



**ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ
ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΚΡΗΤΗΣ**

**ΣΧΟΛΗ
ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ**

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«ΜΕΛΕΤΗ ΜΙΑΣ ΒΑΚΤΗΡΙΩΣΗΣ ΤΗΣ ΚΑΡΠΟΥΖΙΑΣ»

**ΣΠΟΥΔΑΣΤΡΙΑ: ΚΟΓΚΑΚΗ ΕΥΣΤΑΘΙΑ
ΕΙΣΗΓΗΤΗΣ: Δρ. ΓΚΟΥΜΑΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ, ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ**

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2010

ΚΕΦΑΛΑΙΑ	ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	ΣΕΛΙΔΑ
	SUMMARY	3
	ΠΕΡΙΛΗΨΗ	4
	ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	5
1.	ΕΙΣΑΓΩΓΗ	5
1.1	Το φυτό <i>Citrullus lanatus</i>	5
1.2	Σημαντικότερες βακτηριολογικές και μυκητολογικές ασθένειες κολοκυνθοειδών	7
1.3	Η ασθένεια της βακτηριακής κηλίδωσης	15
1.3.1	Ιστορική αναδρομή	15
1.3.2	Το παθογόνο βακτήριο	16
1.3.3	Ξενιστές και γεωγραφική κατανομή	17
1.4	Στοιχεία επιδημιολογίας	18
1.5	Συμπτώματα και σημεία	19
1.6	Βιολογικός κύκλος	21
1.7	Πιθανές μολύνσεις από το βακτήριο κατά την εμπορική παραγωγή κολοκυνθοειδών	25
1.8	Καταπολέμηση	25
1.8.1	Καταπολέμηση σε καλλιέργειες σποροπαραγωγής	26
1.8.2	Καταπολέμηση σε καλλιέργειες παραγωγής σποροφύτων	27
1.8.3	Καταπολέμηση σε εμπορικές καλλιέργειες	27
1.8.4	Ολοκληρωμένη διαχείριση της ασθένειας	28
	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	31
	Σκοπός της εργασίας	31
2.	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	32
2.1	Απομόνωση και ταυτοποίηση του παθογόνου	32
2.2	Δοκιμές παθογένειας	34
3.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	36
3.1	Περιγραφή των συμπτωμάτων της ασθένειας	36

3.2	Απομόνωση και ταυτοποίηση του παθογόνου	36
3.3	Δοκιμές παθογένειας	37
3.3.1	Αντιδράσεις υπερευαισθησίας (HR) σε φυτά καπνού	37
3.3.2	Τεχνητές μολύνσεις σε σπορόφυτα και ανεπτυγμένα φυτά καρπουζιάς	37
3.3.3	Τεχνητές μολύνσεις σε λοβούς φασολιάς	37
3.3.4	Τεχνητές μολύνσεις σε ώριμους και άωρους καρπούς καρπουζιάς και σε καρπούς κολοκυθιάς και αγγουριάς	38
4.	ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	41
	Βιβλιογραφία	42
	Παράρτημα: Φωτογραφικό υλικό	44

SUMMARY

The following study is composed of two parts, the theory part and the experimental one. The theory part contains a short report of the most important bacterial and mycological diseases on Cucurbitaceae. More comprehensive reporting is focused on a new disease called Bacterial Fruit Blotch (BFB) which is caused by the pathogen *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. The most susceptible hosts are watermelons (*Citrullus lanatus*) and melons (*Cucumis melo*) which develop symptoms on fruit and leaves. During the experimental part, we are investigating the epidemiology and the contributing factors of the disease's development. From the diseased cotyledons and first leaves of watermelon (*Citrullus lanatus*), bacterial strains were isolated and subjected to a series of morphological, physiological and biochemical tests in order to identify the pathogen. Inoculations of healthy watermelon fruits, bean pots, potato tubers, marrow fruits and cucumber fruits with the isolated bacterial strains were performed repeatedly, in order to determine its pathogenicity. In conclusion, the pathogen was designated as the bacterial *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η πτυχιακή μελέτη αποτελείται από δυο μέρη, το θεωρητικό και το πειραματικό. Το θεωρητικό μέρος περιλαμβάνει μια σύντομη αναφορά των σημαντικότερων βακτηριολογικών και μυκητολογικών ασθενειών των κολοκυνθοειδών, ενώ γίνεται εκτενέστερη αναφορά στο παθογόνο βακτήριο *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* και στην ασθένεια της βακτηριακής κηλίδωσης των καρπών της καρπουζιάς (Bacterial Fruit Blotch) που προκαλεί. Ο κυριότερος ξενιστής του είναι το καρπούζι και αναφέρεται γι' αυτό μια σύντομη περιγραφή. Το πειραματικό τμήμα της εργασίας περιλαμβάνει την εργαστηριακή διαδικασία προσδιορισμού του παθογόνου αιτίου μιας ασθένειας σε σπορόφυτα καρπουζιάς. Κατά τη διάρκεια της μελέτης έγινε απομόνωση και ταυτοποίηση του παθογόνου αιτίου, καθώς και έλεγχος της παθογένειας των απομονωθέντων βακτηριακών στελεχών. Η ταυτοποίηση του αιτίου της ασθένειας έγινε με βάση τα μορφολογικά, φυσιολογικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά τους. Ο έλεγχος της παθογένειας πραγματοποιήθηκε με τεχνητές μολύνσεις σποροφύτων και καρπών καρπουζιάς, λοβών φασολιάς, κονδύλων πατάτας και καρπών κολοκυθιάς και αγγουριάς. Ως παθογόνο αίτιο προσδιορίστηκε το φυτοπαθογόνο βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*.

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ****1.1 Το φυτό *Citrullus lanatus***

Επιστημονική ταξινόμηση	
Βασίλειο:	<u>Plantae</u>
Υποδιαίρεση:	<u>Magnoliophyta</u>
Κλάση:	<u>Magnoliopsida</u>
Τάξη:	<u>Cucurbitales</u>
Οικογένεια:	<u>Cucurbitaceae</u>
Γένος:	<u>Citrullus</u>
Είδος:	<i>Citrullus lanatus</i>
Κοινή ονομασία:	<i>Citrullus lanatus</i>

Το φυτό της καρπουζιάς ανήκει στην τάξη Cucurbitales της οικογένειας Cucurbitaceae (κολοκυνθοειδή) και προέρχεται από την Νότια Αφρική. Το καρπούζι αναπτύσσεται σε θερμά κλίματα και σε ελαφρά, καλά στραγγιζόμενα, γόνιμα εδάφη με ελαφρώς όξινο pH. Παρουσιάζει μεγάλη ευαισθησία σε ασθένειες του εδάφους και δεν μπορεί να καλλιεργηθεί για συνεχόμενα έτη στο ίδιο χωράφι. Αυτό δημιουργεί πολλά προβλήματα διότι δεν υπάρχουν πολλές εκτάσεις κατάλληλες, ιδιαίτερα για πρώιμη παραγωγή. Το πρόβλημα αυτό αντιμετωπίζεται τα τελευταία χρόνια με τον εμβολιασμό του καρπουζιού πάνω σε φυτό κολοκυθιάς. Έτσι το υποκείμενο είναι από κολοκύθι, το οποίο αντέχει στις ασθένειες του εδάφους, και το εμβόλιο η επιθυμητή ποικιλία καρπουζιού. Με την τεχνική αυτή το ίδιο χωράφι καλλιεργείται για πολλά χρόνια με φυτά καρπουζιάς χωρίς να είναι απαραίτητη η χρήση μεγάλων ποσοτήτων φυτοφαρμάκων για την προστασία του.

Τα πρώιμα καρπούζια καλλιεργούνται σε θερμοκήπια είτε χαμηλού είτε υψηλού τύπου. Σε μερικές περιπτώσεις μετά την αφαίρεση του πλαστικού της χαμηλής κάλυψης τα φυτά σκεπάζονται με αντιανεμικά δίχτυα τα οποία τα προστατεύουν από δυνατούς ανοιξιάτικους ανέμους.

Το καρπούζι ως προς τα χαρακτηριστικά του έχει μεγάλο μέγεθος και το σχήμα του είναι σφαιρικό ή ωοειδές. Είναι λείο εξωτερικά με σκούρες και ανοικτές πράσινες ρίγες, ο φλοιός του είναι αρκετά σκληρός με πάχος περίπου ένα εκατοστό και άσπρο χρώμα στο εσωτερικό του. Το κύριο εσωτερικό μέρος του καρπουζιού είναι η μαλακή, χυμώδης, κόκκινου χρώματος σάρκα που περιέχει μεγάλο αριθμό μαύρων ή και άσπρων σπόρων και μεγάλες ποσότητες νερού (90%). Στην Ελλάδα ωριμάζει το καλοκαίρι και είναι ένα από τα πιο δροσιστικά καλοκαιρινά φρούτα, ιδανικό για κατανάλωση σε φέτες ή σε φρουτοσαλάτες.

Έπειτα από χημική ανάλυση έχει αποδειχθεί ότι το καρπούζι είναι πλούσιο σε βιταμίνες Α, θειαμίνη, Β6, C, λυκοπένιο, κάλιο και φυτικές ίνες. Καλό θα είναι να τρώγεται ώριμο, διαφορετικά παρέχει ελάχιστα από τα παραπάνω διατροφικά στοιχεία. Η περιεκτικότητά του σε σάκχαρα και θερμίδες είναι χαμηλή ενώ δεν περιέχει καθόλου λίπη ή χοληστερόλη. Τα χαρακτηριστικά αυτά του καρπουζιού το καθιστούν ιδιαίτερα ωφέλιμο για την υγεία του ανθρώπου.

Αναλυτικότερα το καρπούζι είναι μια εξαιρετική πηγή αντιοξειδωτικών ουσιών καθώς περιέχει μεγάλες ποσότητες βιταμίνης C, καροτίνης Β αλλά και βιοτίνης, συμβάλλοντας έτσι στην προστασία του οργανισμού από διάφορους τύπους καρκίνου. Επιπλέον, αποτελεί πλούσια πηγή κιτροουλίνης, ενός αμινοξέος, το οποίο μπορεί να μετατραπεί από ένζυμα του οργανισμού μας σε αργινίνη, βασικό αμινοξύ για τον άνθρωπο, διαδραματίζοντας έτσι ουσιαστικό ρόλο στις καρδιαγγειακές και ανοσολογικές λειτουργίες.

Ακόμη, περιέχει βιταμίνη Α, η οποία είναι σημαντική για την υγεία των ματιών, τη νυκτερινή όραση και την αποτελεσματικότερη άμυνα του οργανισμού μας, καθώς ενδυναμώνει τα λεμφοκύτταρα που καταπολεμούν τις μολύνσεις. Όσον αφορά τη βιταμίνη C, περιέχεται σε υψηλά ποσοστά βοηθώντας και αυτή με τη σειρά της το αμυντικό σύστημα του οργανισμού ενάντια στις μολύνσεις. Παράλληλα προστατεύει από το οξειδωτικό στρες και από τα προϊόντα του μεταβολισμού που επιταχύνουν τη διαδικασία της γήρανσης. Η βιταμίνη Β6 που υπάρχει στο καρπούζι, συμβάλλει στην σύνθεση των νευροδιαβιβαστών του εγκεφάλου (σεροτονίνη, μελατονίνη και ντοπαμίνη), συντελώντας έτσι στην καλύτερη πνευματική και ψυχολογική υγεία. Ακόμα, είναι πλούσιο σε κάλιο, το οποίο συμβάλλει στη ρύθμιση της καρδιακής λειτουργίας και της αρτηριακής πίεσης, διαθέτοντας διουρητική δράση. Επιπρόσθετα, είναι μια πολύ καλή πηγή φυτικών ινών οι οποίες βοηθούν στην κινητικότητα του εντέρου, δρουν εναντίον

της δυσκοιλιότητας, ενώ συμβάλλουν στην πρόληψη του καρκίνου του παχέος εντέρου, κυρίως του ορθού. Τέλος, περιέχει μια ουσία, το λυκοπένιο, η οποία θεωρείται ότι έχει αντικαρκινική δράση και έχει απασχολήσει ιδιαίτερα τους ερευνητές τα τελευταία έτη. Το λυκοπένιο είναι η χρωστική ουσία στην οποία οφείλεται το κόκκινο χρώμα ορισμένων φρούτων και λαχανικών. Αυτό έχει ισχυρές αντιοξειδωτικές δράσεις, ενώ είναι βιολογικά περισσότερο ενεργό και διαθέσιμο για τον οργανισμό μας σε σύγκριση με εκείνο που περιέχεται στη ντομάτα (το πιο γνωστό εκπρόσωπο του λυκοπενίου). Πιο συγκεκριμένα, το λυκοπένιο εξουδετερώνει τις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου που σχηματίζονται κατά τη διάρκεια του κυτταρικού μεταβολισμού. Η δράση του γίνεται αισθητή κυρίως σε περιστατικά ενάντια στον κίνδυνο του καρκίνου του προστάτη, παρουσιάζοντας συγχρόνως, ευεργετικές δράσεις στο καρδιαγγειακό σύστημα.


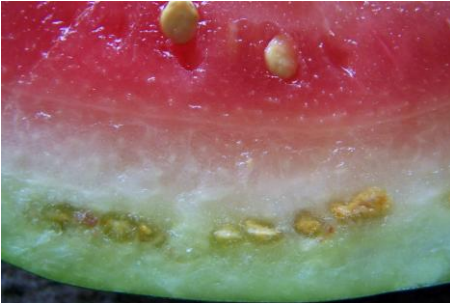
Επομένως, συμπεραίνουμε ότι το καρπούζι είναι μια αξιοσημείωτη πηγή ωφέλιμων και θρεπτικών ουσιών με σημαντικές προστατευτικές και ευεργετικές δράσεις για την υγεία μας και όχι μόνο. Στην αρχαιότητα είχε και καλλυντικές ιδιότητες, τις οποίες χρησιμοποιούμε ακόμα και σήμερα με τις μάσκες προσώπου που γίνονται με φλούδες καρπουζιού.




1.2 Σημαντικότερες βακτηριολογικές και μυκητολογικές ασθένειες των κολοκυνθοειδών

Στους παρακάτω πίνακες αναφέρονται οι σημαντικότερες βακτηριολογικές (Πίνακας 1) και μυκητολογικές (Πίνακας 2) ασθένειες που προσβάλλουν τα κολοκυνθοειδή.


Πίνακας 1. Σημαντικότερες βακτηριολογικές ασθένειες των Κολοκυνθοειδών.



Ασθένειες/ Παθογόνο/ Ξενιστής	Συμπτώματα	Στοιχεία βιολογίας	Τεχνική αντιμετώπισης
<p>1.Γωνιώδης κηλίδωση <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>lachrymans</i> (Αγγουριά, πεπονιά, κολοκυθιά, καρπουζιά)</p> 	<p>Φύλλα: Γωνιώδεις, υδατώδεις, χλωρωτικές ή νεκρωτικές, κηλίδες περιορισμένες μεταξύ των νευρώσεων. Στην καρπουζιά και την κολοκυθιά περιβάλλονται από χλωρωτικό δακτύλιο.</p> <p>Μίσχοι: Μικρές, υδατώδεις κηλίδες.</p> <p>Στέλεχος-καρπός: Μικρές, κυκλικές, υδατώδεις, βυθισμένες κηλίδες, χρώματος ανοικτού πράσινου μέχρι ελαφρώς χλωρωτικού.</p>	<p>Συνθήκες: Υψηλή σχετική υγρασία, θερμοκρασία 25-27°C.</p> <p>Επιβίωση/Διασπορά: Σπόρος, έδαφος, φυτικά υπολείμματα, νερό, εργαλεία, έντομα.</p> <p>Εύρος ξενιστών: Περιορισμένο (κολοκυνθοειδή).</p>	<ul style="list-style-type: none"> * Χρήση υγιούς σπόρου και σπορόφυτων. * Επιλογή ανθεκτικών ή ανεκτικών υβριδίων στη γωνιώδη κηλίδωση. * Αποφυγή καλλιεργητικών εργασιών όταν τα φυτά είναι υγρά. * Περιορισμός της υγρασίας και βελτίωση του αερισμού στο θερμοκήπιο. * Ισορροπημένη λίπανση- αποφυγή υπερβολικών αζωτούχων λιπάνσεων.
<p>2.Βακτηριακή κηλίδωση <i>Pseudomonas viridiflava</i> (Αγγουριά, πεπονιά)</p> 	<p>Φύλλα: Υδαρείς, χλωρωτικές ή νεκρωτικές κηλίδες και εκτεταμένα νεκρωτικά τμήματα συνήθως στις άκρες του ελάσματος. Νέκρωση του ελάσματος και του μίσχου.</p> <p>Στέλεχος: Σε έντονη προσβολή σήψη.</p>	<p>Συνθήκες: Υψηλή σχετική υγρασία, διατήρηση σταγόνων νερού στο φύλλωμα για μεγάλο χρονικό διάστημα, θερμοκρασία 10-25°C.</p> <p>Επιβίωση/Διασπορά: Φυτικά υπολείμματα, νερό, εργαλεία, ζιζάνια.</p> <p>Εύρος ξενιστών: Μεγάλο, επιφυτική επιβίωση.</p>	



<p><u>3.Βακτηριακή σήψη & μετασυλλεκτικές σήψεις</u> <i>Erwinia carotovora ssp. carotovora, E. chrysanthemi, Pseudomonas sp.</i> (Κολοκυνθοειδή)</p> 	<p><u>Φύλλα:</u> Κιτρίνισμα, μάρανση, νέκρωση, σήψη.</p> <p><u>Στέλεχος:</u> Κίτρινος/καστανός μεταχρωματισμός αγγείων, μάρανση, σήψη, νέκρωση.</p> <p><u>Ρίζες:</u> Μεταχρωματισμός αγγείων, σήψη.</p> <p><u>Καρπός:</u> Σήψη.</p>	<p><u>Συνθήκες:</u> Υψηλή σχετική υγρασία, θερμοκρασία 10-30°C.</p> <p><u>Επιβίωση/Διασπορά:</u> Φυτικά υπολείμματα, νερό, εργαλεία, ζιζάνια.</p> <p><u>Εύρος ξενιστών:</u> Πολύ μεγάλο.</p>	<ul style="list-style-type: none"> * Καταστροφή των μολυσμένων φυτών και των υπολειμμάτων της καλλιέργειας. * Συστηματική καταστροφή των ζιζανίων μέσα και γύρω από την καλλιέργεια. * Εφαρμογή αμειψισποράς 1-2 χρόνων. * Ψεκασμοί με χαλκούχα σκευάσματα σε συνδυασμό με mancozeb, ιδιαίτερα κατά τις περιόδους παρατεταμένης υγρασίας.
<p><u>4.Βακτηριακή νέκρωση του φλοιού του καρπουζιού</u> <i>Pantoea ananatis</i> (Καρπουζιά, πεπονιά)</p> 	<p><u>Καρπός:</u> Πολυάριθμες υδατώδεις κηλίδες με κίτρινο/καστανό κέντρο, φελλώδους δομής. Νεκρώσεις κατά θέσεις στην περιοχή του φλοιού οι οποίες γίνονται αντιληπτές μετά την κοπή του καρπού.</p>	<p>Δεν έχει μελετηθεί. Ορισμένα υβρίδια είναι πιο ευπαθή.</p>	<ul style="list-style-type: none"> * Απολύμανση μέσω και εργαλείων (απολύμανση των εργαλείων γίνεται με εμβάπτιση σε οινόπνευμα ή σε διάλυμα φορμόλης 5 % σε νερό ή σε χλωρίνη εμπορίου αραιωμένη κατά 10 φορές).



<p>5.Βακτηριακή κηλίδωση <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> (Πεπονιά, καρπουζιά)</p> 	<p>Φύλλα: Χλωρωτικές, νεκρωτικές κηλίδες ή νεκρωτικά τμήματα με έντονο χλωρωτικό δακτύλιο.</p> <p>Στέλεχος-καρπός: Νέκρωση, ξήρανση.</p>	<p>Συνθήκες: Υψηλή σχετική υγρασία, αρχικό μόλυσμα από άλλες καλλιέργειες.</p> <p>Επιβίωση/Διασπορά: Φυτικά υπολείμματα, εργαλεία, ζιζάνια. Αναπτύσσεται επιφυτικά σε μεγάλο αριθμό φυτών.</p> <p>Εύρος ξενιστών: Πολύ μεγάλο.</p>	<p>* Απολύμανση εδάφους.</p> <p>* Ηλιοαπολύμανση.</p> <p>Βιολογική αντιμετώπιση: Δεν πραγματοποιείται.</p> <p>Ανθεκτικές ποικιλίες: Δεν υπάρχουν για τα περισσότερα είδη.</p>
<p>6.Καρκίνος <i>Agrobacterium tumefaciens</i></p> 	<p>Ρίζες: Ογκίδια και όγκοι.</p>	<p>Επιβίωση/Διασπορά: Έδαφος, φυτικά υπολείμματα, εργαλεία, νερό, ζιζάνια.</p> <p>Εύρος ξενιστών: Πολύ μεγάλο.</p>	<p>Χημική αντιμετώπιση: Τα χαλκούχα σκευάσματα χρησιμοποιούνται στην αναλογία που συνιστά ο παρασκευαστής. Χρήσιμος ο συνδυασμός με mancozeb.</p>
<p>7.Ριζομανία <i>Agrobacterium rhizogenes</i></p> 	<p>Ρίζες: Υπερβολική ανάπτυξη του ριζικού συστήματος με μορφή θυσάνου (πολλές και λεπτές).</p>	<p>Επιβίωση/Διασπορά: Έδαφος, φυτικά υπολείμματα, εργαλεία, ζιζάνια.</p> <p>Εύρος ξενιστών: Πολύ μεγάλο.</p>	

Πίνακας 2. Σημαντικότερες μυκητολογικές ασθένειες των Κολοκυνθοειδών.

Ασθένειες/ Παθογόνο/ Ξενιστής	Συμπτώματα	Στοιχεία βιολογίας	Τεχνική αντιμετώπισης
<p>1.Ανθράκωση <i>Colletotrichum lagenarium</i> (Πεπόνι, καρπούζι, αγγούρι, κολοκύθι)</p> 	<p>Φύλλα: Καστανές προς μαύρες κηλίδες με ακανόνιστα περιθώρια, περιορίζονται συχνά στα νεύρα των φύλλων. Τα αναπτυσσόμενα φύλλα παρουσιάζουν παραμορφώσεις και εφ' όσον πολλές κηλίδες συνενωθούν, ολόκληρο το έλασμα καταστρέφεται.</p> <p>Στελέχη και μίσχοι: Επιμήκειες, καστανές, βυθισμένες κηλίδες που όταν περιβάλλουν το βλαστό προκαλούν την αποξήρανση του.</p> <p>Καρποί: Κυκλικές, βυθισμένες, μαύρες κηλίδες.</p>	<p>Διαχειμάζει στα υπολείμματα της καλλιέργειας. Η διασπορά των κωνιδίων μπορεί να γίνει με το σπόρο ή με σταγόνες βροχής, με τον άνεμο και με μηχανικά μέσα κτλ. Η καλύτερη θερμοκρασία για τη βλάστηση των σπορίων και την ανάπτυξη του μύκητα είναι 22-27°C.</p>	<ul style="list-style-type: none"> * Βαθύ όργωμα ώστε να ενσωματωθούν στο έδαφος τα υπολείμματα μετά τη συγκομιδή και καταστροφή αυτών. * Χρήση μυκητοκτόνων (διθειοκαρβαμδικά ή βενζιμιδαζολικά). * Χρήση σπόρου απαλλαγμένου από μύκητες. * Αμειψισπορά 2-3 ετών.

<p><u>2.Μαύρη σήψη ή Κομμίωση στελέχους</u> <i>Didymella bryoniae</i> = <i>Phoma cucubitarum</i> (Καρπούζι, πεπόνι, αγγούρι)</p> 	<p><u>Φύλλα:</u> Μεγάλες, ακανόνιστες, αρχικά υδατώδεις και στη συνέχεια καστανές, νεκρωτικές κηλίδες, στο κέντρο των οποίων εμφανίζονται οι καρποφορίες του παθογόνου.</p> <p><u>Μίσχοι:</u> Έλκη καστανού χρώματος.</p> <p><u>Καρποί:</u> Αρχικά παρατηρείται μαλακή, υγρή, γκριζοπράσινη σήψη, η οποία στη συνέχεια γίνεται μαύρη, καθώς σχηματίζονται τα πυκνίδια και τα περιθήκια του παθογόνου.</p>	<p>Επιβιώνει στα υπολείμματα της καλλιέργειας, στο έδαφος, στα στελέχη και πιθανόν μέσα ή πάνω στον σπόρο. Η διασπορά μπορεί να γίνει με το σπόρο και με σταγόνες βροχής. Η άριστη θερμοκρασία για την ανάπτυξη του μύκητα και της ασθένειας είναι 23-25°C.</p>	<ul style="list-style-type: none"> * Χρήση ανθεκτικών σπόρων. * Χρήση μυκητοκτόνων (βενζιμιδαζολικά, mancozeb κ.ά). * Λήψη μέτρων υγιεινής στις καλλιέργειες και στα θερμοκήπια.
<p><u>3.Περονόσπορος</u> <i>Pseudoperonospora cubensis</i> (Καρπούζι, πεπόνι, κολοκύθι, αγγούρι)</p> 	<p><u>Φύλλα:</u> Μικρές, γωνιώδεις, κίτρινες κηλίδες στην πάνω επιφάνεια του φύλλου όπου γίνονται καστανές και νεκρωτικές. Στην κάτω επιφάνεια των φύλλων, με συνθήκες υψηλής σχετικής υγρασίας, σχηματίζονται οι εξανθήσεις του μύκητα (κονιδιοφόροι και κονίδια) που αρχικά έχουν χρώμα υπόλευκο και όταν ωριμάσουν τα κονίδια γίνονται σχεδόν μαύρες.</p>	<p>Στις θερμές περιοχές ο μύκητας διατηρείται όλο το έτος επί των διαφόρων ξενιστών του. Στις ψυχρές περιοχές διατηρείται σε φυτά στα θερμοκήπια ή οι νέες μολύνσεις γίνονται από τα κονίδια που μεταφέρονται με τον άνεμο από νότιες περιοχές. Η διασπορά στον αγρό μπορεί να γίνει με τον άνεμο, με την κίνηση του αέρα, με τις σταγόνες της βροχής, με μηχανικά μέσα κτλ. Η ασθένεια ευνοείται από υγρό καιρό με θερμοκρασίες 15-25°C.</p>	<ul style="list-style-type: none"> * Χρήση ανθεκτικών ποικιλιών. * Χρήση μυκητοκτόνων (maneb, mancozeb, zineb, chlorothalonil, propineb). * Μείωση υγρασίας του περιβάλλοντος (ιδίως στα θερμοκήπια).

<p style="text-align: center;">4.Ωίδιο <i>Erysiphe cichoracearum</i>, <i>Sphaerotheca fuliginea</i>, <i>Leveillula taurica</i> (Αγγούρι, καρπούζι, κολοκύθι)</p>   <p><small>Copyright © Tom Isakeit</small></p>	<p>Φύλλα: <i>Erysiphe cichoracearum</i>, <i>Sphaerotheca fuliginea</i> : Μικρές, λευκές κηλίδες στις οποίες παρατηρούνται οι χαρακτηριστικές αλευρώδεις εξανθήσεις. Μερικές φορές επί της λευκής εξανθήσεως εμφανίζονται μικρά μαύρα στίγματα που είναι η καρποφορία της τέλειας μορφής του μύκητα (κλειστοθήκια). <i>Leveillula taurica</i> : Κίτρινες, γωνιώδεις κηλίδες. Στην κάτω επιφάνεια του ελάσματος σχηματίζεται λεπτή λευκή εξάνθηση. Σε σπάνιες περιπτώσεις παρατηρούνται μικρά μαύρα στίγματα.</p> <p>Βλαστοί και μίσχοι: <i>Erysiphe cichoracearum</i>, <i>Sphaerotheca fuliginea</i> : Αλευρώδεις εξανθήσεις.</p>	<p>Τα κονίδια διασπείρονται με τον άνεμο, καθώς και με προσβεβλημένα ζιζάνια ή υπολείμματα της καλλιέργειας. Άριστη θερμοκρασία για τις μολύνσεις είναι 25-26°C.</p>	<ul style="list-style-type: none"> * Καταστροφή ζιζανίων και υπολειμμάτων. * Χρήση ανθεκτικών ποικιλιών. * Χρήση μυκητοκτόνων (διασυστηματικά κ.ά.). Τα θειούχα φάρμακα πρέπει να χρησιμοποιούνται με προσοχή γιατί μπορεί να προκαλέσουν φυτοτοξικότητα στις καλλιέργειες. Το dinocap δεν πρέπει να χρησιμοποιείται σε θερμοκρασίες άνω των 32°C.
---	---	--	---

<p><u>5. Κηλίδωση καρπών και φύλλων (Κλαδοσπορίωση)</u> <i>Cladosporium cucumerinum</i> (Κολοκυνθοειδή)</p> 	<p><u>Φύλλα και στελέχη:</u> Υδατώδεις κηλίδες ανοικτού πράσινου χρώματος που γίνονται γωνιώδεις και γκριζόλευκες.</p> <p><u>Καρποί:</u> Στο σημείο μόλυνσης βγαίνει αρχικά μια κολλώδης ουσία. Υδαρείς κηλίδες εμφανίζονται και γίνονται γκριζές. Σχηματίζονται έλκη που περιβάλλονται από βαθύ πράσινο στρώμα που είναι οι καρποφορίες του μύκητα (κονιδιοφόροι και κονίδια). Σε έντονη προσβολή έχουμε συχνά παραμορφωμένους καρπούς.</p>	<p>Διαχειμάζει στα προσβεβλημένα φυτικά υπολείμματα, στα τοιχώματα των θερμοκηπίων και στο σπόρο. Τα σπόρια διασπείρονται με τα έντομα, τον υγρό αέρα και τα ρούχα των εργαζόμενων. Ο μύκητας αναπτύσσεται σε θερμοκρασίες 2-35°C.</p>	<ul style="list-style-type: none"> * Απολύμανση σπόρου με thiram ή captam. * Μείωση υγρασίας εδάφους και αέρος. * Αμειψισπορά 2-3 ετών. * Καταστροφή των υπολειμμάτων της καλλιέργειας. * Χρήση ανθεκτικών ποικιλιών. * Ψεκασμοί με διθειοκαρβαμιδικά κ.ά.
<p><u>6.Τεφρά σήψη ή βοτρυτής</u> <i>Botrytis cinerea</i> (Κολοκυνθοειδή)</p> 	<p><u>Φύλλα:</u> Πρασινοκαστανές μέχρι ανοικτές καστανές κηλίδες. Σε μεγάλες προσβολές όλο το φύλλο ξηραίνεται και η προσβολή μέσω του μίσχου φθάνει στο στέλεχος.</p> <p><u>Στελέχη και καρποί:</u> Μαλακοί, υδαρείς καρποί που καλύπτονται από άφθονη εξάνθηση των καρποφοριών του παθογόνου. Στα στελέχη εμφανίζονται έλκη. Τα έλκη συχνά καλύπτονται από την πυκνή, χαρακτηριστική τεφρά εξάνθηση του παρασίτου.</p>	<p>Επιβιώνει σαπροφυτικά στα προσβεβλημένα καλλιεργούμενα και αυτοφυή φυτά, στους ιστούς και με τα σκληρώτια του. Άριστη θερμοκρασία για την ανάπτυξη του μύκητα είναι 18-23°C.</p>	<ul style="list-style-type: none"> * Μείωση της υγρασίας. * Τήρηση καλής υγιεινής στις φυτείες. * Χημική και συνδυασμένη καταπολέμηση.

1.3 Η ασθένεια της Βακτηριακής Κηλίδωσης των καρπών της καρπουζιάς

ΑΣΘΕΝΕΙΑ: *Bacterial fruit blotch of cucurbits.*

ΠΑΘΟΓΟΝΟ: *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. (= *Pseudomonas pseudoalcaligenes* subsp. *citrulli*, *Pseudomonas avenae* subsp. *citrulli*).

ΞΕΝΙΣΤΕΣ: Καρπούζι, πεπόνι, αγγούρι, κολοκύθι, πεπόνι-κίτρο και άλλα κολοκυνθοειδή.

1.3.1 Ιστορική αναδρομή

Η βακτηριακή κηλίδωση των καρπών (BFB) είναι μια σημαντική ασθένεια που προσβάλλει κυρίως το καρπούζι και λιγότερο άλλα κολοκυνθοειδή (πεπόνι, αγγούρι, κολοκύθι κ.ά.). Η ασθένεια παρατηρήθηκε αρχικά το 1965 στις ΗΠΑ σε φυτά καρπουζιάς και προκάλεσε συμπτώματα κηλιδώσεων σε σπορόφυτα. Πιστεύεται ότι η ασθένεια προκλήθηκε από μολυσμένους σπόρους. Μέχρι το 1988, συμπτώματα της ασθένειας παρατηρήθηκαν σε επιχειρηματική καλλιέργεια καρπουζιάς στα νησιά Μαριάννα (Βόρειος Ειρηνικός Ωκεανός). Το 1989 παρατηρήθηκαν συμπτώματα της ασθένειας στην περιοχή της Φλόριντα. Η αιτία της αρχικής μόλυνσης ήταν ο προσβεβλημένος από το βακτήριο, σπόρος. Μεταξύ 1990-1995, συμπτώματα της ασθένειας είχαν εμφανιστεί σποραδικά σε κολοκυνθοειδή στις σημαντικότερες πολιτείες των ΗΠΑ, με μεγάλο οικονομικό αντίκτυπο. Αργότερα η ασθένεια εξαπλώθηκε στη Φλόριντα, τη Γεωργία, τη Νότια Καρολίνα, το Τέξας, το Ντελαγουέρ και σε άλλες πολιτείες.

Στην Ελλάδα η πρώτη επίσημη ανακοίνωση διαπίστωσης προσβολής καρπών και φυτών καρπουζιάς από το φυτοπαθογόνο βακτήριο, έγινε τον Οκτώβρη του 2008 στο 14^ο Πανελλήνιο Φυτοπαθολογικό Συνέδριο που πραγματοποιήθηκε στην Αργολίδα. Νωρίτερα όμως, τον Ιούλιο του 2005, δείγματα καρπών καρπουζιάς υβριδίου F¹ Obla από την περιοχή Χρυσούπολης Καβάλας και δείγματα καρπών καρπουζιάς επίσης υβριδίου F¹ Obla προερχόμενα από την περιοχή Βαγίων Θηβών, είχαν σταλεί σε εργαστήριο τον Σεπτέμβριο του 2006, όπου διαπιστώθηκαν σ' αυτά συμπτώματα πολύ μικρών, ακανόνιστων, ελαιωδών κηλίδων και καστανών ρωγμών στην επιφάνεια τους (Χολέβα *et al.*, 2008).

1.3.2 Το παθογόνο βακτήριο

Το παθογόνο βακτήριο *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* ανήκει στην κλάση *Proteobacteria*, στην οικογένεια *Pseudomonadaceae*. Τα βακτήρια του γένους *Acidovorax* είναι αρνητικά κατά Gram (Schaad *et al.*, 1978; Willems *et al.*, 1992), αερόβια, ραβδόμορφα, με διαστάσεις κατά μέσο όρο 0.5 x 1.7 μm, κινούμενα με ένα πολικό μαστίγιο. Είναι θετικά στην οξειδάση και αναπτύσσονται σε θερμοκρασία 4-41°C. Αναπτύσσονται σε διάφορα θρεπτικά υποστρώματα τα οποία είναι κατάλληλα για βακτήρια. Μετά από 48 ώρες ανάπτυξης στο θρεπτικό υπόστρωμα King's B παράγουν επίπεδες, στρογγυλές, υπόλευκου χρώματος, μη φθορίζουσες αποικίες (Εικόνα 1).



Εικόνα 1. Στρογγυλές, υπόλευκες αποικίες του *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* μετά από 48 ώρες ανάπτυξης σε υπόστρωμα King's B. (Φώτο: Walcott, 2005).

Το βακτήριο αρχικά ταξινομήθηκε ως *Pseudomonas pseudoalcaligenes* subsp. *citrulli* (Somodi *et al.*, 1991), και επαναταξινομήθηκε στο γένος *Acidovorax* (Willems *et al.*, 1990), βάση διαφόρων φαινοτυπικών αναλύσεων.

Αρχικά, αναφέρθηκε ότι το παθογόνο βακτήριο προκάλεσε κηλίδες σε σπορόφυτα, αλλά όχι σήψη σε καρπούς. Επιπρόσθετα, στελέχη του βακτηρίου που απομονώθηκαν από φυτά στο Γεωργικό Πειραματικό Σταθμό στη Γεωργία δεν έδωσαν αντίδραση υπερευαισθησίας σε φύλλα καπνού. Σε αντίθεση, στελέχη τα οποία προήλθαν από εμπορική παραγωγή καρπουζιάς και εμφάνισαν τα πρώτα συμπτώματα της βακτηριακής κηλίδωσης των καρπών το 1989, ήταν θετικά στην αντίδραση υπερευαισθησίας και προκάλεσαν σήψη σε καρπούς. Μια πιθανή εξήγηση γι' αυτήν την ασυμφωνία είναι οι διαφορές μεταξύ των πληθυσμών του

βακτηρίου. Αυτό οδήγησε σε σύγχυση σχετικά με το παθογόνο αίτιο που προκαλεί την βακτηρίωση. Μοριακές αναλύσεις αργότερα, απέδειξαν ότι υπάρχουν δυο ξεχωριστές υπό-ομάδες παθογόνων βακτηρίων (Walcott, Fessehaie & Castro, 2004). Τα στελέχη της ομάδας II παρουσιάζουν υψηλή μολυσματικότητα στο καρπούζι και μέτρια μολυσματικότητα σε άλλα κολοκυνθοειδή, ενώ περιέχουν στελέχη τα οποία προκάλεσαν τα αρχικά μολύσματα της βακτηρίωσης. Αντίθετα, τα στελέχη της ομάδας I παρουσιάζουν μέτρια έως ήπια μολυσματικότητα σ' ένα ευρύ φάσμα κολοκυνθοειδών και περιέχουν στελέχη του βακτηρίου που απομονώθηκαν από φυτά στο Γεωργικό Πειραματικό Σταθμό στη Γεωργία. Μέχρι σήμερα, υπάρχουν ακόμα πολλά τα οποία παραμένουν άγνωστα σχετικά με τη βιολογία του *A. avenae* subsp. *citrulli*.

1.3.3 Ξενιστές και γεωγραφική κατανομή

Πριν από το τέλος της δεκαετίας του '90, η εμφάνιση της ασθένειας αναφέρθηκε αρχικά στο καρπούζι σε όλες τις κεντρικές, ανατολικές και νοτιοανατολικές πολιτείες των ΗΠΑ συμπεριλαμβανομένων της Φλόριντας, του Τέξας, της Γεωργίας, της νότιας Καρολίνα, της βόρειας Καρολίνα, του Ιλλινόι, της Αϊόβα, του Μισσούρι, του Ντελαγουέρ, του Ορεγκον και της Οκλαχόμα (Black *et al.*, 1994; Hamm *et al.*, 1997; Jacobs, Damicone & McCraw, 1992; Latin & Rane, 1990; Somodi *et al.*, 1991). Γενικά, η ασθένεια περιορίστηκε σε περιοχές με υψηλή θερμοκρασία και υγρασία και δεν παρατηρήθηκε στις πιο δροσερές και ξηρές περιοχές συμπεριλαμβανομένης της Καλιφόρνιας. Η ασθένεια έχει αναφερθεί: στις ΗΠΑ σε κολοκύθι, σε πεπόνι και σε αγγούρι (Isakeit *et al.*, 1997; Isakeit, Black & Jones, 1998; Langston *et al.*, 1999; Walcott *et al.*, 2000), στον Καναδά στο καρπούζι, στην Αυστραλία στο καρπούζι, στο πεπόνι και στο αγγούρι (Martin & Horlock, 2002; Martin & O' Brien, 1999; O' Brien & Martin, 1999), στο Μεξικό, την Ονδούρα, τη Βραζιλία, τη Νικαράγουα και την Κόστα Ρίκα στο καρπούζι και το πεπόνι (Assis *et al.*, 1999; Macagnan *et al.*, 2003; Mora-Umana & Araya, 2002; Munoz & Monterroso, 2002), στην Ταϊβάν στο πεπόνι και στο καρπούζι (Macagnan *et al.*, 2003), στην Τουρκία στο καρπούζι (Demir, 1996; Mirik *et al.*, 2006), στο Ισραήλ στο καρπούζι και στο πεπόνι (Burdman *et al.*, 2005), στην Ιαπωνία στο καρπούζι (Shirakawa *et al.*, 2000), στην Ταϊλάνδη στο καρπούζι και στην Κίνα (Xinjiang, Neimenggu, Fujian, Jilin) στο πεπόνι τύπου Hami και στο

καρπούζι (Cai *et al.*, 2005; Fan & Ma, 2004; Jin *et al.*, 2004; Ren *et al.*, 2006; Zhao *et al.*, 2001).

Έχει αναφερθεί ότι το *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* έχει απομονωθεί από σπόρο τομάτας στο Ισραήλ και έχει προκαλέσει συμπτώματα της ασθένειας σε διάφορους ξενιστές Σολανωδών μετά από τεχνητή μόλυνση (Assouline *et al.*, 1997; Nascimento *et al.*, 2004). Το παγκόσμιο εμπόριο σπόρων κολοκυνθοειδών, πιθανότατα συμβάλλει στην εκτεταμένη εξάπλωση των στελεχών του βακτηρίου. Αυτή τη στιγμή, το γεωγραφικό κέντρο προέλευσης των στελεχών του *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* δεν είναι γνωστό.

1.4 Στοιχεία επιδημιολογίας

Η σημαντικότερη πηγή μόλυσματος για την εξέλιξη της βακτηρίωσης είναι ο μολυσμένος σπόρος. Οι σπόροι των περισσότερων, αν όχι όλων των κολοκυνθοειδών, μπορούν να υποστούν προσβολή από το παθογόνο και να μεταδώσουν την ασθένεια της βακτηριακής κηλίδωσης.

Η άμεση σπορά με τον μολυσμένο σπόρο έχει σαν αποτέλεσμα την μετάδοση και την εξάπλωση της βακτηρίωσης στα σπορόφυτα όταν οι συνθήκες του περιβάλλοντος είναι ιδανικές. Η μετάδοση της ασθένειας δηλαδή, εξαρτάται άμεσα από τις κλιματολογικές συνθήκες, όπως την υψηλή σχετική υγρασία και τις υψηλές θερμοκρασίες, καθώς και την πυκνή φύτευση. Παρ' όλα αυτά δεν έχει ακόμα εξακριβωθεί ο ακριβής μηχανισμός μετάδοσης της ασθένειας. Γνωρίζουμε όμως, ότι τα βακτήρια μετακινούνται από τους σπόρους σε φυτικούς ιστούς όπου εκεί πολλαπλασιάζονται στους μεσοκυττάριους χώρους και δημιουργούν υδαρείς κηλίδες στα φυτά. Από τις κηλίδες αυτές τα βακτήρια διασπείρονται με την άρδευση στα μεταφυτευμένα σπορόφυτα και δημιουργούν δευτερογενείς μολύνσεις, οι οποίες οδηγούν σε μαζικές μολύνσεις στα φυτάρια.

Ακόμα και όταν τα συμπτώματα της ασθένειας απουσιάζουν, οι επιφυτικοί πληθυσμοί του βακτηρίου μπορεί να προκαλέσουν συμπτώματα της ασθένειας κάτω από ιδανικές συνθήκες στον αγρό. Τα βακτήρια διασπείρονται από ανέμους, βροχές και από το νερό άρδευσης στα γειτονικά φυτά προκαλώντας έτσι υδαρείς κηλίδες που στη συνέχεια γίνονται νεκρωτικές. Τα παθογόνα διεισδύουν στις κοτυληδόνες και στα φύλλα μέσω των στοματιών και των πληγών και παραμένουν στους μεσοκυττάριους χώρους του μολυσμένου ιστού.

Όσον αφορά τις μολύνσεις στους καρπούς, τα βακτήρια προσκολλούνται πάνω στο φλοιό, δυο με τρεις εβδομάδες μετά την άνθηση και μέσω των ανοικτών στοματίων μολύνουν τους καρπούς. Μετά την περίοδο αυτή, τα στομάτια κλείνουν από την παρουσία κηρωδών ουσιών στην επιφάνεια των καρπών, εμποδίζοντας κατ' αυτό τον τρόπο την περαιτέρω είσοδο βακτηρίων. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα οι ώριμοι καρποί να μην μπορούν, γενικότερα, να προσβληθούν από φυσική μόλυνση των βακτηρίων εκτός αν υποστούν πληγές. Ακόμα, μολύνσεις σε καρπούς μπορούν να προκληθούν από μόλυσμα που προέρχεται από φυτικά υπολείμματα, φυτά-ξενιστές και ζιζάνια. Κατά τα πρώτα στάδια της ανάπτυξης των καρπών, τα συμπτώματα της ασθένειας δεν είναι ευδιάκριτα ή δεν εμφανίζονται καθόλου, αλλά παρουσιάζονται ξαφνικά κατά ή λίγο πριν την περίοδο της συγκομιδής.

1.5 Συμπτώματα και σημεία

Η βακτηρίωση έχει ένα ευρύ φάσμα ξενιστών της οικογένειας Cucurbitaceae και μπορεί να προσβάλλει τα φύλλα και τους καρπούς σε όλα τα στάδια της ανάπτυξης τους. Τα συμπτώματα που παρατηρούνται κατά τη διάρκεια της μόλυνσης στα φύλλα είναι πολύ δύσκολο να εντοπιστούν στον αγρό και συχνά συγχέονται με άλλες ασθένειες φυλλώματος πιο γνωστές και πιο διαδεδομένες.

Ένα από τα πρώτα συμπτώματα της ασθένειας στα νεαρά σπορόφυτα είναι οι υδαρείς κηλίδες ανοιχτού καφέ ως καστανοκόκκινου χρώματος στην κάτω επιφάνεια των κοτυληδόνων (Εικόνα 2) και των πρώτων πραγματικών φύλλων, οι οποίες γίνονται ορατές περίπου 5-8 μέρες μετά την φύτευση ανάλογα με τις περιβαλλοντικές συνθήκες. Οι κηλίδες αυτές αρχικά είναι υδαρείς, στη συνέχεια γίνονται νεκρωτικές και περιορίζονται κυρίως μεταξύ των δευτερευόντων νευρώσεων. Ακόμα, μπορεί να παρατηρηθούν κηλίδες και στο υποκοτύλιο προκαλώντας ενδεχομένως κατάρρευση και θάνατο των σπορόφυτων. Παρόμοια συμπτώματα μπορεί να εμφανιστούν και στο πεπόνι καθώς και σε άλλα κολοκυνθοειδή. Στα ώριμα φυτά καρπουζιάς, εμφανίζονται επιμήκεις κηλίδες στα φύλλα καστανού έως καστανοκόκκινου χρώματος, οι οποίες εξαπλώνονται κατά μήκος των νευρώσεων. Ορισμένες φορές υπάρχει πιθανότητα οι κηλίδες αυτές να είναι δυσδιάκριτες ή να μην διαφοροποιούνται από άλλες ασθένειες φυλλώματος.



Εικόνα 2. Υδαρείς κηλίδες στην κάτω επιφάνεια κοτυληδόνων σπορόφυτων. (Φωτό: Gitaitis).

Στους καρπούς η προσβολή επέρχεται κατά πρώτο λόγο κατά τη διάρκεια των 3-4 πρώτων εβδομάδων. Το βακτήριο όπως προαναφέρθηκε, εισέρχεται μέσω των στομάτων και τα συμπτώματα εμφανίζονται συνήθως κατά την ωρίμανση, λίγο πριν την συγκομιδή. Καθώς οι βακτηριακές κηλίδες αναπτύσσονται στην επιφάνεια του εξωκάρπιου, τα συμπτώματα εμφανίζονται προοδευτικά στους καρπούς με το πέρασμα του χρόνου.

Μερικά από τα συμπτώματα που μπορούμε να παρατηρήσουμε είναι τα νεκρωτικά έλκη πάνω στον καρπό (Εικόνα 3Α και 3Β), οι υδαρείς περιοχές με ακανόνιστο περιθώριο στην επιφάνεια του καρπού ενώ σε προχωρημένο στάδιο οι καρποί μπορεί να καταλήξουν σε υγρή σήψη, λόγω των δευτερευόντων μολύνσεων από άλλους οργανισμούς. Τέλος, επιφανειακές κηλίδες εξαπλώνονται με ταχύ ρυθμό και επομένως οι καρποί μπορεί να σαπίσουν στον αγρό.



Εικόνα 3Α και 3Β. Νεκρωτικά έλκη σε ώριμους καρπούς καρπουζιάς.
(Φωτό: C. Nischwitz & R. Gitaitis).

1.6 Βιολογικός κύκλος

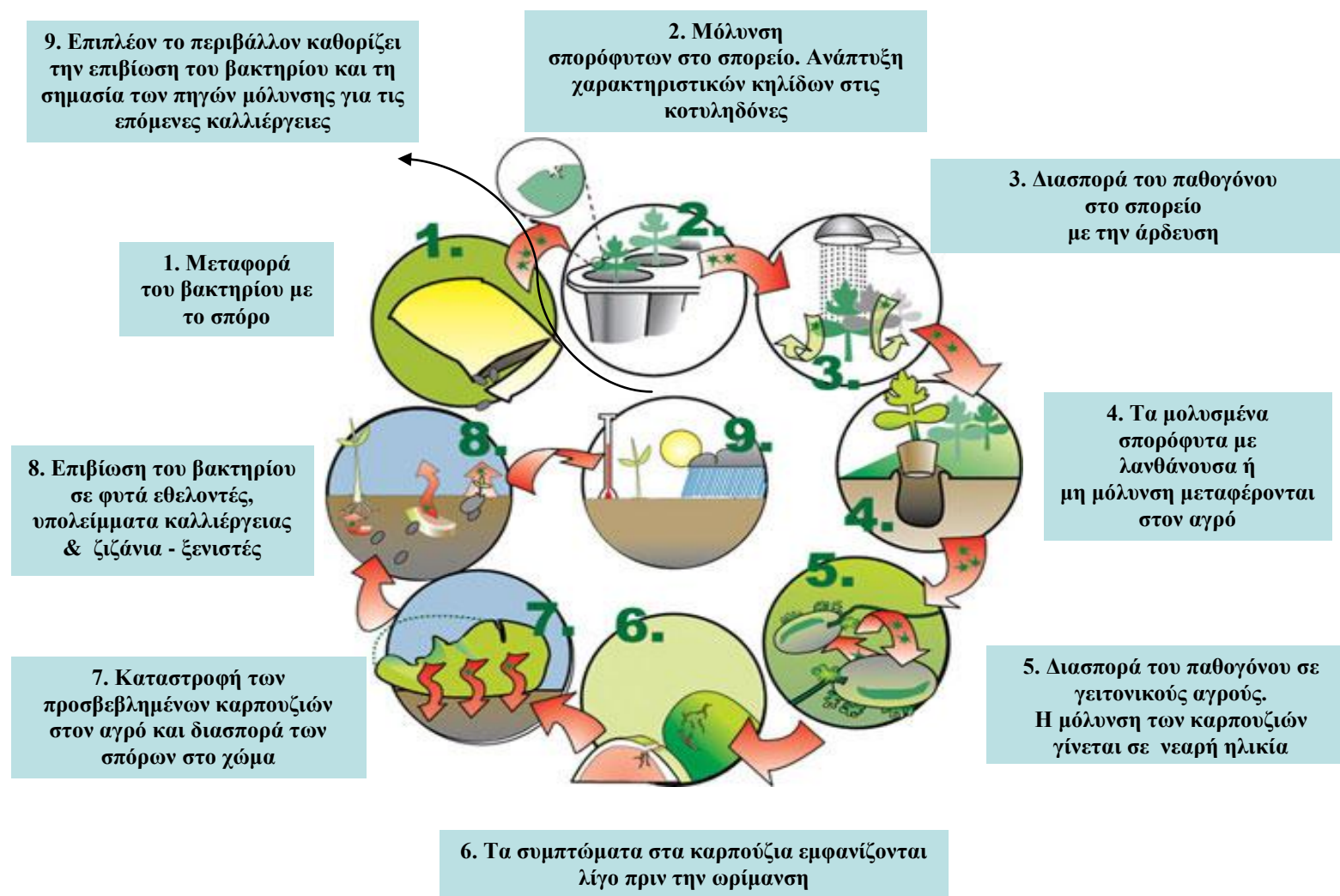
Ο βιολογικός κύκλος της βακτηριακής κηλίδωσης των καρπών της καρπουζιάς ξεκινάει από τον μολυσμένο σπόρο. Ο μολυσμένος σπόρος σπέρνεται σε πλαστικούς δίσκους μέσα στο θερμοκήπιο, όπου αυτό θεωρείται ως ένα άριστο περιβάλλον για τη διάδοση του βακτηρίου. Οι υψηλές θερμοκρασίες και η υψηλή σχετική υγρασία που επικρατούν μέσα σ' αυτό αποτελούν τις κατάλληλες προϋποθέσεις για την ανάπτυξη του. Αργότερα, με την μετακίνηση των μολυσμένων σπόρων από το θερμοκήπιο στον αγρό μπορεί να υπάρξουν σοβαρές συνέπειες.

Το παθογόνο της ασθένειας δεν μπορεί να επιβιώσει για περισσότερο από μερικές εβδομάδες κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού χωρίς ξενιστή. Τα βακτήρια μπορούν να διαχειμάσουν σε μολυσμένους φυτικούς ιστούς ή σε μολυσμένους σπόρους οι οποίοι είναι ικανοί να παράγουν φυτά-εθελοντές για την επόμενη καλλιεργητική περίοδο.

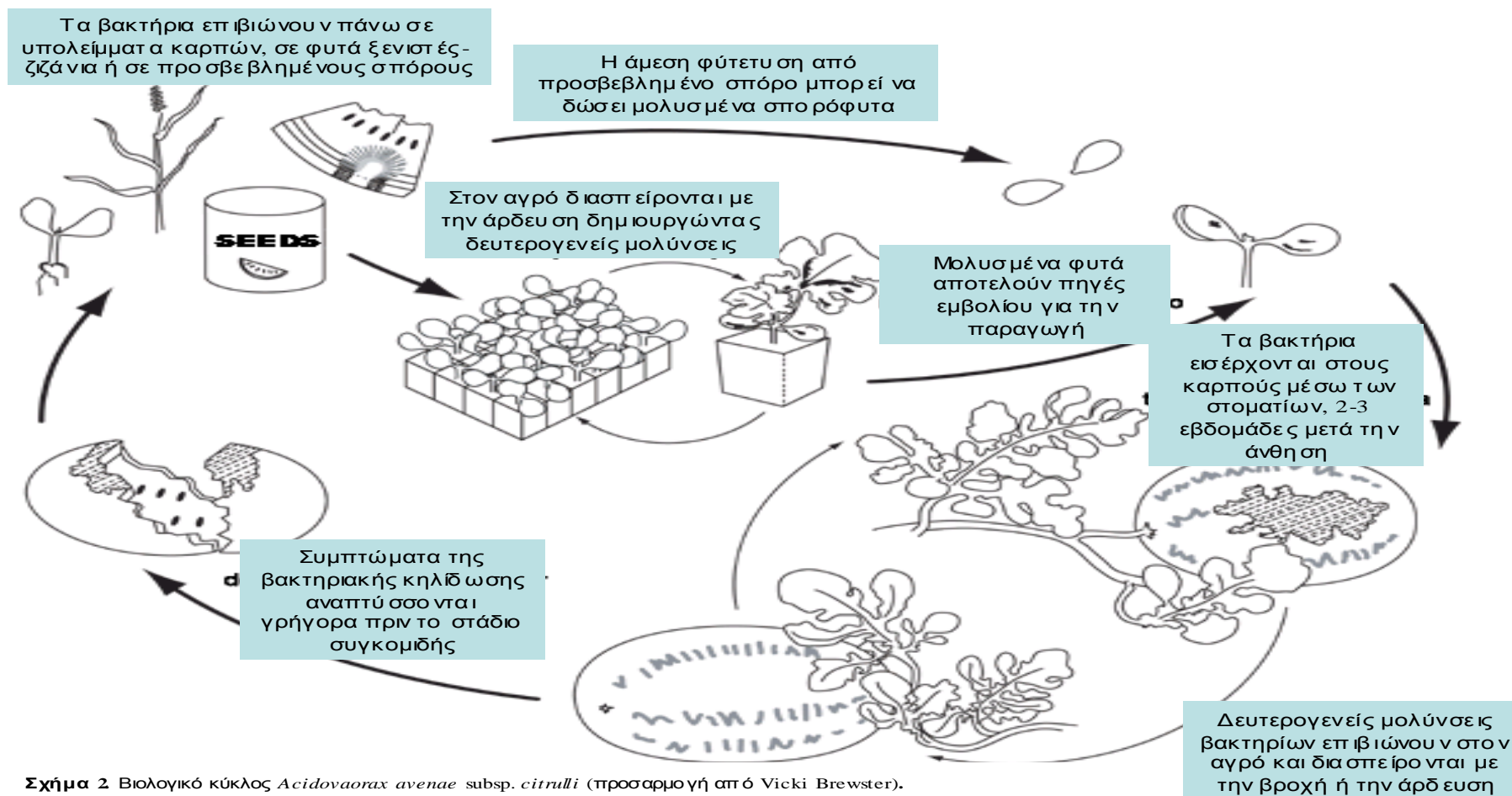
Μερικές ποικιλίες καρπουζιάς είναι πιο ευπαθείς στο βακτήριο από άλλες. Για παράδειγμα, οι ποικιλίες με σκούρο-πράσινο χρώμα στο φλοιό είναι λιγότερο ευπαθείς από ποικιλίες με ελαφρύ-πράσινο χρώμα του φλοιού. Ένα άλλο παρόμοιο παράδειγμα είναι τα τριπλοειδή καρπούζια χωρίς κουκούτσια, τα οποία είναι λιγότερο ευπαθή από τα διπλοειδή πεπόνια. Η βακτηριακή κηλίδωση καρπών έχει

αναφερθεί ότι μολύνει το πεπόνι και την τομάτα, αλλά ο προτιμότερος ξενιστής της είναι το καρπούζι.

Ο βιολογικός κύκλος της βακτηριακής κηλίδωσης παρουσιάζεται πιο αναλυτικά στα παρακάτω σχήματα 1 και 2.



Σχήμα 1. Βιολογικός κύκλος *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* (προσαρμογή από Latin, R. X., and D. Hopkins, 1995).



Σχήμα 2 Βιολογικό κύκλος *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* (προσαρμογή από Vicki Brewster).

Πειράματα που έγιναν στη Φλόριντα έδειξαν ότι τα χαλκούχα φυτοπροστατευτικά μπορούν να μειώσουν την εμφάνιση της ασθένειας, όταν εφαρμόζονται εβδομαδιαία στη συνιστώμενη δοσολογία και πριν την εμφάνιση των συμπτωμάτων. Αποτυγχάνουν όμως, να μειώσουν την ένταση της ασθένειας γιατί δρουν αποκλειστικά στα σημεία όπου εφαρμόζονται. Είναι πιθανό το βακτήριο να επιζήσει και να πολλαπλασιαστεί σε επιφάνειες του φυτού που δεν ψεκάστηκαν. Ακόμα, η συχνή εφαρμογή των χαλκούχων σκευασμάτων μπορεί να προκαλέσει την ανάπτυξη ανθεκτικών στελεχών του βακτηρίου.

Πειράματα σε θερμοκήπιο με τους επαγωγείς αντοχής acibenzolar-S-methyl (Actigard) και harpin EA (Messenger) έδωσαν καλά αποτελέσματα. Όμως, σύμφωνα με τον Isakeit (2002), απαιτούνται περισσότερα πειράματα προκειμένου να διασαφηνιστεί η σωστή δοσολογία των σκευασμάτων για την επίτευξη υψηλής αποτελεσματικότητας και μη φυτοτοξικότητας.

1.8.1 Καταπολέμηση σε καλλιέργειες σποροπαραγωγής

Για την σωστή αντιμετώπιση του βακτηρίου θα πρέπει να χρησιμοποιούνται υγιείς σπόροι και σπορόφυτα, απαλλαγμένα από το παθογόνο. Αν και δύσκολο να διασφαλιστεί αυτό, ο φυτουγειονομικός έλεγχος των σπόρων, μειώνει τον κίνδυνο εξάπλωσης της ασθένειας. Προς το παρόν η κοινή μέθοδος ελέγχου της ασθένειας που ακολουθείται είναι η σπορά 10.000-30.000 σπόρων από κάθε παρτίδα, σε συνθήκες ευνοϊκές για την εμφάνιση της βακτηρίωσης. Έπειτα από 18 ημέρες τα σπορόφυτα ελέγχονται για τυχόν εμφανή συμπτώματα της ασθένειας.

Για την αποφυγή προσβολής του σπόρου, οι καλλιέργειες σποροπαραγωγής γίνονται σε ξηρά και δροσερά κλίματα και σε περιοχές που δεν έχει εμφανιστεί η ασθένεια προηγουμένως. Πρέπει να γίνεται αμειψισπορά με φυτά εκτός των κολοκυνθοειδών για 3-5 χρόνια. Οι καλλιέργειες ελέγχονται για τυχόν προσβολές από το βακτήριο και χρησιμοποιούνται, όπως προαναφέρθηκε, μόνο οι υγιείς σπόροι. Χημικοί ή άλλοι τρόποι που να είναι αποτελεσματικοί για την εξάλειψη του παθογόνου στο σπόρο δεν υπάρχουν. Η θερμοθεραπεία, η ζύμωση, η εφαρμογή οξειδίου χλωριούχου νατρίου, υδροχλωρικού οξέος και υπεροξικού οξέος στο σπόρο, μειώνουν σημαντικά τη μετάδοση της ασθένειας στα σπορόφυτα, επιδρούν όμως αρνητικά στις φυσιολογικές λειτουργίες του σπόρου. Η αποτελεσματικότητα των παραπάνω εφαρμογών περιορίζεται στο εξωτερικό του σπόρου. Οι εφαρμογές

στους σπόρους δεν διασφαλίζουν την παρεμπόδιση της μετάδοσης στα σπορόφυτα και θα πρέπει πάντα να συνδυάζονται με άλλους τρόπους καταπολέμησης.

1.8.2 Καταπολέμηση σε καλλιέργειες παραγωγής σποροφύτων

Στο χωράφι για καλλιέργεια πρέπει να χρησιμοποιούνται μόνο σπόροι υγιείς και απαλλαγμένοι από το παθογόνο. Για να αποφευχθούν δευτερογενείς μολύνσεις συνιστάται απολύμανση των χώρων, επαρκής λίπανση και εφαρμογή φυτοπροστατευτικών προϊόντων.

Η μεταφορά εξοπλισμού από το ένα θερμοκήπιο στο άλλο δεν συνιστάται και οι σπόροι που προέρχονται από διαφορετικές παρτίδες πρέπει να φυτεύονται σε διαφορετικά θερμοκήπια ή να οριοθετούνται με πλαστικά ύψους 60cm. Η άρδευση που θα πρέπει να εφαρμόζεται είναι η στάγδην, αν και το κόστος της είναι ακριβότερο από αυτήν με καταιονισμό ή υδρονέφωση.

Ο έγκαιρος εντοπισμός της προσβολής στην καλλιέργεια είναι πολύ σημαντικός και διασφαλίζεται με την πραγματοποίηση συχνών μακροσκοπικών ελέγχων των φυτών. Το παθογόνο είναι πιθανό να επιβιώσει σε σπορόφυτα που δεν παρουσιάζουν συμπτώματα, γι' αυτό όλα τα σπορόφυτα που προήλθαν από καλλιέργειες στις οποίες είχε εμφανιστεί η ασθένεια, πρέπει να απομακρύνονται και να καταστρέφονται. Τα σπορόφυτα ψεκάζονται συστηματικά με χαλκούχα σκευάσματα. Η μείωση της σχετικής υγρασίας επιτυγχάνεται με τη βελτίωση αερισμού του θερμοκηπίου. Τέλος, όταν η παραγωγή των σποροφύτων ολοκληρωθεί οι χώροι πρέπει να απολυμαίνονται καλά και να παραμένουν για 2-3 εβδομάδες ανέπαφοι πριν την επαναφύτευση με κολοκυνθοειδή.

1.8.3 Καταπολέμηση σε εμπορικές καλλιέργειες

Στις εμπορικές καλλιέργειες για την αποφυγή της ασθένειας, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται σπόροι απαλλαγμένοι από το παθογόνο και για 3 χρόνια θα πρέπει να γίνεται εναλλαγή καλλιεργειών με φυτά τα οποία δεν είναι ξενιστές της ασθένειας. Το χωράφι θα πρέπει να οργώνεται βαθιά στο τέλος κάθε καλλιεργητικής περιόδου ώστε να γίνεται ενσωμάτωση των φυτικών υπολειμμάτων της προηγούμενης καλλιέργειας. Οι νέες καλλιέργειες με κολοκυνθοειδή πρέπει να εγκαθίστανται όσο το δυνατόν πιο μακριά από τις περιοχές που παλαιότερα είχαν

εντοπιστεί συμπτώματα της ασθένειας. Ζιζάνια και φυτά-εθελοντές που αποτελούν ξενιστές της ασθένειας πρέπει να καταστρέφονται σε περιοχές όπου καλλιεργούνται κολοκυνθοειδή. Τέλος, προληπτικοί ψεκασμοί πρέπει να εφαρμόζονται κάθε 2 εβδομάδες με χαλκούχα σκευάσματα ξεκινώντας από την περίοδο της άνθησης έως την περίοδο της ωρίμανσης των καρπών. Σε περίπτωση που υπάρξει προσβολή στα φυτάρια οι ψεκασμοί πρέπει να γίνονται κάθε εβδομάδα.

1.8.4 Ολοκληρωμένη διαχείριση της ασθένειας

Στα πλαίσια της ολοκληρωμένης διαχείρισης είναι απαραίτητη η προστασία των σπορόφυτων από την ασθένεια. Για να περιοριστούν τα συμπτώματα της ασθένειας θα πρέπει να ληφθούν μέτρα για την καταστροφή των μολυσμένων φυτών στο θερμοκήπιο ή στο χωράφι. Ακόμα, οι εργασίες που γίνονται πρέπει να είναι πολύ προσεκτικές και είναι πάντα απαραίτητη η χρήση γαντιών. Τα εργαλεία που χρησιμοποιούνται για την καλλιέργεια πρέπει να απολυμαίνονται και γενικά πρέπει να αποφεύγεται η μεταφορά αυτών μεταξύ των θερμοκηπίων. Με το τέλος κάθε καλλιεργητικής περιόδου και για αποφυγή της επιβίωσης των παθογόνων στους αγρούς, όλα τα φυτικά υπολείμματα πρέπει να οργωθούν, να ενσωματωθούν στο έδαφος και να καταστραφούν.

Η σωστή επιλογή της περιοχής φύτευσης, οι κατάλληλες περιβαλλοντικές συνθήκες και η διαθεσιμότητα για εργασία είναι μερικά από τα κριτήρια που λαμβάνονται υπόψη στην ολοκληρωμένη διαχείριση της ασθένειας. Απαραίτητος είναι πάντα ο μακροσκοπικός έλεγχος και πραγματοποιείται από το διάστημα της έναρξης της παραγωγής ως το διάστημα της συγκομιδής. Οι αγροί όπου καλλιεργούνται τα σπορόφυτα θα πρέπει να βρίσκονται σε περιοχές με θερμά, ημιάγονα έως ξηρά κλίματα. Επιπλέον, οι αγροί αυτοί δεν πρέπει να περιλαμβάνουν στο καλλιεργητικό ιστορικό τους προηγούμενη παραγωγή κολοκυνθοειδών, έτσι ώστε να μειώνεται ο κίνδυνος μετάδοσης του μολύσματος από τη μια καλλιεργητική περίοδο στην επόμενη.

Στην ολοκληρωμένη διαχείριση σπουδαίο ρόλο παίζει η χρήση υγιών σπόρων, απαλλαγμένων από ασθένειες. Το επίπεδο ανοχής είναι ένας μολυσμένος σπόρος σε 30.000 σπόρους. Το αντίστοιχο επίπεδο στα σπορόφυτα είναι το μηδενικό. Ακόμα, θα πρέπει να γίνεται εξέταση της φυτοϋγείας του σπόρου. Οι σπόροι

φυτεύονται στο θερμοκήπιο σε διαφανή πλαστικά κιβώτια, σε συνθήκες ευνοϊκές για την ανάπτυξη της βακτηριακής κηλίδωσης (>70% σχετική υγρασία και 24-35°C). Δεκαοχτώ ημέρες μετά την ανάπτυξη τους τα σπορόφυτα επιθεωρούνται οπτικά για τυχόν εμφανή συμπτώματα του παθογόνου. Η δοκιμή αυτή διαρκεί 2-3 εβδομάδες και απαιτεί θερμοκήπια στα οποία είναι δυνατόν να ελέγχεται ο χώρος τους ως προς τις περιβαλλοντικές συνθήκες που επικρατούν καθώς και να υπάρχει έμπειρο προσωπικό για την σωστή επιθεώρηση.

Το παθογόνο έχει τη δυνατότητα να επιβιώνει στο περίβλημα των αποθηκευμένων σπόρων ή και στο έμβρυο για περισσότερα από οκτώ έτη (Rane & Latin, 1992). Οι επεμβάσεις με ζεστό νερό εφαρμόζονται συνήθως για την αδρανοποίηση των παθογόνων στους σπόρους. Οι σπόροι επωάζονται σε 50-55°C για 10 ως 30 λεπτά, συνθήκες οι οποίες είναι κατάλληλες για να θανατώσουν το παθογόνο χωρίς όμως να επηρεάζουν την φυσιολογική λειτουργία του σπόρου. Η αποτελεσματικότητα της θερμοθεραπείας εξαρτάται από τη δυνατότητα των βακτηρίων να εκτίθενται ομοιόμορφα στην κρίσιμη θερμοκρασία που τα θανατώνει την καθορισμένη χρονική περίοδο. Ανάλογα με το μέγεθος του δείγματος που εξετάζεται κάθε φορά, είναι δύσκολο να εξασφαλιστεί ότι όλοι οι σπόροι λαμβάνουν την απαραίτητη έκθεση στην κρίσιμη αυτή θερμοκρασία. Επομένως, η εξόντωση των βακτηρίων στους σπόρους με τη δοκιμή της θερμοθεραπείας δεν εξασφαλίζεται πλήρως.

Μια άλλη διαδικασία που χρησιμοποιείται είναι αυτή της ζύμωσης του σπόρου. Οι πρόσφατα συγκομισμένοι σπόροι επωάζονται σε χυμό καρπουζιού για 24 έως 48 ώρες και στη συνέχεια ξεπλένονται και ξηραίνονται. Η μικροχλωρίδα που αναπτύσσεται σε αναερόβιες συνθήκες και οι μεταβολίτες της ζύμωσης, θανατώνουν τα προσβεβλημένα από την ασθένεια κύτταρα που βρίσκονται πάνω και μέσα στους σπόρους. Αποδείχθηκε ότι η ζύμωση δεν επέφερε επιπτώσεις στη βλάστηση του σπόρου (Hopkins *et al.*, 1996), αντιθέτως την βελτίωσε μετά από 6 μήνες αποθήκευσης του σπόρου. Επιπρόσθετα, έχουν αξιολογηθεί χημικές επεμβάσεις σπόρων με HCL 1%, CaOCl και NaOCl για διάφορα στελέχη του βακτηρίου. Η επέμβαση με 0.5-1% NaOCl ή CaOCl για 15 έως 20 λεπτά μειώνει τη μετάδοση της ασθένειας στα σπορόφυτα (Hopkins *et al.*, 1996 Rane & Latin, 1992). Από τη μια, οι Hopkins *et al.* (1996) ανέφεραν ότι η επεξεργασία σπόρου με το HCL 1% για 15 λεπτά είχε σαν αποτέλεσμα την αποφυγή της μόλυνσης στα σπορόφυτα και από την άλλη, οι Rane & Latin (1992) διαπίστωσαν ότι η μετάδοση

της ασθένειας στα σποροφύτα απλά μειώθηκε, από την έκθεση σε 1.8% HCL για 5 λεπτά. Ο Hopkins συστήνει την συνδυασμένη καταπολέμηση με την ζύμωση και την χημική επεξεργασία με HCL ή CaOCl και θεωρεί ότι είναι ο αποτελεσματικότερος τρόπος για την αντιμετώπιση της ασθένειας.

Εν κατακλείδι, η μόνη αποτελεσματική στρατηγική για την διαχείριση της ασθένειας, πιστεύεται πως είναι η ανάπτυξη αντοχής των φυτών σε συγκεκριμένα παθογόνα. Δυστυχώς, μέχρι σήμερα δεν έχει βρεθεί καμία εμπορική ποικιλία κολοκυνθοειδών που να παρουσιάζει αντοχή στη βακτηριακή κηλίδωση.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Σκοπός της εργασίας

Σκοπός του εργαστηριακού τμήματος της πτυχιακής αυτής εργασίας είναι η απομόνωση, η ταυτοποίηση και ο έλεγχος της παθογένειας βακτηριακών στελεχών που απομονώθηκαν από ασθενή σπορόφυτα καρπουζιάς (*Citrullus lanatus*) και εστάλησαν στο εργαστήριο Φυτοπαθολογίας-Βακτηριολογίας του Τ.Ε.Ι από επιχειρηματικό φυτώριο της Κρήτης για διάγνωση της ασθένειας και τον προσδιορισμό του παθογόνου αιτίου.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Παρακάτω αναφέρονται αναλυτικά οι μέθοδοι καθώς και τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια της μελέτης στο εργαστήριο, ώστε να προσδιοριστεί, να απομονωθεί και να ταυτοποιηθεί το πιθανό παθογόνο βακτήριο. Ακόμα, αναλύονται οι τεχνητές δοκιμές μόλυνσης διαφόρων κολοκυνθοειδών για τον έλεγχο της παθογένειας.

2.1 Απομόνωση και ταυτοποίηση του παθογόνου

Οι απομονώσεις των βακτηρίων πραγματοποιήθηκαν από ασθενή σπορόφυτα καρπουζιάς, τα οποία εμφάνιζαν ως κύριο σύμπτωμα υδατώδεις, νεκρωτικές κηλίδες στις κοτυληδόνες και στα πρώτα πραγματικά φύλλα. Τα σπορόφυτα ξεπλύθηκαν αρχικά με νερό βρύσης, για την απομάκρυνση ξένων υλών και στη συνέχεια με απεσταγμένο και αποστειρωμένο νερό. Τμήματα από τα όρια των υδαρών ή/και νεκρωτικών κηλίδων τεμαχίστηκαν σε πολύ μικρά τμήματα σε τρυβλίο που περιείχε περίπου 2ml αποστειρωμένο νερό.

Από το παραπάνω αιώρημα πάρθηκε ποσότητα 20ml και απλώθηκε σε τρυβλία που περιείχαν θρεπτικό υπόστρωμα King's B (Pseudomonas Agar F 17,5gr + 15ml Glycerol 50% στα 500ml) και NAG (Nutrient Agar 11,5gr + Glucose 1,25gr στα 500ml) με τη μέθοδο της διασποράς. Στη συνέχεια τα τρυβλία τοποθετήθηκαν σε θάλαμο επώασης για 24-48 ώρες στους 28°C. Οι επικρατέστερες αποικίες που παρατηρήθηκαν κατά τις απομονώσεις, υποκαλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα King's B μέχρι να δημιουργηθεί μια καθαρή καλλιέργεια του βακτηρίου. Οι απομονώσεις που επιλέχθηκαν από την καθαρή καλλιέργεια, διατηρήθηκαν σε κεκλιμένη καλλιέργεια σε θρεπτικό υπόστρωμα Gelose profonde στους 4°C καθ' όλη τη διάρκεια της εργασίας.

Από τις απομονώσεις που έγιναν σε θρεπτικό υπόστρωμα King's B φάνηκε ότι τα απομονωθέντα βακτήρια ανήκουν στις φθορίζουσες ψευδομονάδες. Στη συνέχεια διάφορες απομονώσεις εξετάστηκαν αρχικά ως προς τις δοκιμές L.O.P.A.T (παραγωγή Levan, δραστηριότητα οξειδάσης, πηκτινόλυση σε ροδέλες κονδύλων πατάτας, αναερόβια διάσπαση αργινίνης και αντίδραση υπερευαισθησίας σε φυτά καπνού). Στη συνέχεια ορισμένες απομονώσεις χαρακτηρίστηκαν

αναλυτικότερα με βάση τις μορφολογικές, φυσιολογικές και βιοχημικές δοκιμές που αναφέρονται στον Πίνακα 2. Οι απομονώσεις του φυτού καρπουζιάς και τα ήδη ταυτοποιημένα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν συγκριτικά κατά τη διάρκεια της εργασίας, παρουσιάζονται στον Πίνακα 1. Η μεθοδολογία που ακολουθήθηκε για την ταυτοποίηση των στελεχών έγινε σύμφωνα με αυτή που περιγράφεται στο Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria (Schaad *et al.*, 2001).

Πίνακας 1. Βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη.

Κωδικός συλλογής	Ξενιστής	Έτος απομόνωσης	Περιοχή
Απομονωθέντα στελέχη			
7000	Καρπούζι	2009	Κρήτη
7001	Καρπούζι	2009	Κρήτη
7002	Καρπούζι	2009	Κρήτη
7003	Καρπούζι	2009	Κρήτη
7004	Καρπούζι	2009	Κρήτη
7005	Καρπούζι	2009	Κρήτη
7006	Καρπούζι	2009	Κρήτη
7007	Καρπούζι	2009	Κρήτη
7008	Καρπούζι	2009	Κρήτη
7009	Καρπούζι	2009	Κρήτη
7010	Καρπούζι	2009	Κρήτη
7011	Καρπούζι	2009	Κρήτη
7012	Καρπούζι	2009	Κρήτη
7013	Καρπούζι	2009	Κρήτη
<i>Pseudomonas syringae</i> (R 1-3)	Ρόκα	2008	Ηράκλειο
<i>Pseudomonas syringae</i> (R 6)	Ρόκα	2008	Ηράκλειο
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> 1	Τομάτα	2009	Τυμπάκι
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> 2	Τομάτα	2000	Τυμπάκι
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> 115	Τομάτα	2000	Ιεράπετρα
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>apii</i> 251γ	Σέλινο	2002	Ηράκλειο
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>apii</i> 255γ	Σέλινο	2002	Ηράκλειο
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>lachrymans</i> 311	Πεπόνι	1991	Λασιίθι
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>lachrymans</i> 313	Αγγουριά	1991	Τυμπάκι

2.2 Δοκιμές παθογένειας

Η παθογένεια των βακτηριακών στελεχών της καρπουζιάς εξετάστηκε αρχικά με την πραγματοποίηση αντίδρασης υπερευαισθησίας στο παρέγχυμα των φύλλων, υγιών φυτών καπνού (cv. *Xanthi*) και νυχτολούλουδου (*Miriabilis jalapa*). Επιλέχθηκαν υγιή φυτά καπνού στο στάδιο 4-5 πραγματικών φύλλων καθώς και υγιή φυτά νυχτολούλουδου. Δημιουργήθηκαν αιωρήματα σε αποσταγμένο και αποστειρωμένο νερό από καλλιέργεια 48 ωρών σε θρεπτικό υπόστρωμα King's B. Η συγκέντρωση των αιωρημάτων που χρησιμοποιήθηκαν ήταν περίπου 10^8 cfu/ml. Οι μολύνσεις έγιναν στα φύλλα των φυτών με την μέθοδο της έκχυσης βακτηριακού αιωρήματος. Με τη βοήθεια σύριγγας, εκχύθηκε ποσότητα περίπου 100μl βακτηριακού αιωρήματος στην κάτω επιφάνεια των φύλλων και ανάμεσα από τις νευρώσεις. Μετά την έκχυση τα φυτά καλύφθηκαν με σακούλες πολυαιθυλενίου για την διατήρηση της σχετικής υγρασίας σε επίπεδο κορεσμού και στη συνέχεια παρέμειναν για 48 ώρες σε συνθήκες υγρασίας (70-80%) και θερμοκρασίας 15-26°C. Οι μολύνσεις έγιναν σύμφωνα με την προτεινόμενη μεθοδολογία από τους Elliot & Sands (1987). Στη συνέχεια εξετάστηκε η ικανότητα των βακτηρίων να προκαλούν πηκτινόλυση σε ροδέλες κονδύλων πατάτας. Οι μολύνσεις έγιναν με λήψη της καλλιέργειας των βακτηρίων από θρεπτικό υπόστρωμα King's B με τη βοήθεια αποστειρωμένης οδοντογλυφίδας.

Επιπλέον μολύνσεις πραγματοποιήθηκαν σε λοβούς φασολιάς με παραλαβή καλλιέργειας των απομονωθέντων βακτηρίων σε θρεπτικό υπόστρωμα King's B, με το άκρο της οδοντογλυφίδας και βύθιση αυτού σε βάθος περίπου 2mm από την επιφάνεια των λοβών. Στη συνέχεια οι λοβοί τοποθετήθηκαν σε πλαστικά δοχεία, κατά τέτοιο τρόπο ώστε να μην εφάπτονται, στα οποία προηγουμένως είχε προστεθεί νερό για τη διατήρηση της υγρασίας. Τα δοχεία τοποθετήθηκαν στο θάλαμο ανάπτυξης σε συνθήκες υγρασίας (70-80%) και θερμοκρασίας 15-26°C, όπου και παρέμειναν για 10 ημέρες.

Μολύνσεις έγιναν και σε σπορόφυτα καρπουζιάς ποικιλίας Πανόρμου και ποικιλίας Sugar Baby με παρόμοια μεθοδολογία όπως αυτή της αντίδρασης υπερευαισθησίας με τη χρησιμοποίηση διαφόρων συγκεντρώσεων αιωρημάτων των βακτηρίων (10^5 - 10^8 cfu/ml). Σε άωρους και ώριμους καρπούς καρπουζιάς, σε καρπούς αγγουριάς και κολοκυθιάς πραγματοποιήθηκαν τεχνητές μολύνσεις με εναπόθεση βακτηριακού αιωρήματος διαφόρων συγκεντρώσεων, ακολουθώντας

μεθοδολογία παρόμοια με αυτήν που έγινε και στους λοβούς φασολιάς. Οι μολυσμένοι καρποί τοποθετήθηκαν σε πλαστικά δοχεία με νερό ώστε να διατηρείται σε υψηλά επίπεδα η σχετική υγρασία (70-80%).

Σε όλες τις δοκιμές παθογένειας, χρησιμοποιήθηκαν συγκριτικά μάρτυρες στους οποίους οι μολύνσεις έγιναν με απεσταγμένο και αποστειρωμένο νερό και στη συνέχεια η μεταχείριση των φυτών ήταν παρόμοια με τα υπόλοιπα.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Περιγραφή των συμπτωμάτων της ασθένειας σε σπορόφυτα καρπουζιάς

Η ασθένεια αρχικά εκδηλώνεται στα φύλλα των σπορόφυτων και των νεαρών φυτών καρπουζιάς με τη δημιουργία σκούρων υδαρών κηλίδων στην κάτω επιφάνεια των κοτυληδόνων και των πρώτων πραγματικών φύλλων (Εικόνα 1-4). Στη συνέχεια οι υδαρείς κηλίδες γίνονται καστανές μέχρι σκούρες καστανές και συχνά γωνιώδεις, σταδιακά δε, γίνονται νεκρωτικές και περιορίζονται κυρίως μεταξύ των δευτερευόντων νευρώσεων των φύλλων. Σε ώριμα φυτά καρπουζιάς, εμφανίζονται κηλίδες στα φύλλα καστανού έως καστανοκόκκινου χρώματος οι οποίες εξαπλώνονται κατά μήκος των νευρώσεων. Σε ορισμένα σπορόφυτα παρατηρήθηκε ολική κατάρρευση του φυτού από την κορυφή του προς την βάση του.

3.2 Απομόνωση και ταυτοποίηση του παθογόνου

Κατά τη διάρκεια της μελέτης στο εργαστήριο Φυτοπαθολογίας-Βακτηριολογίας του Τ.Ε.Ι, πραγματοποιήθηκαν απομονώσεις από προσβεβλημένα σπορόφυτα που παρουσίαζαν συμπτώματα παρόμοια με εκείνα των βακτηριακών κηλιδώσεων. Σε απομονώσεις που έγιναν σε θρεπτικό υπόστρωμα King's B οι αποικίες των βακτηρίων ήταν χρώματος υπόλευκου, υπερυψωμένες, θολές, μουκώδεις, με κανονικό περίγραμμα. Όλες οι απομονώσεις χαρακτηρίζονται αρνητικές κατά Gram με τη δοκιμή της διαλυτότητας σε 3% KOH και αερόβιες. Στις δοκιμές L.O.P.A.T οι απομονώσεις παρήγαγαν Levan, ήταν αρνητικές στην οξειδάση, δεν προκάλεσαν σήψη σε ροδέλες κονδύλων πατάτας, ήταν αρνητικές στη διάσπαση αργινίνης και έδωσαν τυπική αντίδραση υπερευαισθησίας σε φυτά καπνού. Ακόμα πραγματοποιήθηκαν οι βιοχημικές δοκιμές API 20NE (Εικόνα 5). Με βάση τις παραπάνω δοκιμές οι απομονώσεις του βακτηρίου ταξινομούνται ως μέλη της ομάδας Ia των φθορίζουσων ψευδομονάδων. Πιο συγκεκριμένα διαπιστώθηκε ότι ανήκουν στο είδος *Pseudomonas syringae* αφού εμφάνισαν το φαινότυπο : [+ - - - +] δηλαδή, παραγωγή Levan (+), παραγωγή οξειδάσης (-),

πηκτινόλυση (σήψη) των κονδύλων της πατάτας (-), αναερόβια διάσπαση της αργινίνης (-), αντίδραση υπερευαισθησίας (+). Στον πίνακα 2 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της αναλυτικής φαινοτυπικής ταυτοποίησης σε επίπεδο παθοποιικιλίας Παρατηρούμε ότι οι απομονώσεις της καρπουζιάς εμφάνισαν όμοιο φαινοτυπικό προφίλ με τα ταυτοποιημένα στελέχη του είδους *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*.

3.3 Δοκιμές παθογένειας

3.3.1 Αντιδράσεις υπερευαισθησίας (HR) σε φυτά καπνού

Όλα τα βακτηριακά στελέχη εξετάστηκαν ως προς την αντίδραση υπερευαισθησίας σε φυτά καπνού αλλά και σε φυτά *Mirabilis jalapa* (νυχτολούλουδο). Όλα εμφάνισαν φαινότυπο HR⁺ σε διάστημα 24 – 48 h. (Εικόνα 6-9).

3.3.2 Τεχνητές μολύνσεις σε σπορόφυτα και ανεπτυγμένα φυτά καρπουζιάς

Οι έξι απομονώσεις από τα φυτά καρπουζιάς που επιλέχθηκαν για τις τεχνητές μολύνσεις προκάλεσαν την εκδήλωση των παρακάτω συμπτωμάτων σε διάστημα μιας εβδομάδας: Στα σπορόφυτα αρχικά παρουσιάστηκαν υδαρείς κηλίδες στις κοτυληδόνες που σταδιακά εξελίσσονταν σε καστανόχρωμες μέχρι μαύρες κηλίδες (Εικόνα 10-13). Σε μερικά σπορόφυτα παρουσιάστηκε ολοκληρωτική σήψη των κοτυληδόνων. Κατά γενικό κανόνα όσο μεγαλύτερη ήταν η συγκέντρωση που χρησιμοποιήθηκε για την μόλυνση τόσο τα συμπτώματα ήταν εντονότερα και η εμφάνιση τους γρηγορότερη.

3.3.3 Τεχνητές μολύνσεις σε λοβούς φασολιάς

Στις τεχνητές μολύνσεις που πραγματοποιήθηκαν σε λοβούς φασολιάς, παρατηρήθηκε σε διάστημα 5 ημερών μια άτυπη νέκρωση του τύπου *Pseudomonas*, εξωτερικά των λοβών (Εικόνα 15-16), ενώ σε ορισμένες περιπτώσεις παρατηρήθηκε εσωτερικός σκουρόχρωμος μεταχρωματισμός των σπερμάτων.

3.3.4 Τεχνητές μολύνσεις σε ώριμους και άωρους καρπούς καρπουζιάς και σε καρπούς κολοκυθιάς και αγγουριάς

Τεχνητές μολύνσεις πραγματοποιήθηκαν σε άωρους και ώριμους καρπούς καρπουζιάς, καθώς και σε ανεπτυγμένους καρπούς κολοκυθιάς και αγγουριάς. Στα αγγούρια δεν παρατηρήθηκε η εκδήλωση συμπτωμάτων. Αντιθέτως στα κολοκύθια, παρουσιάστηκε υδατώδης κηλίδα και νέκρωση στο σημείο της μόλυνσης (Εικόνα 14). Μετά από διάστημα 10 ημερών, στους άωρους καρπούς καρπουζιάς οι μολύνσεις δεν ήταν επιτυχείς (Εικόνα 17-18), ενώ στους ώριμους καρπούς εμφανίστηκαν άτυπες νεκρώσεις στα σημεία μόλυνσης.

Πίνακας 2. Ταυτοποίηση βακτηριακών απομονώσεων από φυτά καρπουζιάς.

ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΕΣ ΔΟΚΙΜΕΣ	ΑΠΟΜΟΝΩΣΕΙΣ ΚΑΡΠΟΥΖΙΑΣ	PSEUDOMONAS			
		<i>viridiflava</i>	<i>syringae</i> pathovars		
			<i>syringae</i>	<i>tomato</i>	<i>lachrymans</i>
Κωδικοί στελεχών	7000-7013	573, 565	204, 228, 249	131, 132	311
Αριθμός στελεχών	14	2	3	2	1
Φθορισμός σε AF	+	+	+	+	+
Παραγωγή LEVAN	+	-	+	+	+
Οξειδάση	-	-	-	-	-
Αργινίνη	-	-	-	-	-
Πηκτινόλυση	-	+	-	-	-
Αντίδραση υπερευαισθησίας (HR)	+	+	+	+	+
Αναγωγή νιτρικών σε N ₂	-	-	-	-	-
PHB	-	-	-	-	-
Υδρόλυση ζελατίνης	-	+	+	-	-
Υδρόλυση αρβουτίνης	+	+	+	+	+
Υδρόλυση αισκουλίνης	+	+	+	+	+
D-μανιτόλη	+	+	+	+	+
2-κετογλουκονικό νάτριο	+	+	+	+	+
Βενζοϊκό οξύ	-	-	-	-	-
Κελλοβιόζη	-	-	-	-	-
D-σορβιτόλη	+	-	+	+	+
D(+)-τρεαλόζη	-	-	-	-	-

ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΕΣ ΔΟΚΙΜΕΣ	ΑΠΟΜΟΝΩΣΕΙΣ ΚΑΡΠΟΥΖΙΑΣ	PSEUDOMONAS			
		<i>viridiflava</i>	<i>syringae</i> pathovars		
			<i>syringae</i>	<i>tomato</i>	<i>lachrymans</i>
Κωδικοί στελεχών	7000-7013	573, 565	204, 228, 249	131, 132	311
Αριθμός στελεχών	14	2	3	2	1
Σακχαρόζη	+	-	+	+	+
Μεσο-τρυγικό οξύ	+	+	+	+	+
D(-) τρυγικό οξύ	+	+	-	+	+
D(-) αραβινόζη	-	-	-	-	-
L(+) ραμνόζη	-	-	-	-	-
D-ασπαρτικό οξύ	-	-	-	-	-
L(-) ραμνόζη	-	-	-	-	-
L(+) τρυγικό οξύ	-	-	-	-	-
Αδονιτόλη	-	-	-	-	-
I-ινοσιτόλη	+	-	+	+	+
D-κινάτ	+	+	+	+	+
Ερυθριτόλη	+	-	-	-	+
L-γαλακτικό οξύ	-	+	+	-	-
Ανθρανιλικό οξύ	-	-	-	-	-
DL-ομοσερίνη	-	-	-	-	-
DL-γαλακτικό οξύ	+	+	+	-	+
Βεταίνη	+	+	+	+	+
D(+) ξυλόζη	+	-	+	+	+
D(+) μανόζη	+	+	+	+	+
Μηλονικό νάτριο	+	+	+	+	+

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Από τα αποτελέσματα της εργασίας προκύπτει ότι το παθογόνο αίτιο της ασθένειας στα σπορόφυτα καρπουζιάς είναι το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*. Πράγματι το μορφολογικό, φυσιολογικό και βιοχημικό φαινοτυπικό προφίλ που παρουσίασαν οι απομονώσεις από τα σπορόφυτα της καρπουζιάς δεν διαφοροποιείται από εκείνο των ταυτοποιημένων στελεχών του *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* που χρησιμοποιήθηκαν συγκριτικά στην παρούσα μελέτη. Οι απομονώσεις από τα σπορόφυτα της καρπουζιάς διαφοροποιούνται από τα στελέχη αναφοράς του *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* και του *Pseudomonas viridiflava* που χρησιμοποιήθηκαν συγκριτικά. Οι αρχές του Koch ολοκληρώθηκαν με επιτυχία και τα συμπτώματα της ασθένειας αναπαραχθήκαν σε σπορόφυτα και νεαρά φυτά καρπουζιάς. Πιθανολογείται ότι το αρχικό μόλυσμα στο φυτώριο πρέπει να προήλθε από μολυσμένο με το βακτήριο σπόρο αφού η ασθένεια είχε εντοπιστεί σε δύο μόνο ποικιλίες. Η ζημιά που προκάλεσε ήταν σημαντική, εκτιμώμενη σε ορισμένες παρτίδες σπόρου σε ένα ποσοστό περίπου 15%. Η γωνιώδης κηλίδωση της καρπουζιάς δεν αποτελεί συνηθισμένη ασθένεια σε καλλιέργειες φυτών καρπουζιάς στην Κρήτη σε αντίθεση με τη συχνή εμφάνιση της ασθένειας σε θερμοκηπιακή καλλιέργεια αγγουριάς και πεπονιάς (Γκούμας, 2003). Πιθανόν, οι ευνοϊκές συνθήκες που επικρατούν κατά τη διάρκεια παραγωγής των σποροφύτων συνέβαλαν στην εκδήλωση των συμπτωμάτων της ασθένειας.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΗ

- Isakeit, T., Black, M. C., Barnes, L. W., & Jones J. B. (1997). First report of infection of honeydew with *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. *Plant Disease*, 81, 694.
- Rane, K. K., & Latin, R. X. (1992). Bacterial fruit blotch of watermelon - Association of the pathogen with seed. *Plant Disease*, 76, 509-512.
- Schaad, N. W., Jones, J. B., and Chun, W., Third edition 2001. Laboratory guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. 121-138.
- Walcott, R. R, Fessehaie, A., & Castro, A. C. (2004). Differences in pathogenicity between two genetically distinct groups of *Acidovorax avenae* subsp. *Citrulli* on cucurbit hosts. *Journal of Phytopathology*, 152, 277-285.

ΕΛΛΗΝΙΚΗ

- Γκούμας, Δ.Ε., 2006. Επιλεγμένα Θέματα Ειδικής Φυτοβακτηριολογίας. Έκδοση: ΤΕΙ Κρήτης, Ηράκλειο, σελ.7-8.
- Γκούμας, Δ.Ε., 2003. Οι βακτηριώσεις στα κολοκυνθοειδή. Γεωργία και Κτηνοτροφία, 3, σελ. 54-59.
- Παναγόπουλος, Χ.Γ., 2000. Ασθένειες κηπευτικών καλλιεργειών. Β΄ Έκδοση. Εκδόσεις: Αθ. Σταμούλης, Αθήνα, σελ. 233-281.
- Χολέβα, Μ.Κ., Καραφλα, Χ.Δ., Γλυνός Π.Ε., και Αλιβιζάτος, Α.Σ., 2008. Πρώτη ανακοίνωση προσβολής φυτών και καρπών καρπουζιάς από το φυτοπαθογόνο βακτήριο *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* στην Ελλάδα. Πρόγραμμα και Περιλήψεις εργασιών, 14ο Πανελλήνιο Φυτοπαθολογικό Συνέδριο, Αργολίδα, σελ. 139.

ΔΙΑΔΥΚΤΙΟ

- Bacterial Fruit Blotch, A commercial growers guide, 2009.
<http://www.harrismoran.com/products/watermelon/pdf/BFBGrowerGuide.pdf>
[Τελευταία πρόσβαση 28/03/2010].
- Bacterial Fruit Blotch, Questions & Answers with the Experts, 2009.
http://www.rogersadvantage.com/pdf/wml_BFBQAexperts.pdf
[Τελευταία πρόσβαση 28/03/2010].
- European and Mediterranean Plant Protection Organization, 2009.
http://www.eppo.org/QUARANTINE/Alert_List/bacteria/Acidovorax_citrulli.htm
[Τελευταία πρόσβαση 21/03/2010].
- Plantpro, All about plant protection, 2008.
<http://www.plantprotection.hu/modulok/angol/>
[Τελευταία πρόσβαση 21/03/2010].
- Report on plant disease, University of Illinois extension, 2002.
<http://ipm.illinois.edu/diseases/rpds/948.pdf>
[Τελευταία πρόσβαση 21/03/2010].
- R. X. Latin, Department of Botany and Plant Pathology, Purdue University, 2000.
<http://www.plantmanagementnetwork.org/pub/php/management/bacterialblotch/>
[Τελευταία πρόσβαση 21/03/2010].
- Walcott, R.R. 2005. Bacterial fruit blotch of cucurbits. *The Plant Health Instructor*.
<http://www.apsnet.org/education/LessonsPlantPath/BacterialBlotch/default.htm>
[Τελευταία πρόσβαση 21/03/2010].
- Καρπούζι από τη Βικιπαίδεια, την ελεύθερη εγκυκλοπαίδεια. Μάρτιος 2010.
<http://el.wikipedia.org/wiki/Καρπούζι>
[Τελευταία πρόσβαση 02/06/2010].
- Καρπούζι και υγεία: Αυτά που πρέπει να ξέρετε. 01-06-2004.
http://www.medlook.net/article.asp?item_id=1337
[Τελευταία πρόσβαση 02/06/2010].

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ:
ΦΩΤΟΓΡΑΦΙΚΟ ΥΛΙΚΟ



Εικόνα: 1-4. Αρχικά συμπτώματα σε σπορόφυτα καρπουζιάς.



Εικόνα: 5. Βιοχημικές δοκιμές (αρί 20NE) με το στέλεχος 7003.



Εικόνα: 6-9. Δοκιμή αντίδρασης υπερευαισθησίας σε φυτά *Mirabilis jalapa* (νυχτολούλουδο) και καπνού.



Εικόνα: 10-13. Τεχνητές μολύνσεις σε φυτά καρπουζιάς και αναπαραγωγή των συμπτωμάτων της ασθένειας.



Εικόνα: 14-16. Τεχνητές μολύνσεις σε κολοκύθι (τοπική νέκρωση στη θέση μόλυνσης) και σε λοβούς φασολιών (άτυπη νέκρωση τύπου *Pseudomonas*).



Εικόνα: 17-18. Τεχνητές μολύνσεις σε άωρους καρπούς καρπουζιάς (απουσία μόλυνσης).

