilis</i> strain acr21 (JQ649406) | <i>Bacillus subtilis</i> strain acr17 (JQ649402) |
| | Biocide application (after 105 days) | D/2 Architectural Biocide | <i>Bacillus safensis</i> strain acr19 (JQ649404) | <i>Bacillus subtilis</i> strain acr05 (JQ649390) |
| <i>Bacillus infantis</i> strain acr08 (JQ649393) | | | | |
| PREVENTOL R80 | | <i>Pseudomonas koreensis</i> strain Acr01 (JQ649387) | <i>Kocuria rosea</i> strain acr20 (JQ649405) | <i>Staphylococcus succinus</i> strain acr07 (JQ649392) |
| | | <i>Bacillus subtilis</i> strain acr05 (JQ649390) | <i>Pseudomonas lutea</i> strain acr02 (JQ649388) | |
| | | <i>Bacillus safensis</i> strain acr19 (JQ649404) | <i>Bacillus humi</i> strain acr18 (JQ649403) | <i>Bacillus subtilis</i> strain acr11 (JQ649396) |
| | | | <i>Arthrobacter agilis</i> strain acr21 (JQ649406) | <i>Arthrobacter agilis</i> strain acr21 (JQ649406) |
| | | | | <i>Microbacterium imperiale</i> strain acr16 (JQ649401) |
| | | | | |

| | | | | |
|--------------------------------------|---------------------------|--|---|---|
| Biocide application (after 178 days) | D/2 Architectural Biocide | <i>Bacillus safensis</i> strain acr19 (JQ649404) | <i>Arthrobacter agilis</i> strain acr21 (JQ649406) | <i>Bacillus megaterium</i> strain acr15 (JQ649400) |
| | | <i>Lysinibacillus sphaericus</i> strain acr06 (JQ649391) | <i>Kocuria rosea</i> strain acr20 (JQ649405) | <i>Bacillus subtilis</i> strain acr05 (JQ649390) |
| | | <i>Pseudomonas koreensis</i> strain Acr01 (JQ649387) | <i>Terribacillus saccharophilus</i> strain acr14 (JQ649399) | <i>Bacillus subtilis</i> strain acr11 (JQ649396) |
| | | <i>Arthrobacter agilis</i> strain acr21 (JQ649406) | <i>Bacillus subtilis</i> strain acr04 (JQ649389) | <i>Bacillus subtilis</i> strain acr04 (JQ649389) |
| | | <i>Paenibacillus peoriae</i> strain acr09 (JQ649394) | <i>Arthrobacter agilis</i> strain acr21 (JQ649406) | <i>Microbacterium imperiale</i> strain acr16 (JQ649401) |
| | | <i>Bacillus infantis</i> strain acr08 (JQ649393) | <i>Staphylococcus succinus</i> strain acr07 (JQ649392) | <i>Bacillus subtilis</i> strain acr05 (JQ649390) |
| | | <i>Lysinibacillus sphaericus</i> strain acr06 (JQ649391) | <i>Kocuria rosea</i> strain acr20 (JQ649405) | <i>Bacillus subtilis</i> strain acr04 (JQ649389) |
| | | <i>Paenibacillus xylanolyticus</i> strain acr13 (JQ649398) | <i>Terribacillus saccharophilus</i> strain acr14 (JQ649399) | <i>Bacillus subtilis</i> strain acr11 (JQ649396) |
| | | <i>Arthrobacter agilis</i> strain acr21 (JQ649406) | <i>Bacillus humi</i> strain acr18 (JQ649403) | <i>Staphylococcus succinus</i> strain acr07 (JQ649392) |
| | | <i>Microbacterium imperiale</i> strain acr16 (JQ649401) | <i>Bacillus subtilis</i> strain acr04 (JQ649389) | <i>Arthrobacter agilis</i> strain acr21 (JQ649406) |
| Biocide application (after 412 days) | D/2 Architectural Biocide | <i>Bacillus infantis</i> strain acr08 (JQ649393) | <i>Arthrobacter agilis</i> strain acr21 (JQ649406) | <i>Bacillus subtilis</i> strain acr17 (JQ649402) |
| | | <i>Bacillus subtilis</i> strain acr05 (JQ649390) | <i>Bacillus endophyticus</i> strain acr10 (JQ649395) | <i>Bacillus subtilis</i> strain acr05 (JQ649390) |
| | | | | |
| | | | | |
| Biocide application (after 178 days) | PREVENTOL R80 | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| Biocide application (after 178 days) | Algophase | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |

The comparative analysis of microflora showed that within each monument site considered, the composition and distribution of bacterial isolates were quite similar. In fact, on the basis of taxonomic assignment, the majority of the isolated bacteria (92%) belonged to the phyla of Firmicutes (*Bacillus*, *Lysinibacillus*, *Paenibacillus*, *Staphylococcus* and *Terribacillus* genus) and Actinobacteria (*Microbacterium*, *Kocuria* and *Arthrobacter* genus) and had a comparable percentage in each of the three sites (Table 2). In particular, isolated bacteria of the phylum Firmicutes had a percentage of approximately 76% and of the phylum Actinobacteria had a percentage of approximately 16%. Proteobacteria (*Pseudomonas* genus), constituted a small fraction (8%) of the bacteria isolated from the three monuments. Especially at the sampling site C, Gram negative bacteria were completely absent (Table 2). The predomination of Gram positive over Gram negative bacteria was reported by many researchers worked on limestones and marble experiments. This could be explained by the fact that Gram positive bacteria are known to stand the severe conditions of the stone surface (Scheerer et al. 2009; Warscheid and Braams 2000).

The decrease in total bacterial counts, after the biocide application, in all cases, came along with a notable decrease

in bacterial diversity, as expected. Studying the presence and the survival ability of bacteria throughout the 14-month period, it was obvious that some isolates were present in almost all samples, despite biocide treatment. For instance, *Bacillus infantis* strain acr08 (JQ649393) was present in almost all samplings of Propylaea, north wing (sampling site A). *Terribacillus sacchariphilus* acr14 (JQ649399), *Bacillus subtilis* strain acr04 (JQ649389) and *Bacillus subtilis* strain acr17 (JQ649402) appeared in almost all samplings of Erechtheion (sampling site B and C, Table 2). In accordance to the results of Scheerer and co-workers (2009), our data showed that spore-forming *Bacillus*-like strains prevailed on the marble surfaces screened. Additionally, those Gram positive bacteria are damaging the marbles by two ways; they are participating in the biofilm formation and they are growing on the surfaces of the marble by consuming a group of organic compounds introduced on the marbles from the polluted atmosphere (Barabesi et al. 2007; Warscheid and Braams 2000; Zanardini et al. 2000).

The total number of the different strains isolated from the untreated surfaces was 21 and after the 29th and the 51st day, the total number of strains was 9 and 3 respectively. The diversity of the strains remained limited compared to the

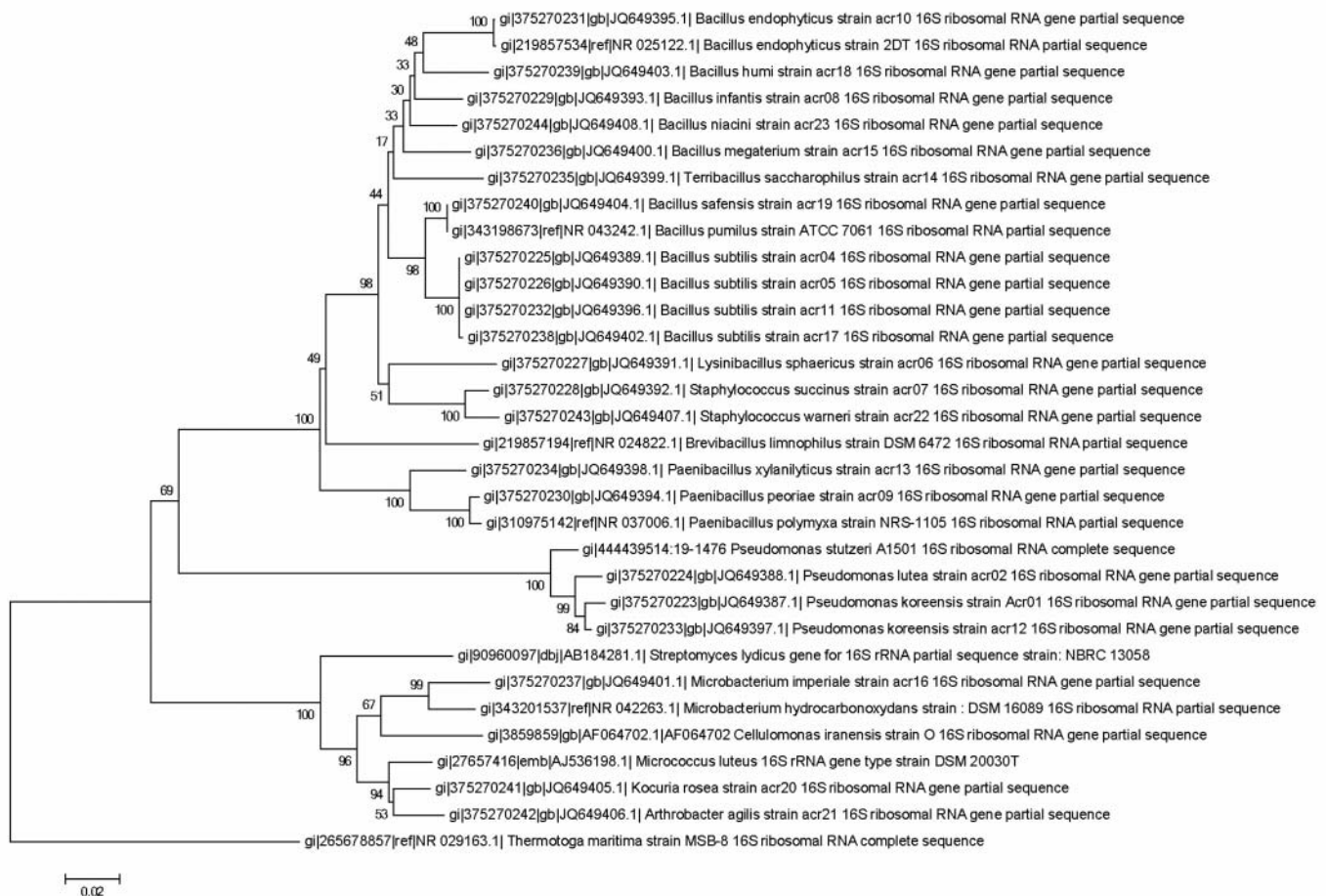


Fig. 5. Phylogenetic tree of the 16S rDNA based on the neighbor-joining method, showing the position of the isolated strains. One thousand bootstrap analyses (distance) were conducted. The tree was rooted with *Thermotoga maritima*. Scale bar represents 2% estimated distance.

unthreaded surface, even throughout 441 days period. Nevertheless, gradual increase of the bacterial diversity was observed from the 29th day of the application until the end of the experiment, independently of the biocide used.

As a general remark, the treatment by all three biocides resulted in a decrease not only of the total bacterial number but of the bacterial diversity as well, on the surface of the stone. This is in agreement with the antibacterial action described in the technical report of the biocides D/2 Architectural Biocide and PREVENTOL R80 as well as in data of other researchers (Caneva et al. 2008; Gutarowska and Michalski 2012). It has been reported that Algophase is a biocide used against photosynthetic microorganisms (cyanobacteria, algae and fungi), but our work indicates that Algophase has at least an antibacterial effect, even limited compared to the effect on photoautotrophic microflora.

The latter has been supported by other workers as well (Caneva et al. 2008; Urzi et al. 2000). The erosion in areas like Acropolis marbles is really savvier and stones and marbles display cracks and crusts in various areas. The depth of the damage of each piece of marble varies due to different parameters that are involved, like the weathering conditions, though marbles that are restored have no cracks anymore. In our case, the penetration of the biocides, through our procedure, was only within a few millimetres in depth but the result was phenotypically clear since within one to two months after the application of biocides the conservators recorded a macroscopic discoloration and aesthetic enhancement of the stone surface.

Concerning our results we could conclude that for the selected sampling sites and the given climatic conditions, D/2 Architectural Biocide was the most effective biocide for site A and Algophase for site B. As for site C, all three biocides displayed similar action on surface bacteria.

Among the biocides used, PREVENTOL R80 had limited biocidal action which may be due to the unique microclimatic conditions of the site. All above information should be taken into consideration in order the YSMA conservators to decide on a suitable agent in monument conservation projects.

Acknowledgments

The authors would like to thank the Acropolis Restoration Service and especially the Head of the technical office and surface conservation laboratory, Mrs. E. Papakonstantinou and the conservators Mrs. S. Papida and Mr. D. Garbis, for the suggestions of the sampling sites, the treatment of the biocide, the collection of specimens and for the valuable comments.

Funding

This work was funded by the Hellenic Ministry of Culture and Tourism.

References

- Anagnostidis K, Gehrman C, Gross M, Krumbein W, Lisi S, Pantazidou A, Urzi C, Zagari M. 1992. Biodeterioration of marbles of the Parthenon and Propylaea, Acropolis, Athens - Associated organisms, decay structures and treatment suggestions. In: Furlan K, editor. Proceedings of the 2nd International Symposium for the Conservation of monuments in the Mediterranean Basin. p305–325.
- Atlas RM. 1993. Handbook of Microbiological Media. Parks LC, editor. Boca Raton Florida: CRC Press, p666, 892.
- Barabesi C, Galizzi A, Mastromei G, Rossi M, Tamburini E, Perito B. 2007. Bacillus subtilis gene cluster involved in calcium carbonate biomineralization. J Bacteriol 189:228–235.
- Berdoulay M, Salvado JC. 2009. Genetic characterization of microbial communities living at the surface of building stones. Lett Appl Microbiol 49:311–316.
- Cameron S, Urquart DCM, Young ME. 1997. Technical Advice Note 10: Biological Growths on Sandstone Buildings: Control and Treatment, Historic Scotland, Edinburgh.
- Caneva G, Nugari MP, Salvadori O. 2008. Control of biodegradation and bioremediation techniques, chemical methods. In: Caneva G, Nugari MP, Salvadori O, editors. Plant Biology for Cultural Heritage: Biodeterioration and Conservation. Los Angeles, CA: Getty Publications. p318–335.
- Caneva G, Nugari MP, Salvadori O. 1991. Biology in the Conservation of Works of Art. International Centre for the Study of the Preservation and Restoration of Cultural Property (ICCROM), Rome.
- Dornieden T, Gorbushina AA, Krumbein WE. 2000. Patina physical and chemical interactions of sub-aerial biofilms with objects of Art. In: Ciferri O, Tiano P, Mastromei G, editors. Of Microbes and Art: The Role of Microbial Communities in the Degradation and Protection of Cultural Heritage. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers. p105–119.
- Gaylarde PM, Gaylarde CC, Guamet PS, Gomez de Saravia SG, Videla HA. 2001. Biodeterioration of Mayan buildings at Uxmal and Tulum, Mexico. Biofouling 17:41–45.
- Gutarowska B, Michalski A. 2012. Microbial degradation of woven fabrics and protection against biodegradation. In: Jeon H-Y, editor. Woven Fabrics. Croatia: In Tech. pp 272–280.
- Haight C, Wilkinson DL, Zgafas K, Harrison RG. 1994. A method to insert a DNA fragment into a double-stranded plasmid. Biotechniques 16:46–48.
- Heyrman J, Mergaert J, Denys R, Swings J. 1999. The use of fatty acid methyl ester analysis (FAME) for the identification of heterotrophic bacteria present on three mural paintings showing severe damage by microorganisms. FEMS Microbiol Lett 181:55–62.
- Heyrman J, Swings J. 2001. 16S rDNA sequence analysis of bacterial isolates from biodeteriorated mural paintings in the Servilia tomb (Necropolis of Carmona, Seville, Spain). Syst Appl Microbiol 24:417–422.
- Kumar R, Kumar AV. 1999. Biodeterioration of stone in tropical environments: An overview. In Sherman-Aboufadel S, editor. Research in Conservation series. Los Angeles, CA: Getty Conservation Institute. p 85.
- Laiz L, Pinar G, Lubitz W, Saiz-Jimenez C. 2003. Monitoring the colonization of monuments by bacteria: cultivation versus molecular methods. Environ Microbiol 5:72–74.
- Lamprinou V, Mammali M, Katsifas EA, Pantazidou AI, Karagouni AD. 2013. Phenotypic and molecular biological characterization of cyanobacteria from marble surfaces of treated and untreated sites of Propylaea (Acropolis, Athens). Geomicrobiol J 30:371–378.
- May E, Papida S, Hesham A, Tayler S, Dewedar A. 2000. Comparative studies of microbial communities on stone monuments in temperate and semiarid climates. In: Ciferri O, Tiano P, Mastromei G, editors. Of Microbes and Art: The Role of Microbial Communities in

- the Degradation and Protection of Cultural Heritage. New York: Kluwer Academic/Plenum Publisher, p49–62.
- McNamara CJ, Perry TD 4th, Bearce KA, Hernandez-Duque G, Mitchell R. 2006. Epilithic and endolithic bacterial communities in limestone from a Maya archaeological site. *Choose Destination. Microb Ecol* 51:51–64.
- Narváez-Zapata JA, Rodríguez-Avila N, Ortega-Morales BO. 2005. Method for recovery of intact DNA for community analysis of marine intertidal microbial biofilms. *Mol Biotechnol* 30:51–56.
- Ortega-Morales BO, Narvaez-Zapata JA, Schmalenberger A, Sosa-Lopez A, Tebbe C. 2004. Biofilms fouling ancient limestone Mayan monuments in Uxmal, Mexico: a cultivation-independent analysis. *Biofilms* 2:79–91.
- Papida S, Murphy W, May E. 2000. Enhancement of physical weathering of building stones by microbial populations. *Int Biodeter Biodegrad* 46:305–317.
- Pinna D, Salvadori B, Galeotti M. (2012) Monitoring the performance of innovative and traditional biocides mixed with consolidants and water-repellents for the prevention of biological growth on stone. *Sci Total Environ* 423:132–141.
- Portillo MC, Alloza R, Gonzales JM. 2009. Three different phototrophic microbial communities colonizing a single natural shelter containing prehistoric paintings. *Sci Total Environ* 407:4876–4881.
- Rademaker JLW, de Bruijn FJ. 1997. Characterization and classification of microbes by rep-PCR genomic fingerprinting and computer-assisted pattern analysis. In: Caetano-Anollés G, Gresshoff PM, editors. *DNA markers: Protocols, Applications and overviews*. New York: John Wiley and Sons Interscience, p151–171.
- Saarela M, Rantala M, Hallamaa K, Nohynek L, Virkajärvi I, Mättö J. 2004. Stationary-phase acid and heat treatments for improvement of the viability of probiotic lactobacilli and bifidobacteria. *J Appl Microbiol* 96:1205–1214.
- Savvides AL, Andriopoulos CP, Kormas KK, Hatzinikolaou DG, Katsifas EA, Karagouni AD. 2011. Selective isolation of indigenous *Pseudomonas syringae* strains with ice nucleation activity properties from a ski resort. *J Biol Res-Thessalon* 15:67–73.
- Scheerer S, Ortega-Morales O, Gaylarde CC. 2009. Chapter 5 Microbial deterioration of stone monuments — An updated overview. *Adv Appl Microbiol* 66:97–139.
- Stupar M, Grbic ML, Simic GS, Jelikic A, Vukojevic J, Sabovljevic M. 2012. A sub-aerial biofilms investigation and new approach in biocide application in cultural heritage conservation: Holy Virgin Church (Gradac Monastery, Serbia). *Indoor and Built Environ*. doi:10.1177/1420326X12466753.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* 28:2731–2739.
- Urzi C, De Leo F, Galletta M, Salamone P. 2000. Efficiency of biocide in “in situ” and “in vitro” treatment. Study case of the “Temple de Mudejar”, Guadalupe, Spain. In: Fassina V, editor. *Proceeding of the 9th international congress on deterioration and conservation of stone*, Venice, Italy, June 19–24, Amsterdam, The Netherlands: Elsevier B.V. pp 531–551.
- Van der Molen JM, Garty J, Aardema BW, Krumbein WE. 1980. Growth control of algae and cyanobacteria on historical monuments by a mobile UV unit (MUVU). *Stud Conserv* 25:71–77.
- Videla HA, Guiamet PS, Gomez de Saravia SG. 2000. Biodeterioration of Mayan archaeological sites at the Yucatan Peninsula, Mexico. *Int Biodeterior Biodegradation* 45:335–341.
- Warren-Rhodes KA, Rhodes KL, Pointing SB, Ewing SA, Lacap DC, Gómez-Silva B, Amundson R, Friedmann EI, McKay CP. 2006. Hypolithic cyanobacteria, dry limit of photosynthesis, and microbial ecology in the hyperarid Atacama Desert. *Microb Ecol* 52:389–398.
- Warscheid Th, Braams JM. 2000. Biodeterioration of stone: a review. *Int Biodeterior Biodegradation* 46:343–368.
- Young ME. 1997. Biological growths and their relationship to the physical and chemical characteristics of sandstones before and after cleaning. PhD Thesis. The Robert Gordon University, Aberdeen, UK.
- Zanardini E, Abbruscato P, Ghedini N, Realini M, Sorlini C. (2000) Influence of atmospheric pollutants on the biodeterioration of stone. *Int Biodeterior Biodegrad* 45:35–42.