



**Τ.Ε.Ι. ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ**

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

**ΜΕΛΕΤΗ ΜΙΑΣ ΝΕΑΣ ΒΑΚΤΗΡΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΣΘΕΝΕΙΑΣ ΤΟΥ
ΣΕΛΙΝΟΥ**

**ΣΠΟΥΔΑΣΤΡΙΑ : Παναγούλα Λαλλά
ΕΙΣΗΓΗΤΗΣ : Καθηγητής Δρ Δημήτριος Γκούμας**

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2003

**Τ.Ε.Ι. ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ**

**ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ
ΜΕΛΕΤΗ ΜΙΑΣ ΝΕΑΣ ΒΑΚΤΗΡΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΣΘΕΝΕΙΑΣ ΤΟΥ
ΣΕΛΙΝΟΥ**

**ΣΠΟΥΔΑΣΤΡΙΑ : Παναγούλα Λαλλά
ΕΙΣΗΓΗΤΗΣ : Καθηγητής Δρ Δημήτριος Γκούμας**

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2003

Περιεχόμενα	
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	4
1.1. Γενικά για το βακτήριο <i>Pseudomonas syringae</i>	4
1.2. Βακτηριακή κηλίδωση του σέλινου	5
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	7
2.1. Απομόνωση του παθογόνου	7
2.2. Δοκιμές παθογένειας	8
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	10
3.1. Περιγραφή των συμπτωμάτων της ασθένειας	10
3.2. Απομόνωση και ταυτοποίηση του παθογόνου	11
3.3. Δοκιμές παθογένειας	12
3.3.1. Αντίδραση υπερευαισθησίας στον καπνό	12
3.3.2. Τεχνητές μολύνσεις σε φυτά σέλινου	12
3.3.3. Τεχνητές μολύνσεις σε καρπούς λεμονιάς	15
3.3.4. Τεχνητές μολύνσεις σε φυτά και λοβούς φασολιάς	15
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ- ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	16
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	17
6. ΦΩΤΟΓΡΑΦΙΚΟ ΥΛΙΚΟ	19

Summary

A study of a new bacterial disease of celery.

Pseudomonas syringae pv. *apii* casual agent of bacterial leaf spot (BLS) of celery was first identified in California in 1989. In this study, etiology, epidemiology and factors contributing to disease development, were investigated.

Pseudomonas syringae pv. *apii* strains were isolated from diseased celery leafs and subjected to a series of physiological and biochemical tests. Inoculations of healthy celery plants with the isolated bacterial strains were performed repeatedly, in order to determine pathogenicity.

Based on the results, disease management techniques are proposed.

Περίληψη

Μελέτη μιας νέας βακτηριολογικής ασθένειας του σέλινου

Το Μάρτιο του 2003 σε πειραματική καλλιέργεια σέλινου ποικιλίας Tall – Utah, σε διάφορα υποστρώματα κομπόστας, στο αγρόκτημα του Τ. Ε. Ι. Κρήτης στο Ηράκλειο, εκδηλώθηκε μια ασθένεια με συμπτώματα που διαφοροποιούνταν από τις γνωστές μέχρι σήμερα ασθένειες του σέλινου.

Σκοπός της εργασίας αυτής είναι η μελέτη της πρωτοεμφανιζόμενης ασθένειας, με την απομόνωση και ταυτοποίηση του παθογόνου αιτίου και ο έλεγχος της παθογένειας βακτηριακών απομονώσεων.

Η ταυτοποίηση των βακτηριακών στελεχών που απομονώθηκαν από μολυσμένα φυτά σέλινου, έγινε με την βοήθεια μορφολογικών, φυσιολογικών και βιοχημικών δοκιμών. Όπως προέκυψε από τα αποτελέσματα της διαδικασίας της ταυτοποίησης, η ασθένεια οφείλεται στο βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *apii*.

Ο έλεγχος της παθογένειας των απομονωθέντων, από τα φυτά σέλινου, βακτηριακών στελεχών πραγματοποιήθηκε με τεχνητές μολύνσεις φυτών σέλινου, φυτών φασολιάς, καρπών λεμονιάς και λοβών φασολιάς.

Στην ανωτέρω μελέτη χρησιμοποιήθηκαν συγκριτικά βακτηριακά στελέχη ήδη ταυτοποιημένα, τόσο κατά την διαδικασία της ταυτοποίησης όσο και στον έλεγχο της παθογένειας των βακτηριακών στελεχών που απομονώθηκαν από τα μολυσμένα φυτά σέλινου.

Βάση των αποτελεσμάτων, της μελέτης προτείνονται τρόποι αντιμετώπισης της ασθένειας.

ΜΕΛΕΤΗ ΜΙΑΣ ΝΕΑΣ ΒΑΚΤΗΡΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΣΘΕΝΕΙΑΣ ΤΟΥ ΣΕΛΙΝΟΥ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Γενικά για το βακτήριο *Pseudomonas syringae*

Το βακτήριο *Pseudomonas syringae* απομονώθηκε αρχικά από ασθενές φυτό πασχαλιάς (*Syringa vulgaris* L.) από τον M. W. Beijerinck το 1899 και στη συνέχεια ταξινομήθηκε από τον van Hall το 1902. Το *P. syringae* ταξινομείται στην γ υποκλάση των πρωτεοβακτηρίων σαν κατά Gram αρνητικό και αυστηρά αερόβιο. Έχει ραβδόμορφο σχήμα και φέρει μαστίγια πολικά και είναι φθορίζον, εκτός από ελάχιστες εξαιρέσεις. Είναι αρνητικό στην υδρόλυση της οξειδάσης και της αργινίνης, ιδιότητα που το διαχωρίζει από τα υπόλοιπα φθορίζοντα βακτήρια του ίδιου γένους και δεν παράγει πηκτινολυτικά ένζυμα, ιδιότητα που το διαφοροποιεί από το βακτήριο *Pseudomonas viridiflava*.

Ο όρος παθοποικιλία, χρησιμοποιείται συχνά για τον διαχωρισμό βακτηρίων, του ίδιου γένους, που εμφανίζουν διαφοροποιήσεις ως προς την παθογένεια τους, δηλαδή ως προς το εύρος των ξενιστών που προσβάλλουν. Συνήθως, για τον καθορισμό των παθοποικιλιών του *Pseudomonas syringae* χρησιμοποιούνται βιοχημικές, φυσιολογικές και μοριακές τεχνικές και μέθοδοι. Γενικά σε διάφορες μελέτες έχει διαπιστωθεί ότι η ομαδοποίηση με βάση τις παραπάνω δοκιμές συμπίπτει με την ομαδοποίηση σε επίπεδο παθοποικιλίας που γίνεται με βάση το εύρος των ξενιστών. Στελέχη της ίδιας παθοποικιλίας, γενικά, εμφανίζουν περιορισμένο αριθμό ξενιστών. Εξαίρεση αποτελεί η παθοποικιλία *syringae* στελέχη της οποίας προκαλούν ασθένειες σε περισσότερα από 80 φυτά-ξενιστές. Το φαινόμενο αυτό μπορεί να οφείλεται στο γεγονός, ότι πολύ συχνά ένα φυτό προσβάλλεται από στελέχη δυο διαφορετικών παθοποικιλιών ένα από τα οποία συνήθως ανήκει στην παθοποικιλία *syringae*.

Ανάμεσα στην ποικιλία των μικροοργανισμών που αποικίζουν τη φυλλόσφαιρα, το βακτήριο *Pseudomonas syringae* εμφανίζει ιδιαίτερη σημασία καθώς συμμετέχει σε αυτή με τις ιδιότητες του παθογόνου, του επίφυτου και του παγοποιητικού παράγοντα. Επίσης είναι ο πρώτος γενετικά τροποποιημένος μικροοργανισμός που εισήχθη σε οικολογικά περιβάλλοντα, για την αντιμετώπιση του παγετού.

Κατά τη διάρκεια του πρώτου μισού του 19^{ου} αιώνα το βακτήριο *P. syringae* είχε απομονωθεί και ταυτοποιηθεί ως το παθογόνο αίτιο πολλών ασθενειών των φυτών. Ο ρόλος του ως φυτοπαθογόνου, είχε αναγνωριστεί από πολύ νωρίς. Το 1959, ο J. E. Crosse (Crosse, 1959) σε μελέτη του πάνω στο βακτηριακό έλκος της κερασιάς, εξέφρασε τη θεωρία για το ρόλο των επιφυτικών πληθυσμών των βακτηρίων στην επιδημιολογία των ασθενειών, που προκαλούνται από διάφορες παθοποικιλίες του *P. syringae*, όπως επίσης και από άλλα βακτήρια. Με βάση τις εργασίες αυτές

διαπιστώθηκε ο σημαντικός ρόλος των επιφυτικών βακτηρίων της φυλλόσφαιρας στην ανάπτυξη και στην εκδήλωση των ασθενειών. Σήμερα είναι γενικά αποδεκτή η άποψη ότι ορισμένα είδη βακτηρίων αποικίζουν τη φυλλόσφαιρα φυτών χωρίς να εκδηλώνουν απαραίτητα μολυσματικότητα, παρά μόνο κάτω από κατάλληλες συνθήκες. Παρόλο που είναι γενικά αποδεκτό, ότι οι επιφυτικοί πληθυσμοί του *P. syringae* στη φυλλική επιφάνεια ασυμπτωματικών φυτών-ξενιστών καθώς και σε φύλλα μη ξενιστών μπορούν να χρησιμεύσουν ως πηγές μολυσμάτων, αυτό γίνεται μόνο όταν οι πληθυσμοί των βακτηρίων αυξάνονται σε τέτοιο επίπεδο, ώστε να διαταράσσεται η ισορροπία ανάμεσα στο βακτήριο και στο περιβάλλον στο οποίο αναπτύσσεται.

Τα στελέχη του *P. syringae* που εμφανίζουν τον φαινότυπο της δημιουργίας παγοκρυστάλλων, σε θερμοκρασίες κάτω του μηδενός αλλοιώνουν το φυλλικό περιβάλλον μέσα στο οποίο αναπτύσσονται. Φυτά που είναι ευαίσθητα στο ψύχος καταστρέφονται εξαιτίας της δημιουργίας παγοκρυστάλλων στους μεσοκυττάριους χώρους, όταν επικρατούν θερμοκρασίες 0-5° C. Με την παρουσία στελεχών του *P. syringae* στην φυλλόσφαιρα, που εμφανίζουν το φαινότυπο INA⁺ η δημιουργία παγοκρυστάλλων γίνεται σε υψηλότερες θερμοκρασίες (-2 °C). Επειδή τα περισσότερα βακτηριακά κύτταρα ανάμεσα σε ένα πληθυσμό INA⁺ βακτηρίων δεν είναι ενεργά σε δεδομένη χρονική στιγμή και σε συγκεκριμένη θερμοκρασία, όσο μεγαλύτερος είναι ο βακτηριακός πληθυσμός τόσο αυξάνεται η πιθανότητα ένα ή περισσότερα κύτταρα να διαθέτουν την ικανότητα δημιουργίας παγοκρυστάλλων. Έτσι το *P. syringae* καταστρέφει τους φυτικούς ιστούς στους οποίους αναπτύσσεται με δυο τρόπους, αφενός με την ανάπτυξη ασθενειών και αφ ετέρου με την πρόκληση παγετοπληξίας.

1.2 Βακτηριακή κηλίδωση του σέλινου

Η βακτηριακή κηλίδωση (bacterial leaf spot) του σέλινου προκαλείται από το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *apii*. Η ασθένεια εμφανίστηκε και περιγράφηκε για πρώτη φορά στην πολιτεία της Νέας-Υόρκης των Ηνωμένων Πολιτειών το 1921. Η ασθένεια ήταν γνωστή τόσο στις κεντροδυτικές όσο και στις ανατολικές περιοχές της ίδιας χώρας, με την ονομασία "northern bacterial blight". Στην περιοχή της Καλιφόρνιας, πριν το 1989 δεν είχαν εμφανιστεί σημαντικά προβλήματα στην καλλιέργεια του σέλινου, όσον αφορά τις ασθένειες, εκτός από περιστασιακές εξάρσεις της σεπτορίωσης, που προκαλείται από το μύκητα *Septoria apiicola*. Όμως το 1989, παρουσιάστηκε μια νέα ασθένεια του φυλλώματος, τόσο στα φυτώρια

σέλινου όσο και στον αγρό. Από μελέτες που πραγματοποιήθηκαν και βάση των αρχών του Koch εξακριβώθηκε ότι η ασθένεια προκαλείται από το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *apii* και ονομάστηκε βακτηριακή κηλίδωση. Τα συμπτώματα της ασθένειας εμφανίζονται κυρίως στα φύλλα, σαν μικρές (2-5mm) γωνιώδεις και υδαρείς κηλίδες. Αργότερα, οι κηλίδες γίνονται νεκρωτικές, χρώματος καφέ και συχνά συνενώνονται προκαλώντας εκτεταμένη νέκρωση των ιστών του φύλλου. Μέχρι το 1991, η ασθένεια είχε εγκατασταθεί σε όλες τις περιοχές καλλιέργειας του σέλινου της Καλιφόρνιας, εμφανίζοντας μεγαλύτερη έξαρση στις φυτωριακές μονάδες όπου οι απώλειες ήταν πολύ σοβαρές, αφού οι προσβολές προκάλεσαν τη μείωση της ζωνρότητας και της εμπορικής αξίας των φυταρίων, οδηγώντας στην απόρριψη ολόκληρων σπορομερίδων.

Η αύξηση των επιφυτικών πληθυσμών του βακτηρίου φαίνεται να συνδέεται με την έναρξη των προσβολών στην καλλιέργεια του σέλινου. Παράγοντες ευνοούν την εξάπλωση της ασθένειας είναι ο θερμός και υγρός καιρός καθώς ορισμένες καλλιεργητικές τεχνικές, όπως η άρδευση με καταιονισμό με υψηλή πίεσης, η υπερβολική άζωτούχος λίπανση, τα συχνά κλαδέματα που προκαλούν τη δημιουργία πληγών. Αυτό συμβαίνει όταν τα φυτά είναι ανεπτυγμένα οι ιστοί τους είναι υδαρείς, ειδικά αν εφαρμόζεται υπερβολική σε άζωτο λίπανση. Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με τα υψηλά επίπεδα υγρασίας, τόσο στην ατμόσφαιρα όσο και στην επιφάνεια του φύλλου, αποτελούν ευνοϊκούς παράγοντες για την αύξηση του βακτηριακού πληθυσμού. Η ανίχνευση του βακτηρίου σε σπόρους σέλινου καθώς και η ξαφνική εισαγωγή και εξάπλωση της ασθένειας στην πολιτεία της Καλιφόρνια υποδηλώνουν ότι το παθογόνο της βακτηριακής κηλίδωσης μεταδίδεται με το σπόρο. Το παθογόνο έχει ανιχνευτεί σε φυτά που προέρχονταν από μολυσμένο σπόρο, γεγονός που αποδεικνύει τον σημαντικό επιδημιολογικό σύνδεσμο μεταξύ της ασθένειας και της πηγής μόλυνσης.

Ο πιο αποτελεσματικός τρόπος πρόληψης της ασθένειας είναι η εμβάπτιση του σπόρου σε νερό θερμοκρασίας 50° C για 25 λεπτά. Με την επέμβαση αυτή, μειώνεται ο πληθυσμός του παθογόνου βακτηρίου, χωρίς να επηρεάζεται σημαντικά η βλαστική ικανότητα του σπόρου. Η επιφανειακή απολύμανση του σπόρου με υποχλωριώδες νάτριο δεν μειώνει το πληθυσμό του παθογόνου, γεγονός που υποδηλώνει ότι το βακτήριο πιθανώς αποικίζει το περίβλημα του σπόρου σε θέσεις (ανοίγματα, οδοντώσεις) που είναι καλά προφυλαγμένες από τη διύγρανση.

Σκοπός της εργασίας αυτής, είναι η μελέτη μιας πρωτοεμφανιζόμενης ασθένειας του σέλινου στην Κρήτη, με την απομόνωση και την ταυτοποίηση του παθογόνου αιτίου και τον έλεγχο της παθογένειας των βακτηριακών απομονώσεων.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Απομόνωση του παθογόνου

Για την απομόνωση των στελεχών του βακτηρίου, πάρθηκαν δείγματα φύλλων μολυσμένων φυτών σέλινου τα οποία ξεπλύθηκαν αρχικά με νερό βρύσης για την απομάκρυνση ξένων υλών και στη συνέχεια με απεσταγμένο και αποστειρωμένο νερό. Επιλέχθηκαν τμήματα από την περιφέρεια των κηλίδων τα οποία μετά την κοπή τους τοποθετήθηκαν σε τριβλίο που περιείχε 2ml αποστειρωμένο νερό, όπου και τεμαχίστηκαν σε πολύ μικρά κομμάτια.

Ποσότητα 20 ml από το αιώρημα που δημιουργήθηκε, απλώθηκε σε τριβλία που περιείχαν θρεπτικό υπόστρωμα King's B (King *et al.*, 1954) με τη μέθοδο της διασποράς και επώαστηκε στους 27 °C για 24-48 ώρες. Οι επικρατέστερες αποικίες που παρατηρήθηκαν κατά τις απομονώσεις υποκαλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα King's μέχρι να δημιουργηθεί καθαρή καλλιέργεια. Οι απομονώσεις που επιλέχθηκαν διατηρήθηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα Gelose profonde στους 4°C σε όλη τη διάρκεια της εργασίας.

Απο τις απομονώσεις που έγιναν σε θρεπτικό υπόστρωμα King's φάνηκε ότι τα απομονωμένα βακτήρια ανήκαν στις φθορίζουσες ψευδομονάδες. Στη συνέχεια εξετάστηκαν αρχικά ως προς τις δοκιμές L.O.P.A.T. (παραγωγή LEVAN, δραστηριότητα οξειδάσης, πηκτινόλυση στην πατάτα, αναερόβια διάσπαση αργινίνης, αντίδραση υπερευαισθησίας στον καπνό) και στη συνέχεια χαρακτηρίστηκαν αναλυτικότερα με βάση τις μορφολογικές, φυσιολογικές και βιοχημικές δοκιμές που αναφέρονται στον Πίνακα 2.

Οι απομονώσεις του σέλινου και τα ήδη ταυτοποιημένα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν συγκριτικά κατά τη διάρκεια της εργασίας, παρουσιάζονται στον Πίνακα 1.

ΠΙΝΑΚΑΣ 1. Βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη

Βακτηριακά στελέχη	Κωδικός συλλογής	Ξενιστής	Προέλευση
--------------------	------------------	----------	-----------

Απομονώσεις σέλινου			
1^η Ομάδα	250 -2 57, 262	Σέλινο	Αγρόκτημα Τ.Ε.Ι.
	275, 277 - 280	Σέλινο	Ηράκλειο-Τ.Ε.Ι.
2^η Ομάδα	258 -261	Σέλινο	Αγρόκτημα Τ.Ε.Ι.
	271 - 272	Σέλινο	Αγρόκτημα Τ.Ε.Ι.
	273 - 274, 276	Σέλινο	Ηράκλειο-Τ.Ε.Ι.
Στελέχη αναφοράς			
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>			
	263 -270	Πεπονιά (φύλλα)	Ηράκλειο
	204	Πασχαλιά	Μπενάκειο-Αθήνα
	228	Πεπονιά (στέλεχος)	Τυμπάκι
	249	Πορτοκαλιά	Ηράκλειο
<i>Pseudomonas viridiflava</i>			
	573	Μελιτζάνα	Ιεράπετρα
	565	Μελιτζάνα	Ιεράπετρα
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>			
	131	Τομάτα	Τυμπάκι-Μοίρες
	132	Τομάτα	Τυμπάκι-Μοίρες
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>lachrymas</i>			
	311	Πεπονιά	Λασίθι
<i>Pseudomonas corrugata</i>			
	1061	Τομάτα	Ηράκλειο
	1095	Τομάτα	Μπενάκειο-Αθήνα

2.2 Δοκιμές παθογένειας

Η παθογένεια των απομονωθέντων βακτηρίων εξετάστηκε αρχικά με την πραγματοποίηση τεχνητών μολύνσεων σε σπορόφυτα ηλικίας ενός μήνα και σε φυτά σέλινου ηλικίας 2-3 μηνών, σε καλλιέργεια θερμοκηπίου σε γλάστρες. Οι μολύνσεις έγιναν στα φύλλα των φυτών με την μέθοδο της έγχυσης βακτηριακού αιωρήματος με την βοήθεια σύριγγας. Η παρασκευή των αιωρημάτων έγινε σε απεσταγμένο νερό από καλλιέργεια 48 ωρών σε θρεπτικό υπόστρωμα King's B. Οι συγκεντρώσεις των αιωρημάτων που χρησιμοποιήθηκαν ήταν περίπου 10^7 cfu/ml. Τα φυτά καλύφθηκαν με σακούλες πολυαιθυλενίου για τη διατήρηση της υγρασίας σε επίπεδο κορεσμού και τοποθετήθηκαν στο θάλαμο ανάπτυξης στους 26°C . Μετά από 48 ώρες αφαιρέθηκαν οι σακούλες και τα φυτά παρέμειναν στο θάλαμο για επώαση σε συνθήκες υγρασίας (70-80 %) και θερμοκρασίας 26°C . Παρατηρήσεις λαμβάνονταν για τουλάχιστον δέκα ημέρες.

Η παθογένεια των απομονωθέντων βακτηρίων ελέγχθηκε σε άωρους καρπούς λεμονιάς, με έγχυση 50 μl βακτηριακού αιωρήματος συγκέντρωσης περίπου 10^6

cfu/ml, στο φλοιό, με την βοήθεια αποστειρωμένης σύριγγας. Οι καρποί λεμονιάς απολυμάνθηκαν με οινόπνευμα και ξεπλύθηκαν με απεσταγμένο και αποστειρωμένο νερό πριν την μόλυνση τους. Η παρασκευή των βακτηριακών αιωρημάτων έγινε όπως αναφέρθηκε προηγουμένως. Οι καρποί τοποθετήθηκαν σε σακούλες πολυαιθυλενίου μαζί με ενυδατωμένο χαρτί, για τη διατήρηση της υγρασίας και τοποθετήθηκαν στο θάλαμο επώασης σε θερμοκρασία 26 °C για διάστημα 10 ημερών.

Επιπλέον μολύνσεις πραγματοποιήθηκαν σε λοβούς φασολιάς με έγχυση βακτηριακού αιωρήματος στο φλοιό των καρπών με τη βοήθεια αποστειρωμένης σύριγγας. Ανάλογες μολύνσεις έγιναν και με την χρήση αποστειρωμένης οδοντογλυφίδας. Οι μολύνσεις έγιναν με παραλαβή καλλιέργειας των απομονωθέντων βακτηρίων σε θρεπτικό υπόστρωμα King's, 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 είχε προηγουμένως προστεθεί νερό για τη διατήρηση της υγρασίας. Τα δοχεία τοποθετήθηκαν στο θάλαμο ανάπτυξης σε συνθήκες υγρασίας και θερμοκρασίας ίδιες με αυτές που έχουν αναφερθεί και στις προηγούμενες μολύνσεις, όπου και παρέμειναν για 10 ημέρες.

Τέλος, έλεγχος της παθογένειας των απομονωθέντων βακτηρίων έγινε και σε ανεπτυγμένα φυτά φασολιάς (ενός μήνα) με έγχυση βακτηριακού αιωρήματος συγκέντρωσης 10^7 cfu/ml, στα φύλλα, με την βοήθεια σύριγγας. Τα φυτά τοποθετήθηκαν στο θάλαμο ανάπτυξης σε συνθήκες υγρασίας 60-70% και θερμοκρασία 27°C, όπου και παρέμειναν ως την τελική μέτρηση.

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

Το Μάρτιο του 2003 σε πειραματική καλλιέργεια σέλινου ποικιλίας Tall Utah σε διάφορα υποστρώματα κομπόστας, στο αγρόκτημα του Τ. Ε. Ι. Κρήτης στο

Ηράκλειο, εκδηλώθηκε μια ασθένεια με συμπτώματα που διαφοροποιούνταν από τις γνωστές μέχρι σήμερα ασθένειες του σέλινου.

Τα συμπτώματα περιορίζονται στη φυλλική επιφάνεια (εικόνες 1 - 4). Αρχικά παρατηρούνται μικρές υδαρείς, γωνιώδεις κηλίδες μεγέθους 2-5 mm, με χλωρωτικό περιθώριο, οι οποίες είναι εμφανείς και στις δυο πλευρές του φύλλου. Οι κηλίδες περιορίζονται συνήθως ανάμεσα στις νευρώσεις του φύλλου και για αυτό έχουν σχήμα γωνιώδες άλλα και κυκλικό. Σταδιακά, οι υδαρείς κηλίδες γίνονται νεκρωτικές, παίρνουν χρώμα καφέ, αφυδατώνονται και συνήθως αποκτούν παυρλώδη υφή. Σε συνθήκες υψηλής σχετικής υγρασίας η εξέλιξη της ασθένειας είναι ραγδαία, οι κηλίδες συνενώνονται, προκαλώντας τη μερική ή/και την πλήρη καταστροφή του φύλλου.

Αναφέρεται ότι στα φυτώρια οι προσβολές είναι πιο γρήγορες και πιο εκτεταμένες παρά στην καλλιέργεια στο χωράφι ή στο θερμοκήπιο όπου οι προσβολές συνήθως περιορίζονται στα παλαιότερα φύλλα. Όμως, όταν οι συνθήκες υγρασίας και θερμοκρασίας είναι ευνοϊκές για την ασθένεια, τα συμπτώματα της ασθένειας εξελίσσονται και εδώ ραγδαία.

Οι μύκητες *Cercospora apii* και *Septoria apiicola* προκαλούν αντίστοιχα τις ασθένειες Κερκοσπορίωση και Σεπτορίωση στο σέλινο και πολύ συχνά τα συμπτώματα τους συγχέονται με αυτά της βακτηριακής κηλίδωσης. Τα συμπτώματα της κερκοσπορίωσης εμφανίζονται στα φύλλα σαν μικρά, στρογγυλά στίγματα, που γρήγορα μεταχρωματίζονται και γίνονται καφέ. Το μέγεθος τους φτάνει το 1cm. Τα συμπτώματα της κερκοσπορίωσης εμφανίζονται νωρίτερα από αυτά της σεπτορίωσης και συχνά δεν είναι ευδιάκριτα. Τα συμπτώματα της σεπτορίωσης εμφανίζονται αργότερα από της κερκοσπορίωσης και αρχικά έχουν την μορφή μικρών καφέ-κόκκινων κηλίδων στα παλιά εξωτερικά φύλλα μεγέθους 3mm περίπου. Με την πάροδο του χρόνου οι κηλίδες γίνονται νεκρωτικές με τεφρόλευκο κέντρο, ευδιάκριτη καστανή περιφέρεια και περιβάλλονται από χλωρωτική άλω. Οι κηλίδες γρήγορα συνενώνονται καταλαμβάνοντας μεγάλη επιφάνεια του ελάσματος των φύλλων. Χαρακτηριστικό της ασθένειας είναι η δημιουργία πυκνιδίων στην επιφάνεια των φύλλων καθώς και στους μίσχους των φύλλων. Τα πυκνίδια είναι ορατά με γυμνό οφθαλμό και εμφανίζονται σαν μικρά μαύρα σωματίδια ενσωματωμένα στο κέντρο των κηλίδων. Η ύπαρξη των πυκνιδίων καθώς και η χρονική περίοδος που εμφανίζονται τα συμπτώματα της ασθένειας αποτελούν το μόνο τρόπο διαχωρισμού μεταξύ των δυο ασθενειών.

3.2 Απομόνωση και ταυτοποίηση του παθογόνου

Κατά τη διάρκεια της μελέτης στο εργαστήριο Βακτηριολογίας του Ι.Π.Φ.Η, πραγματοποιήθηκε μεγάλος αριθμός απομονώσεων από προσβεβλημένα φυτά σέλινου που παρουσίαζαν τα συμπτώματα της βακτηριακής κηλίδωσης. Οι πρώτες απομονώσεις έγιναν από τα φυτά στα οποία επισημάνθηκε η νέα ασθένεια, σε πειραματική καλλιέργεια στο αγρόκτημα του Τ. Ε. Ι. Ηρακλείου. Ακολούθησαν απομονώσεις από μολυσμένα φυτά που συλλέχθηκαν από Super-market της πόλης. Στις απομονώσεις εμφανίζονταν σταθερά δυο ειδών αποικίες βακτηρίων. Σε απομονώσεις που έγιναν σε θρεπτικό υπόστρωμα King's B, οι αποικίες των βακτηρίων τύπου A, ήταν χρώματος υπόλευκου, υπερυψωμένες, θολές, μουκώδεις, με κανονικό περίγυρο και οι αποικίες τύπου B ήταν αδιαφανείς, κιτρινωπές, κυρτές, γυαλιστερές, βλεννώδεις και παράγουν διαχεόμενη κυανή φθορίζουσα χρωστική. Όλες οι απομονώσεις χαρακτηρίστηκαν ως αρνητικές κατά Gram με τη δοκιμή της διαλυτότητας σε KOH και αερόβιες δηλαδή εμφάνισαν οξειδωτικό μεταβολισμό της D- γλυκόζης στο υλικό των Hugh et Leifson. Σε θρεπτικό υλικό NA-Sucrose 5%, όπου εξετάζεται η παραγωγή Levan, οι αποικίες τύπου A ήταν κυκλικές, χρώματος λευκού, βλεννώδους υφής, με ομαλό περιθώριο και διάμετρο 3-4mm μετά από 3 μέρες ανάπτυξης, γυαλιστερές και κυρτές δηλαδή χαρακτηριστικές της παραγωγής Levan. Οι αποικίες τύπου B στο ίδιο θρεπτικό υλικό, εμφάνιζαν σχήμα κυκλικό με ομαλά περιθώρια διαμέτρου 4-5mm, υπερυψωμένες, γυαλιστερές, βλεννώδους υφής αλλά είχαν χρώμα κιτρινωπό δηλαδή δεν εμφάνισαν τον φαινότυπο αποικιών της παραγωγής Levan.

Με βάση τις δοκιμές L.O.P.A.T (L- Levan, O- οξειδάση, P- σήψη πατάτας, A- διάσπαση αργινίνης, T- υπερευαισθησία καπνού) οι αποικίες τύπου A ταυτοποιήθηκαν σαν μέλη της ομάδας Ia των φθοριζουσών ψευδομονάδων και 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 (+). Οι αποικίες τύπου B εμφάνισαν το φαινότυπο : [- - + - +] δηλαδή παραγωγή Levan (-), παραγωγή οξειδάσης (-), πηκτινόλυση των κονδύλων της πατάτας (+), αναερόβια διάσπαση της αργινίνης (-), αντίδραση υπερευαισθησίας (+). Στην ομάδα αυτή ανήκει μόνο το είδος

P. viridiflava ως μέλη του οποίου ταυτοποιούνται οι απομονωθείσες αποικίες τύπου Β.

Με βάση τις παραπάνω προκαταρκτικές δοκιμές τα 14 από 23 στελέχη που μελετήθηκαν ταυτοποιούνται ως μέλη του είδους *P. syringae* και τα 9 ως μέλη του είδους *P. viridiflava*.

Στον Πίνακα 2, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της αναλυτικής φαινοτυπικής ταυτοποίησης σε επίπεδο παθοποιικιλίας. Παρατηρούμε ότι οι απομονώσεις του σέλινου αποικίας τύπου Α, εμφανίζουν όμοιο φαινοτυπικό προφίλ με τα ταυτοποιημένα στελέχη του *P. syringae* pv. *syringae*, και οι απομονώσεις του σέλινου αποικίας τύπου Β όμοιο με εκείνο του *P. viridiflava*. Τα στελέχη αναφοράς που χρησιμοποιήθηκαν στη διάρκεια του πειράματος εμφάνισαν τον φαινότυπο της ομάδας όπου ανήκουν.

3.3 Δοκιμές παθογένειας

3.3.1 Αντίδραση υπερευαισθησίας στον καπνό

Τα απομονωθέντα στελέχη εξετάστηκαν ως προς την αντίδραση υπερευαισθησίας και όλα έδωσαν τυπική αντίδραση υπερευαισθησίας σε διάστημα 24-48 h.

3.3.2 Τεχνητές μολύνσεις σε φυτά σέλινου

Οι εννέα απομονώσεις από το σέλινο (πέντε τύπου Α και τέσσερις τύπου Β) που επιλέχθηκαν για τις τεχνητές μολύνσεις προκάλεσαν την εκδήλωση των παρακάτω συμπτωμάτων σε διάστημα δέκα ημερών : Οι αρχικά υδαρείς κηλίδες, σταδιακά, εξελίχθηκαν σε νεκρωτικές με (εικόνες 5 & 6) ή χωρίς χλωρωτικό περιθώριο (εικόνα 7), συχνά περιοριζόμενες μεταξύ των νευρώσεων του φύλλου, χρώματος καφέ και κατά γενικό κανόνα ήσαν παρόμοιες με εκείνες που παρατηρήθηκαν κατά τις φυσικές μολύνσεις στην καλλιέργεια του φυτού. Δεν παρατηρήθηκε ουσιαστική διαφοροποίηση των συμπτωμάτων που εκδηλώθηκαν μεταξύ των δύο διαφορετικών βακτηρίων εντούτοις σημειώθηκε μια πιο γρήγορη εξέλιξη στην περίπτωση των στελεχών του *P. viridiflava*, με τις κηλίδες να είναι συνήθως μεγαλύτερες και συνήθως χωρίς χλωρωτική άλω.

ΠΙΝΑΚΑΣ 2. Ταυτοποίηση βακτηριακών απομονώσεων από τη βακτηριακή κηλίδωση του σέλινου

ΔΟΚΙΜΕΣ	ΑΠΟΜΟΝΩΣΕΙΣ ΣΕΛΙΝΟΥ		ΠΕΠΟΝΙΑ	<i>PSEUDOMONAS</i>			
	A	B		<i>viridiflava</i>	<i>syringae</i> pathovars		
					<i>syringae</i>	<i>tomato</i>	<i>lachrymas</i>
Κωδικός Στελέχους	250-257, 262, 277-279	258-261 271-276	263-270	573, 565	204, 228, 249	131, 132	311
<i>Αριθμός στελεχών</i>	12	10	8	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	-	-	-	-	-	-	-

ΔΟΚΙΜΕΣ	ΑΠΟΜΟΝΩΣΕΙΣ ΞΕΛΙΝΟΥ		ΠΕΠΟΝΙΑ	<i>PSEUDOMONAS</i>			
	A	B		<i>viridiflava</i>	<i>syringae</i> pathovars		
					<i>syringae</i>	<i>tomato</i>	<i>lachrymas</i>
Κωδικός Στελέχους	250-257, 262, 277-279	258-261 271-276	263-270	573, 565	204, 228, 249	131, 132	311
<i>Αριθμός στελεχών</i>	12	10	8	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	+	+	+	+	+	+	+

Τα στελέχη αναφοράς που χρησιμοποιήθηκαν στις μολύνσεις έδωσαν τα παρακάτω αποτελέσματα :

- Τα στελέχη από πεπονιά (228, 263, 264 & 270) του *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* δεν μολύναν τα φυτά του σέλινου στο διάστημα των δέκα ημερών, αφού δεν παρατηρήθηκε καμία εκδήλωση συμπτωμάτων.

- Στα στελέχη 204 (*Pseudomonas syringae* pv. *syringae*) από πασχαλιά, 311 (*P. syringae* pv. *lachrymans*) από πεπονιά και 491 (*P. savastanoi* ssp. *savastanoi*) από ελιά σε διάστημα 48h παρατηρήθηκε νέκρωση του ενυδατωμένου τμήματος, δηλαδή τυπική αντίδραση υπερευαισθησίας.

- Στα στελέχη 131 & 132 (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*) και στο στέλεχος 249 (*Pseudomonas syringae* pv. *syringae*) από πορτοκαλιά, παρατηρήθηκε μόνο ασθενής χλώρωση στις θέσεις μόλυνσης χωρίς καμία περαιτέρω εξέλιξη του συμπτώματος στο διάστημα των παρατηρήσεων.

- Στα στελέχη 565 & 573 του *Pseudomonas viridiflava* δεν παρατηρήθηκε μόλυνση.

3.3.3 Τεχνητές μολύνσεις σε καρπούς λεμονιάς

Άωροι καρποί λεμονιάς που μολύνθηκαν με τις απομονώσεις του σέλινου δεν έδωσαν το τυπικό σύμπτωμα της βυθισμένης κηλίδας (black pit : μαύρες βυθισμένες κηλίδες που επεκτείνονται μέχρι το albedo του καρπού). Από τα στελέχη αναφοράς τυπικά συμπτώματα του black pit προκάλεσαν τα στελέχη του *P. syringae* pv. *syringae* από πορτοκαλιά (249) και από πεπονιά (263, 264 και 270) και το στέλεχος 311 του *P. syringae* pv. *lachrymans*. Κανένα από τα στελέχη του *P. viridiflava*, από το σέλινο και τα στελέχη αναφοράς καθώς επίσης και τα στελέχη του *P. syringae* pv. *tomato* δεν εκδήλωσαν το παραπάνω σύμπτωμα.

3.3.4 Τεχνητές μολύνσεις σε φυτά και λοβούς φασολιάς

Καλά ανεπτυγμένα φυτά φασολιάς μολύνθηκαν τεχνητά με έκχυση βακτηριακού αιωρήματος με την βοήθεια σύριγγας. Η μόλυνση έγινε με ένεση στους παρεγχυματικούς ιστούς του 3 ή 4 πραγματικού φύλλου. Χρησιμοποιήθηκαν 9 στελέχη εκ των οποίων 4 (255, 257, 273, 274) προέρχονταν από τις αρχικές απομονώσεις από τα φυτά σέλινου της πειραματικής καλλιέργειας. Από τις παρατηρήσεις που πάρθηκαν σε διάστημα 10 ημερών φάνηκε ότι τα φυτά αντέδρασαν στις μολύνσεις με νέκρωση του ενυδατωμένου τμήματος (αντίδραση υπερευαισθησίας, εικόνα 8). Από τα υπόλοιπα στελέχη αναφοράς μόλυνση με έντονη περιφερειακή χλώρωση (εικόνα 9) έδωσαν τα 263 και 264 που ανήκουν στην ομάδα των *P. syringae* pv. *syringae*. Τα υπόλοιπα στελέχη αναφοράς (204, 249) της ομάδας των *P.s.s* από πασχαλιά και πορτοκαλιά καθώς και το στέλεχος 132 (*P. syringae* pv *tomato*) προκάλεσαν τυπική αντίδραση υπερευαισθησίας.

Στις μολύνσεις που πραγματοποιήθηκαν σε άωρους λοβούς φασολιάς εμφανίστηκαν 3 ομάδες συμπτωμάτων. Οι λοβοί που μολύνθηκαν με στελέχη της ευρύτερης ομάδας του *P. syringae* (συμπεριλαμβάνονται τα στελέχη του σέλινου) εκδήλωσαν ως σύμπτωμα καφέ κηλίδωση στις θέσεις μόλυνσης, χωρίς να αναπαραγάγουν ευδιάκριτα το τυπικό σύμπτωμα του brown spot, δηλαδή τη δημιουργία των χαρακτηριστικών καστανέρυθρων κυκλικών ή γωνιωδών βυθισμένων κηλίδων, που προκαλούν ορισμένα από τα στελέχη του βακτηρίου στους λοβούς φασολιάς. Η δεύτερη ομάδα συμπτωμάτων αφορά τα συμπτώματα που προκάλεσαν τα στελέχη της ομάδας του *P. viridiflava*. Οι λοβοί που μολύνθηκαν με τα στελέχη αυτά (από σέλινο και στελέχη αναφοράς) εμφάνισαν τις χαρακτηριστικές ερυθρό-πορτοκαλόχρες κηλίδες. Τέλος τα στελέχη 131, 132 (*P. syringae* pv. *tomato*) δεν μολύναν τους λοβούς, αφού όπως και ο μάρτυρας (μόλυνση με νερό) δεν εμφάνισαν κανένα σύμπτωμα (εικόνα 10).

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Από τα αποτελέσματα της εργασίας προκύπτει ότι τα συμπτώματα της βακτηριακής κηλίδωσης του σέλινου, που παρατηρήθηκε για πρώτη φορά στην Κρήτη και πιθανότατα στην Ελλάδα, προκαλείται από δύο φθορίζουσες ψευδομονάδες, το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *apii* και το βακτήριο *Pseudomonas viridiflava*. Το πρώτο αναφέρεται για πρώτη φορά ως παθογόνο στην Ελλάδα, ενώ το δεύτερο αποτελεί γνωστό ευκαιριακό παθογόνο διαφόρων καλλιεργούμενων φυτών (Goumas, 1998, 1999) και το οποίο απομονώνεται πολύ συχνά από διάφορα ασθενή φυτά. Το μορφολογικό, φυσιολογικό και βιοχημικό φαινοτυπικό προφίλ που παρουσίασαν οι απομονώσεις από το σέλινο δε φαίνεται ότι διαφοροποιείται ουσιαστικά από εκείνο των αντίστοιχων ταυτοποιημένων στελεχών των βακτηρίων *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* και *Pseudomonas viridiflava* που χρησιμοποιήθηκαν συγκριτικά στη παρούσα μελέτη. Με τους φαινοτυπικούς χαρακτήρες που χρησιμοποιήθηκαν δεν ήταν δυνατή η διαφοροποίηση των βακτηριακών στελεχών του σέλινου, από εκείνα του *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, από διάφορους άλλους ξενιστές. Από τις δοκιμές παθογένειας προκύπτει, ότι και τα δύο παθογόνα αναπαράγουν τα συμπτώματα της ασθένειας σε υγιή φυτά σέλινου σε συνθήκες εργαστηρίου. Επίσης, από τις ίδιες δοκιμές προκύπτει ότι οι απομονώσεις του *Pseudomonas syringae* από το σέλινο, δεν αναπαρήγαγαν τα συμπτώματα του black pit σε καρπούς λεμονιάς ή του brown spot σε λοβούς φασολιάς, γεγονός που θα τις ταξινομούσε στην παθοποικιλία *syringae*. Με βάση αυτά τα δεδομένα αλλά και την αντίδραση υπερευαισθησίας που εμφάνισαν σε φυτά φασολιάς, οι απομονώσεις του *Pseudomonas syringae* από το σέλινο εμφανίζουν περιορισμένο κύκλο

ξενιστών μεταξύ των οποίων συμπεριλαμβάνεται και το σέλινο με αποτέλεσμα να ταξινομούνται στην παθοποικιλία *apii*. Το βακτήριο *Pseudomonas viridiflava* απομονώνεται συχνά μόνο του ή σε συνδυασμό με άλλα παθογόνα βακτήρια από διάφορες ασθένειες καλλιεργούμενων φυτών στην Κρήτη. Φαίνεται να αποτελεί πλέον ένα σημαντικό μέλος της μικροχλωρίδας της φυλλόσφαιρας των φυτών το οποίο πιθανότατα εκδηλώνει την παθογένεια του κάτω από τις ιδιαίτερα ευνοϊκές συνθήκες υγρασίας που επικρατούν στις καλλιέργειες, όπως και στην περίπτωση της καλλιέργειας του σέλινου από την οποία απομονώθηκε.

Όπως προκύπτει από την ανασκόπηση της βιβλιογραφίας, για την αντιμετώπιση της ασθένειας επιβάλλεται η χρησιμοποίηση υγιούς σπόρου, η αποφυγή συνεχούς δΐγρανσης του φυλλώματος (πότισμα με τεχνητή βροχή) και εφαρμογής υψηλών δόσεων λίπανσης ιδιαίτερα σε άζωτο. Η ασθένεια είναι ιδιαίτερα επικίνδυνη στα φυτώρια, στα οποία τα μέτρα φυτουγείας θα πρέπει να είναι αυστηρά και να τηρούνται σχολαστικά. Οι προσβολές που παρατηρήθηκαν στην Κρήτη, πιθανότατα προέρχονται από μολυσμένο σπόρο γιατί στο συγκεκριμένο θερμοκήπιο γινόταν πρώτη φορά καλλιέργεια σέλινου με στάγδην άρδευση. Μια πληρέστερη εικόνα για την σημασία του παθογόνου στην καλλιέργεια του σέλινου θα μπορούσε να δοθεί μόνο με μια συστηματική επισκόπηση της στις περιοχές καλλιέργειας.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Crosse, J. E. 1959. Bacterial canker of stone-fruits. IV. Investigation of a method for measuring the inoculum potential of cherry trees. *Ann. Appl. Biol*, 47: 306-317
2. Goumas D.E. and Chatzaki A.K. 1998. Characterization and host range evaluation of *Pseudomonas viridiflava* from melon, blite, tomato, chrysanthemum and eggplant. *European Journal of Plant Pathology*, 104, 181-188.
3. Goumas D.E., Malathrakis N.E. and Chatzaki A.K. 1999. Characterization of *Pseudomonas viridiflava* associated with a new symptom on tomato fruit. *European Journal of Plant Pathology*, 105, 927-932.
4. Hirano S. S. and Upper C.D., 2000. Bacteria in the leaf ecosystem with emphasis on *Pseudomonas syringae* - a pathogen ice nucleus and epiphyte. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 624-653.
5. Jagger, I. C. 1921. Bacterial leaf spot disease of celery. *J. Agric.Res.* 21: 185 -188
6. Koike, S. T., and Bishop, A. L. 1990. Bacterial leaf spot of celery caused by *Pseudomonas syringae* pv. *apii* in California (Abstr.) *Phytopathology* 80: 890
7. Little E. L., Bostock R. M, and B. C. Kirkpatrick 1998. Genetic characterization of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* strains from stone-fruits in California. *Applied and Environmental Microbiology*, 3818-3823
8. Little, E. L., Koike, S. T., and Gilbertson, R. L. 1997. Bacterial leaf spot of celery in California: Etiology, epidemiology, and role of contaminated seed. *Plant Dis.* 81: 892-896
9. Schaad, N. W., Jones, J. B., and Chun, W., Third edition 2001. Laboratory guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. Pages : 84-987.
10. Sherf, A. F., and Macnab, A. A., eds. 1986. Northern bacterial blight of celery. Pages 157-158 in : *Vegetable Diseases and Their Control*. 2nd ed. John Wiley and Sons, New York
11. Upper, C. D., and Vali. 1995. The discovery of bacterial ice nucleation and its role in the injury of plants by frost, p. 29-39. In R. E. Lee,Jr., G. J. Warren, and L. V. Gusta (ed.), *Biological ice nucleation and its applications*. American Phytopathological Society, St. Paul, Minn.
12. Yoshimura, F. 1982. Phylloplane bacteria in a pine forest. *Can. J. Microbiol.*28: 580-592
13. Young, J. M. 1991. Pathogenicity and identification of the lilac pathogen, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* van Hall 1902. *Ann. Appl. Biol.*

6. ΦΩΤΟΓΡΑΦΙΚΟ ΥΛΙΚΟ



Εικόνες 1-4. Συμπτώματα της ασθένειας βακτηριακή κηλίδωση του σέλιου



Εικόνα 5 & 6. Τεχνητές μολύνσεις σε φύλλα σέλινου με στελέχη του *Pseudomonas syringae* pv. *apii*



Εικόνα 7. Τεχνητή μόλυνση σέλινου με στελέχη *Pseudomonas viridiflava*



Εικόνες 8 - 10. Τεχνητές μολύνσεις σε φυτά και λοβούς φασολιάς με στελέχη του *Pseudomonas syringae* pv. *apii* και *Pseudomonas viridiflava*