

**Α.Τ.Ε.Ι. ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ ΕΠΙΛΟΓΗΣ
“ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗ ΓΕΩΡΓΙΚΩΝ ΟΙΚΟΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ”**

Πτυχιακή Μελέτη

**ΕΠΙΣΚΟΠΗΣΗ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ ΓΑΡΙΦΑΛΙΑΣ
ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΟΥ ΒΑΚΤΗΡΙΟΥ
ERWINIA CHRYSANTHEMI.**



**Σπουδάστρια: Βαρδάκη Ε. Χριστίνα
Εισηγητής: Δρ Γκούμας Ε. Δημήτριος**

ΗΡΑΚΛΕΙΟ, ΙΟΥΝΙΟΣ 2003

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ	3
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	4
1.1 Το φυτό γαριφαλιά (<i>Dianthus caryophyllus</i>)	4
1.1.1 Γενικά	4
1.1.2 Οικονομική σημασία	4
1.2 Η ασθένεια: Βακτηριακός νανισμός γαριφαλιάς	5
1.2.1 Γενικά για την ασθένεια	5
1.2.2 Το παθογόνο	6
1.2.3 Τα συμπτώματα	7
1.2.4 Μετάδοση του παθογόνου	8
1.2.5 Μέτρα αντιμετώπισης του παθογόνου	8
1.2.6 Σκοπός της μελέτης	9
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	9
2.1 Δειγματοληψία από καλλιέργειες γαριφαλιάς	9
2.2 Απομόνωση και ανίχνευση του παθογόνου	11
2.2.1 Προετοιμασία δειγμάτων	11
2.2.2 Μεθοδολογία απομόνωσης του βακτηρίου από ροδέλα φυτικού ιστού	12
2.2.3 Μεθοδολογία ανοσοφθορισμού	12
3.1 Προκαταρτικές δοκιμές ταυτοποίησης των απομονώσεων	13
3.1.1 Εξέταση φθορισμού σε θρεπτικό υπόστρωμα AF	13
3.1.2 Δοκιμή αναεροβίωσης	14
3.1.3 Αντίδραση υπερευαισθησίας σε φυτά καπνού	14
4.1 Ταυτοποίηση του παθογόνου	14
4.1.1 Εξέταση βιοχημικού και φυσιολογικού φαινότυπου των απομονώσεων	14
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	15
5.1 Δειγματοληψία – Απομόνωση και ανίχνευση του παθογόνου	15
5.2 Ταυτοποίηση των απομονώσεων του βακτηρίου	20
5.2.1 Προκαταρτική ταυτοποίηση απομονώσεων του παθογόνου από τα στελέχη γαριφαλιάς	20
5.2.2 Ταυτοποίηση σε επίπεδο είδους και παθοποικιλίας	20
5.3 Ανοσοφθορισμός	22
ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	24

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η εργασία αυτή έχει σκοπό την ανίχνευση του βακτηρίου *Erwinia chrysanthemi* σε καλλιέργειες γαριφαλιάς στην Κρήτη και έγινε στα πλαίσια του Φυτουγειονομικού Ελέγχου καλλιεργειών γαριφαλιάς που διεξήγαγε το Περιφερειακό Κέντρο Προστασίας Φυτών και Ποιοτικού Ελέγχου Ηρακλείου (Π.Κ.Π.Φ. & Π.Ε.Η). Δείγματα πάρθηκαν από τις περιοχές Τυμπακίου, Χερσονήσου και Ρεθύμνου. Η πλειοψηφία των δειγμάτων ανήκε στην ποικιλία Frantzesco όπου ανιχνεύθηκε αρχικά η παρουσία του παθογόνου.

Στο πειραματικό μέρος αναφέρονται οι εργασίες που έγιναν για τη συλλογή των δειγμάτων, την απομόνωση του παθογόνου με τη μεθοδολογία της ροδέλας από φυτικά στελέχη και τη μεθοδολογία του ανοσοφθορισμού και τέλος τις εργασίες για την ταυτοποίηση των απομονώσεων σε επίπεδο είδους και παθοποικιλίας.

Η διεξαγωγή του πειράματος έγινε στο Εργαστήριο Βακτηριολογίας του Ινστιτούτου Προστασίας Φυτών υπό την καθοδήγηση του Δρ. Δ. Γκούμα, τον οποίο θα ήθελα να ευχαριστήσω για τις γνώσεις που μου προσέφερε και για την υλική και ηθική βοήθεια του για τη διεκπεραίωση της πτυχιακής μου εργασίας. Θα ήθελα να ευχαριστήσω ακόμα τον διευθυντή του Π.Κ.Π.Φ. & Π.Ε. Ηρακλείου, κύριο Ι. Παντουβάκη και τους γεωπόνους Φυτουγειονομικού Ελέγχου της ίδιας υπηρεσίας, Μ. Αγγελάκη, Ι. Τρουλλάκη, Α. Τζειρανάκη και Μ. Παπαδημητράκη για την βοήθεια και την συμπαράσταση τους σε όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της πτυχιακής μου εργασίας.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την Καρύδη Εμμανουέλλα και την Ξανθάκη Ευαγγελία για την εργαστηριακή βοήθεια τους στην διεξαγωγή του πειράματος μου.

Επισκόπηση καλλιεργειών γαριφαλιάς για την ανίχνευση του βακτηρίου *Erwinia chrysanthemi*.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Το φυτό γαριφαλιά (*Dianthus caryophyllus*)

1.1.1 Γενικά

Η γαριφαλιά (*Dianthus caryophyllus*), ανήκει στην οικογένεια Caryophyllaceae και είναι φυτό ποώδες πολυετές και ημιξυλώδης. Είναι ιθαγενές φυτό των χωρών της Μεσογείου και η καλλιέργεια καθώς και η χρήση της είναι γνωστή από την Αρχαία Ελλάδα. Το επιστημονικό όνομα, Διάνθος ο καρυόφυλλος είναι ελληνικό και σημαίνει άνθος του Δία με φύλλα με άρωμα κανέλας. Ακόμα και η αγγλική του ονομασία carnation προήλθε από την συντόμευση της λέξης coronation που σημαίνει στέψη, επειδή οι αρχαίοι Έλληνες έστεφαν τους αθλητές με στέφανα από άνθη γαριφαλιάς.

Η επιχειρηματική καλλιέργεια της σε θερμοκήπια άρχισε στις Η.Π.Α. γύρω στα μισά του 20^{ου} αιώνα και επεκτάθηκε γρήγορα σε άλλες χώρες όπως Κολομβία, Κένυα, Μεξικό, Αυστραλία, Ισραήλ, Νότια Γαλλία, Ιταλία, Ισπανία και αργότερα στην Ελλάδα. Στη Νότια Ευρώπη και στη χώρα μας το γαρύφαλλο κατέχει σήμερα την πρώτη θέση στην καλλιέργεια των κομμένων λουλουδιών.

1.1.2 Οικονομική σημασία

Στη χώρα μας η επιχειρηματική καλλιέργεια της γαριφαλιάς έχει περισσότερα από είκοσι πέντε χρόνια ζωής και σήμερα ξεπερνά τα 1500 στρ. σε θερμοκήπια και στο ύπαιθρο. Την τελευταία δεκαετία οι θερμοκηπιακές εκτάσεις πολλαπλασιάστηκαν σε βάρος των υπαίθριων.

Το κυριότερο κέντρο παραγωγής είναι η Κρήτη και κυρίως η περιοχή Χερσονήσου, όπου πρωτοξεκίνησε η καλλιέργεια της και αργότερα επεκτάθηκε στη Μεσσαρά, στο Ρέθυμνο και τελευταία στην περιοχή Θραψανού, Αυλής, Γαρύπας κλπ.. Ακολουθεί η Αττική στις περιοχές Μαραθώνα, Μενιδίου,

Αυλώνας, η Πελοπόννησος στις περιοχές Γαλατά και Καλλονής Τροιζηνίας και τέλος η Μακεδονία. Ενδεικτικά αναφέρετε ότι στα στοιχεία που καταγράφηκαν από το 1984 μέχρι το 1992 παρατηρείτε μείωση της καλλιεργούμενης έκτασης και κατά συνέπεια και της παραγωγής που μεταφράζεται στο 20% περίπου. Αναλυτικά τα στοιχεία έχουν ως εξής:

Πίνακας 1: Έκταση και παραγωγή καλλιεργειών γαριφαλιάς στην Ελλάδα από το 1984 μέχρι το 1992.

Έτη	1984	1988	1992
Έκταση(στρ.)	1866	1762	1707
Παραγωγή(εκατ. Τεμάχια)	234	230	218

Στην Κρήτη καλλιεργούνται περίπου 750 στρέμματα με μέση απόδοση πάνω από 100.000.000 γαρίφαλα ετησίως. Η στρεμματική απόδοση στις θερμοκηπιακές καλλιέργειες κυμαίνεται από 140-180 χιλιάδες γαρίφαλα το χρόνο ενώ των υπαίθριων από 120-140 χιλιάδες. Οι φυτείες είναι κυρίως μονοετείς ή διετείς και σπάνια τριετείς. Οι ποικιλίες που καλλιεργούνται στην Ελλάδα είναι κατά 80-90% τύπου STANDARD (μονοανθή) ενώ οι υπόλοιπες 10-15% είναι τύπου SPRAY (πολυανθή). Η ζήτηση και η παραγωγή των γαριφάλων τύπου SPRAY, αυξάνεται χρόνο με το χρόνο και αυτό γιατί απαιτούν λιγότερα εργατικά, είναι πιο παραγωγικά, έχουν λεπτότερο άρωμα και μεγαλύτερη διάρκεια ζωής στο βάζο.

Το γαρίφαλο είναι από τα λίγα ανθοκομικά Ελληνικά προϊόντα που εξάγονται σε διάφορες χώρες της Ευρώπης όπως Ολλανδία, Αγγλία, Γερμανία, Αυστρία, Σκανδιναβικές χώρες, Η.Π.Α., Καναδά, Ιαπωνία και Αραβικά Εμιράτα (Παπαδημητρίου 2000).

1.2 Η ασθένεια: Βακτηριακός νανισμός της γαριφαλιάς

1.2.1 Γενικά για την ασθένεια

Πρόκειται για ασθένεια κατά την οποία το παθογόνο εγκαθίστανται στην ηθμαγγειώδη μοίρα του βλαστού και προκαλεί συμπτώματα έλλειψης νερού,

νανισμό, ημιπληγία και αποξήρανση βλαστών και ολόκληρου του φυτού. Η ασθένεια αυτή παρατηρήθηκε πρώτη φορά στην Ολλανδία το 1951 από τους Backer και Scolten και αποδόθηκε λανθασμένα όπως αποδείχθηκε αργότερα στο βακτήριο *Pseudomonas caryophylli*. Στην Ελλάδα παρατηρήθηκε το Σεπτέμβριο του 1976, στην περιοχή Καλλονή Τροιζηνίας στην Ανατολική Πελοπόννησο, σε αγρό που είχε φυτευτεί τον Αύγουστο του ίδιου χρόνου με έρριζα μοσχεύματα που είχαν εισαχθεί από την Ολλανδία. Στην περιοχή της Κρήτης από το 1985 και μετά το *Erwinia chrysanthemi* έχει απομονωθεί αρκετές φορές σε μεμονωμένα φυτά από καλλιέργειες γαριφαλιάς και από έρριζα μοσχεύματα εγχώριας ή ξένης παραγωγής χωρίς όμως να προκαλεί σημαντικό οικονομικό πρόβλημα (Γκούμας, προσωπική επικοινωνία).

Τον Αύγουστο του 2002 καλλιεργητές γαριφαλιάς από την περιοχή της Χερσονήσου του Ν. Ηρακλείου προσκόμισαν στο εργαστήριο Βακτηριολογίας του Ινστιτούτου Προστασίας Φυτών Ηρακλείου, φυτά γαριφαλιάς με τυπικά συμπτώματα προσβολής από το βακτήριο *Erwinia chrysanthemi* pv. *Dianthicola* που προκαλεί στο φυτό την ασθένεια του "βακτηριακού νανισμού". Από τα ασθενή φυτά γαριφαλιά από διάφορους καλλιεργητές, απομονώθηκε σε καθαρή καλλιέργεια το παραπάνω βακτήριο.

1.2.2 Το παθογόνο

Η ασθένεια οφείλεται στο βακτήριο *Erwinia chrysanthemi* pv. *dianthicola* (Hellmers) Dickey, συν. *Erwinia chrysanthemi* pv. *dianthi* Alivizatos, *Erwinia carotovora* var. *chrysanthemi*, *Pectobacterium partheni* var. *dianthicola* Hellmers. Πρόκειται για ένα αρνητικό κατά Gram και περίτριχο βακτήριο. Το *Erwinia chrysanthemi* Burkholder *et al* (1953) ανήκει στην οικογένεια των Enterobacteriaceae και στην ομάδα των πηκτινολυτικών φυτοπαθογόνων ειδών του γένους *Erwinia*.

Ο Dickey το 1979 αναγνωρίζει το παθογόνο σαν ξεχωριστή παθοποικιλία (pv. *dianthicola*) του είδους *Erwinia chrysanthemi*. Το 1981 ο ίδιος ερευνητής προτείνει λόγω της έλλειψης στοιχείων που αφορούν το εύρος των ξενιστών των απομονώσεων του *Erwinia chrysanthemi* ότι είναι καλύτερα προς το παρόν να

αποφεύγεται η χρήση του όρου *pathovar* για τα στελέχη του. Αντί αυτού του όρου προτείνει όπως και οι Janse & Ruissen (1988), την υπόδειξη του ξενιστή από τον οποίο απομονώθηκε αρχικά το βακτηριακό στέλεχος (π.χ. *Erwinia chrysanthemi* carnation strain).

Στην Ελλάδα έχει απομονωθεί από κυκλάμινο και αραβόσιτο από τους Παναγόπουλο & Ψαλλίδα (1970), από γαριφαλιά (1979), τομάτα (1985), *Dieffenbachia* (1987), *Philodendron* (1987), *Cucurbita* sp. (1987) και πιπεριά (1989) από τον Αλιβιζάτο και από μπανάνα (1987), ουσικτόνια, πιπεριά και πατάτα (2002) από τον Γκούμα. Προσβάλλει επίσης τα φυτά *Begonia intermedia*, *Chrysanthemum maximum*, *Dahlia pinnata*, *Daucus carota*, *Dianthus barbatus*, *Sedum spectabile*.

1.2.3 Τα συμπτώματα

Το πιο χαρακτηριστικό σύμπτωμα της ασθένειας είναι ο έντονος νανισμός των νέων βλαστών του φυτού. Τα προσβλημένα φυτά μεγαλώνουν αργά και σταδιακά εκδηλώνουν συμπτώματα μάρανσης. Τα φύλλα των προσβλημένων βλαστών είναι χλωρωτικά, στενότερα από τα κανονικά και συχνά σχηματίζουν ρόδακα λόγω της έντονης βραχυγονάτωσης. Συνήθως έχουν λίγες ρίζες και παρουσιάζουν υγρή σήψη όταν εκδηλωθεί η μόλυνση. Σε επιμήκεις τομές των βλαστών διακρίνεται καστανός και κατά θέσεις υδατώδεις μεταχρωματισμός των αγγείων του ξύλου. Σε προχωρημένο στάδιο της προσβολής προκαλείται καταστροφή των ιστών και σχηματισμός σωληνοειδών κοιλοτήτων εντός των βλαστών, οι οποίοι τελικά ξηραίνονται (Εικόνες 1, 2, 3, 4).

Σε περίπτωση ελαφριάς μόλυνσης τα φυτά επιζούν και παράγουν βλαστούς εμφανίζοντας νανισμό και με φύλλα στενότερα του κανονικού. Οι βλαστοί αυτοί εμφανίζονται εξωτερικά διογκωμένοι, κυρίως στη βάση, λόγω του πολλαπλασιασμού των κυττάρων γύρω από τα ασθενή αγγεία.

Τα μοσχεύματα με έντονη προσβολή εμφανίζουν υγρή σήψη στη βάση και σύντομα ξηραίνονται χωρίς να ριζοβολήσουν. Όταν η προσβολή είναι ελαφριά, τα μοσχεύματα ριζοβολούν κανονικά, φυτεύονται μαζί με τα υγιή φυτά και εκδηλώνουν αργότερα την ασθένεια.

Παρόμοια συμπτώματα εμφανίζονται και στις προσβολές του φυτού από το βακτήριο *Pseudomonas caryophylli* που προκαλεί μια ασθένεια γνωστή ως βακτηριακό έλκος ή βακτηριακή μάρανση. Χαρακτηριστικό της σύμπτωμα, που αποτελεί και στοιχείο διάκρισης από το βακτηριακό νανισμό είναι ο σχηματισμός ανοικτών ελκών στο ύψος των κόμβων του βλαστού.

1.2.4 Μετάδοση του παθογόνου

Η ασθένεια μεταδίδεται κυρίως με τα μοσχεύματα που λαμβάνονται από προσβλημένα μητρικά φυτά. Από τις τομές των μοσχευμάτων αυτών εξέρχονται τα βακτήρια κατά τη διάρκεια της ριζοβολίας των μοσχευμάτων μέσα στα υγρά διαλύματα ή στα κιβώτια ριζοβολίας και στη συνέχεια μεταφέρονται με το νερό και μολύνουν τα κοντινά τους υγιή μοσχεύματα .

Το παθογόνο μεταδίδεται επίσης και με τα υπολείμματα της καλλιέργειας. Η είσοδος του παθογόνου στα υγιή φυτά γίνεται από πληγές. Η άριστη θερμοκρασία για την μετάδοση της ασθένεια είναι μεταξύ 25-27°C, το παθογόνο όμως αναπτύσσεται και σε χαμηλότερες θερμοκρασίες (10-15 °C).

1.2.5 Μέτρα αντιμετώπισης του παθογόνου

Τα χημικά μέσα που υπάρχουν δεν είναι αποτελεσματικά για την αντιμετώπιση της ασθένειας. Δεδομένου ότι η αντιμετώπιση του βακτηριακού νανισμού της γαριφαλιάς σε εγκατεστημένη καλλιέργεια είναι πρακτικά ανέφικτη κρίνεται αναγκαία η απομάκρυνση και καταστροφή των μολυσμένων φυτών μόλις αυτά εντοπισθούν, καθώς και η άμεση καταστροφή των συμπτωματικών και των ασυμπτωματικών φυτών της προσβλημένης ποικιλίας. Στα αγροτεμάχια στα οποία διαπιστώνεται εργαστηριακά η παρουσία του βακτηρίου προτείνεται αγρανάπαυση δύο χρόνων και ενδιάμεση εφαρμογή ζιζανιοκτονίας. Τα βακτήρια μπορούν να επιβιώσουν στα υπολείμματα της καλλιέργειας καθώς και στο έδαφος για μεγάλο χρονικό διάστημα. Γι' αυτό συνίσταται η καταστροφή των μολυσμένων υπολειμμάτων και η απολύμανση του εδάφους με βρωμιούχο μεθύλιο. Τέλος, κρίνεται αναγκαία η απολύμανση των εργαλείων, των υλικών και

μέσων που χρησιμοποιήθηκαν στην προσβλημένη καλλιέργεια (δίκτυα υποστήριξης, στύλοι θερμοκηπίου κ.λ.π.).

Οι προσπάθειες καταπολέμησης της ασθένειας επικεντρώνονται κυρίως στα προληπτικά μέτρα και ιδιαίτερα στην χρήση υγιούς πολλαπλασιαστικού υλικού το οποίο προέρχεται από τελείως υγιείς μητρικές φυτείες. Απαραίτητος είναι, τέλος, ο συνεχής έλεγχος των μητρικών φυτειών.

1.2.6 Σκοπός της μελέτης

Η παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια του προγράμματος "Επισκόπηση καλλιεργειών γαριφαλιάς στην Κρήτη για την ανίχνευση του βακτηρίου *Erwinia chrysanthemi* pv. *dianthicola*" από το Εργαστήριο Βακτηριολογίας του Ινστιτούτου Προστασίας Φυτών Ηρακλείου (Ι.Π.Φ.Η.) και το Περιφερειακό Κέντρο Προστασίας Φυτών Και Ποιοτικού Ελέγχου Ηρακλείου (Π.Κ.Π.Φ. & Π.Ε.Η), με σκοπό τη διαπίστωση της έκτασης της προσβολής των καλλιεργειών γαριφαλιάς από το παθογόνο στην Κρήτη μετά την εκτεταμένη εμφάνιση της ασθένειας στην περιοχή Χερσονήσου.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Δειγματοληψία από καλλιέργειες γαριφαλιάς

Δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκαν σε 15 ποικιλίες του Γερμανικού οίκου SELECTA από 152 περίπου στρέμματα υπαίθριας και θερμοκηπιακής καλλιέργειας γαριφαλιάς. Δείγματα πάρθηκαν από είκοσι επτά παραγωγούς γαριφάλων (συνολικά από εξήντα έξι αγροτεμάχια), από τις περιοχές Χερσονήσου, Τυμπακίου και Ρεθύμνου. Η δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε σε καλλιέργειες στις οποίες είχε εκδηλωθεί η ασθένεια. Σε όλες τις περιπτώσεις η φύτευση των αγροτεμαχίων είχε γίνει την περίοδο Μαΐου – Ιουνίου και η εκδήλωση της ασθένειας παρουσιάστηκε τους επόμενους δύο μήνες.

Από κάθε αγροτεμάχιο συλλέχθηκαν τέσσερα έως πέντε φυτά, με συμπτωματολογία παρόμοια εκείνης του βακτηριακού νανισμού της γαριφαλιάς

και τα οποία στη συνέχεια αποτέλεσαν ένα δείγμα. Για κάθε δείγμα σημειωνόταν, η έκταση και η τοποθεσία καλλιέργειας και τέλος η ποικιλία (Πίνακας 2). Τα δείγματα μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο και διατηρήθηκαν σε ψυκτικό θάλαμο σε θερμοκρασία 4⁰C, μέχρι την περαιτέρω εξέτασή τους.

Πίνακας 2: Ποικιλία - τοποθεσία καλλιέργειας και έκταση αγροτεμαχίου ανά εξεταζόμενο δείγμα.

ΚΩΔΙΚΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	ΠΟΙΚΙΛΙΑ	ΤΟΠΟΘΕΣΙΑ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ	ΕΚΤΑΣΗ (στρ.)
1-1	FRANTZESCO	Χερσόνησος	2,5
1-2	PINK FRANTZESCO	Χερσόνησος	2
2-1	FRANTZESCO	Χερσόνησος	1,5
2-2	PINK FRANTZESCO	Χερσόνησος	1,5
3-1	PINK FRANTZESCO	Χερσόνησος	2
4-1	CONDOR	Χερσόνησος	1
5-1	FRANTZESCO	Χερσόνησος	2
5-2	PINK FRANTZESCO	Χερσόνησος	2
6-1	FRANTZESCO	Γούβες	2
6-2	PINK FRANTZESCO	Γούβες	2
7-1	TASMAN	Χερσόνησος	2
7-2	SR1006	Χερσόνησος	2
7-3	ALMA	Χερσόνησος	2
7-4	FRANTZESCO	Χερσόνησος	0,6
7-5	SAN LIGHT	Χερσόνησος	0,7
8-1	FRANTZESCO	Ρέθυμνο	5
9-1	FRANTZESCO	Ρέθυμνο	0,5
9-2	FRANTZESCO	Ρέθυμνο	-
10-1	6161	Χερσόνησο	2,2
10-2	6161	Χερσόνησος	2,7
10-3	WIZZARD	Χερσόνησος	1,5
10-4	DOLCE VITA	Χερσόνησος	2,7
10-5	FRANTZESCO	Χερσόνησος	3
10-6	PINK FRANTZESCO	Χερσόνησος	3
11-1	FRANTZESCO	Χερσόνησος	3
11-2	PINK FRANTZESCO	Χερσόνησος	3
12-1	6161	Χερσόνησος	1
13-1	PINK FRANTZESCO	Τυμπάκι	3
13-2	FRANTZESCO	Τυμπάκι	-
14-1	FRANTZESCO	Τυμπάκι	3
14-2	PINK FRANTZESCO	Τυμπάκι	-
15-1	PINK FRANTZESCO	Τυμπάκι	
15-2	FRANTZESCO	Τυμπάκι	5
16-1	PINK FRANTZESCO	Τυμπάκι	3,5

ΚΩΔΙΚΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	ΠΟΙΚΙΛΙΑ	ΤΟΠΟΘΕΣΙΑ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ	ΕΚΤΑΣΗ (στρ.)
16-2	FRANTZESCO	Τυμπάκι	7,5
17-1	FRANTZESCO	Τυμπάκι	-
17-2	PINK FRANTZESCO	Τυμπάκι	7
18-1	PINK FRANTZESCO	Μαγαρικάρι	15
18-2	FRANTZESCO	Μαγαρικάρι	-
18-3	FRANTZESCO (Άσπρο)	Μαγαρικάρι	-
19-1	FRANTZESCO (Άσπρο)	Τυμπάκι	-
19-2	PINK FRANTZESCO	Τυμπάκι	10
19-3	FRANTZESCO	Τυμπάκι	-
20-1	FRANTZESCO (Άσπρο)	Τυμπάκι	6
20-2	PINK FRANTZESCO	Τυμπάκι	-
20-3	FRANTZESCO	Τυμπάκι	-
21-1	DONA	Χερσόνησος	2
21-2	SAN LIGHT	Χερσόνησος	2
21-3	6161	Χερσόνησος	2
21-4	LEILA	Χερσόνησος	2
22-1	LEILA	Χερσόνησος	0,5
22-2	P. LEILA	Χερσόνησος	0,5
23-1	Διάφορες Mini ποικιλίες	Καστέλι	1,5
24-1	FRANTZESCO	Χερσόνησος	3
24-2	PINK FRANTZESCO	Χερσόνησος	5,5
24-3	CONDOR	Χερσόνησος	5,5
24-4	FRANTZESCO	Χερσόνησος	5,5
24-5	PINK FRANTZESCO	Χερσόνησος	3
25-1	LEILA σκούρο	Χερσόνησος	1
25-2	FELITSA	Χερσόνησος	1
25-3	LEILA κίτρινο	Χερσόνησος	1
26-1	FELITSA	Χερσόνησος	0,5
26-2	LEILA	Χερσόνησος	0,5
26-3	F.LEILA	Χερσόνησος	0,5
27-1	LEILA	Χερσόνησος	0,5

2.2 Απομόνωση και ανίχνευση του παθογόνου

2.2.1 Προετοιμασία δειγμάτων

Αρχικά, τα φυτά κάθε δείγματος καθαρίστηκαν καλά από τα υπολείμματα του χώματος και πλύθηκαν με άφθονο νερό. Στη συνέχεια επανεξετάστηκαν, με προσοχή, για την παρουσία μακροσκοπικών συμπτωμάτων, τα οποία καταγράφηκαν αναλυτικά για κάθε δείγμα (Πίνακας 3).

Στη συνέχεια, τα δείγματα κωδικοποιήθηκαν και έπειτα επιλέγηκαν δώδεκα βλαστοί από κάθε δείγμα (4-5 φυτά), των οποίων η βάση καθαρίστηκε από τυχόν φύλλα που υπήρχαν στο βλαστό. Η βάση κάθε βλαστού απολυμάνθηκε με αλκοόλη 90%. Με τη βοήθεια ενός νυστεριού και υπό ασηπτικές συνθήκες κόπηκαν από τη βάση του κάθε βλαστού τρεις ροδέλες από τις οποίες η πρώτη πετάχτηκε, η δεύτερη εξετάστηκε με τη μεθοδολογία της ροδέλας και η τρίτη τοποθετήθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS για 24 ώρες και στο εκχύλισμα ανιχνεύθηκε η παρουσία ή μη του βακτηρίου με τη μεθοδολογία του ανοσοφθορισμού.

2.2.2 Μεθοδολογία απομόνωσης του βακτηρίου από τη ροδέλα φυτικού ιστού.

Η δεύτερη σειρά από τις ροδέλες που κόπηκαν από κάθε βλαστό τοποθετήθηκαν, με τη βοήθεια αποστειρωμένης λαβίδας και κάτω από ασηπτικές συνθήκες σε τριβλίο με θρεπτικό υπόστρωμα NAG (Nutrient Glucose Agar). Για κάθε δείγμα χρησιμοποιήθηκαν δώδεκα ροδέλες από διαφορετικούς βλαστούς από τα 4-5 φυτά του κάθε δείγματος. Τα τριβλία επώαστηκαν για 48 ώρες, σε θάλαμο επώασης σε θερμοκρασία 28°C. Στην συνέχεια η παρουσία του *Erwinia chrysanthemi* σε κάθε δείγμα, διαπιστώθηκε από την τυπική μορφή της καλλιέργειάς του, η οποία αναπτύχθηκε γύρω από κάθε ροδέλα. Οι ροδέλες στις οποίες αναπτύχθηκε κάποιο μόλυσμα ή δεν αναπτύχθηκε τίποτα θεωρήθηκαν υγιείς. Η χαρακτηριστική μορφή της ανάπτυξης του *Erwinia chrysanthemi* γύρω από τις ροδέλες παρουσιάζεται στην Εικόνα .

2.2.3 Μεθοδολογία του ανοσοφθορισμού

Σε καθαρή αντικειμενοφόρο πλάκα 10 θέσεων τοποθετήθηκε σε κάθε θέση 15μl βακτηριακού αιωρήματος ή εκχυλίσματος φυτικών ιστών γαριφαλιάς και αφέθηκε να στεγνώσει. Έπειτα, για την καλύτερη προσήλωση των βακτηριακών κυττάρων, σε κάθε θέση προστέθηκαν 15μl αιθανόλης 95% και αφέθηκε να εξατμιστεί. Στη συνέχεια προστέθηκαν 15 μl αντιορού (30317) σε αραιώση 1/400 και η πλάκα

τοποθετήθηκε για 30 λεπτά σε υγρό περιβάλλον. Ακολούθησαν τρία πεντάλεπτα λουτρά με υπερκάθαρο νερό. Μετά από προσεκτικό στέγνωμα της αντικειμενοφόρου πλάκας, με απορροφητικό χαρτί, στην κάτω επιφάνεια της και έξω από τις θέσεις, προστέθηκαν 15 µl του φθορίζοντος αντιορού (Alexa Fluor 488, Molecular Probes) σε αραιώση 1/150. Μετά από 30 λεπτά παραμονής σε σκοτεινό και υγρό περιβάλλον επαναλήφθηκε η διαδικασία ξεπλύματος και στεγνώματος της πλάκας όπως προηγούμενα.

Η παρατήρηση έγινε σε μικροσκόπιο εφοδιασμένο με σύστημα επισκοπικού φθορισμού, με τον ελαιοκαταδυτικό φακό (X100). Για την αντικειμενικότητα των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε σαν μάρτυρας αιώρημα του ομόλογου βακτηρίου. Για την εκτίμηση της έντασης φθορισμού χρησιμοποιήθηκε η παρακάτω κλίμακα: Φ0: αρνητικό, Φ1: Ένταση φθορισμού ελάχιστη, Φ2: Ένταση φθορισμού μέτρια, Φ3: Ένταση φθορισμού υψηλή, Φ4: Ένταση φθορισμού πολύ υψηλή.

3.1 Προκαταρτικές δοκιμές ταυτοποίησης των απομονώσεων

Με τις αναφερόμενες στην συνέχεια δοκιμές προσδιορίστηκε προκαταρκτικά αν οι απομονώσεις του βακτηρίου που αναπτύχθηκαν περιφερειακά της ροδέλας ανήκαν στο γένος *Erwinia* sp.. Με συνεχείς μεταφυτεύσεις σε θρεπτικό υπόστρωμα NAG διαπιστώθηκε η καθαρότητα των απομονώσεων. Σε 110 απομονώσεις του βακτηρίου εξετάστηκε η ικανότητα φθορισμού σε θρεπτικό υπόστρωμα AF, ο αερόβιος ή αναερόβιος μεταβολισμός της γλυκόζης και η έκλυση αντίδρασης υπερευαισθησίας σε φυτά καπνού.

3.1.1 Εξέταση φθορισμού σε θρεπτικό υπόστρωμα AF

Μετά την απομόνωση του βακτηρίου από τις ροδέλες των μολυσμένων φυτών, έγινε μεταφύτευση των καλλιεργειών που αναγνωρίστηκαν ως τυπικές του *Erwinia chrysanthemi* σε τριβλία με θρεπτικό υπόστρωμα AF (King's B). Ο εμβολιασμός των θρεπτικών υλικών έγινε με αποστειρωμένη οδοντογλυφίδα και κάτω από ασηπτικές συνθήκες. Στη συνέχεια τα τριβλία επώαστηκαν στους 28 °C για 24-48 ώρες και εκτιμήθηκε αν φθόριζαν οι απομονώσεις.

3.1.2 Δοκιμή αναεροβίωσης

Τα βακτηριακά στελέχη που απομονώθηκαν από τις ροδέλες δοκιμάστηκαν στη δοκιμή της αναεροβίωσης σε υλικό των Hugh et Leifsons. Δύο αποστειρωμένα σωληνάκια, για κάθε δείγμα, γεμίστηκαν με 2ml από το παραπάνω υλικό. Με αποστειρωμένη οδοντογλυφίδα μολύνθηκαν και τα δύο σωληνάκια από τις απομονώσεις που πήραμε από τις ροδέλες και δεν φθόριζαν στο AF. Στο ένα από τα δύο προστέθηκε 1ml παραφίνης, η οποία δημιουργεί αναερόβιες συνθήκες. Τα σωληνάκια διατηρήθηκαν στο θάλαμο στους 28 °C για 24 ώρες και στη συνέχεια εκτιμήθηκε η αερόβια ή αναερόβια ανάπτυξη της απομόνωσης.

3.1.3 Αντίδραση υπερευαισθησίας σε φυτά καπνού

Η αντίδραση υπερευαισθησίας πραγματοποιήθηκε σε φυτά καπνού ποικιλίας Xanthi με σκοπό την προκαταρκτική διαπίστωση της παθογένειας των απομονώσεων.

Από τις απομονώσεις της γαριφαλιάς σχηματίστηκαν αιωρήματα, σε 1 ml απεσταγμένου νερού με τη βοήθεια αποστειρωμένης οδοντογλυφίδας. Έπειτα με τη χρήση σύριγγας εμβολιάζαμε φύλλα καπνού με το αιώρημα αυτό. Αφού βρέχαμε το φυτό το κλείναμε καλά σε πλαστική σακούλα, ώστε να δημιουργηθούν οι κατάλληλες συνθήκες υγρασίας για την εκδήλωση της αντίδρασης υπερευαισθησίας (νέκρωση ιστού), η οποία εκτιμήθηκε σε διάστημα 24-48 ωρών.

4.1 Ταυτοποίηση του παθογόνου

4.1.1 Εξέταση βιοχημικού και φυσιολογικού φαινότυπου των απομονώσεων

Περαιτέρω ταυτοποίηση επιλεγμένων απομονώσεων του βακτηρίου πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τη μεθοδολογία που ακολουθείται στο

εργαστήριο Βακτηριολογίας του Ινστιτούτου Προστασίας Φυτών Ηρακλείου του ΕΘ.Ι.ΑΓ.Ε. και περιγράφεται από τους Schaad *et al.*, 2001 και Goumas, 1987. Οι απομονώσεις που επιλέχθηκαν ανήκαν στο γένος *Erwinia* sp. Οι διαφορετικές δοκιμές που πραγματοποιήθηκαν για την ταυτοποίηση των απομονώσεων σε επίπεδο είδους, υποείδους και παθοποικιλίας αναφέρονται στους Πίνακες 6 και 7.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

5.1. Δειγματοληψία– απομόνωση και ανίχνευση του παθογόνου

Με την παραλαβή των δειγμάτων (τέσσερα φυτά γαριφαλιάς / δείγμα) καταγράφηκαν λεπτομερώς τα μακροσκοπικά συμπτώματα. Οι μακροσκοπικές παρατηρήσεις που λήφθηκαν αναφέρονται στον Πίνακα 3. Παρατηρούμε ότι σε όλα τα δείγματα που εξετάσαμε μακροσκοπικά βρέθηκε, το σύνολο ή μέρος των τυπικών συμπτωμάτων που προκαλεί το *Erwinia chrysanthemi* σε φυσικές προσβολές φυτών γαριφαλιάς. Τα συμπτώματα που παρατηρήθηκαν ήταν: νανισμός (μικρά μεσογονάτια διαστήματα), μεταχρωματισμός αγγείων και σήψη εντεριώνης και τα οποία εμφανίζονταν στην πλειονότητα των προσβλημένων φυτών γαριφαλιάς.

Πίνακας 3: Κωδικοποίηση δειγμάτων, καταγραφή συμπτωμάτων ανά δείγμα κατά την παραλαβή τους στο εργαστήριο

Κωδικός Παραγωγού	Αριθμός Δείγματος	Μακροσκοπικά Συμπτώματα
1	1	Νανισμός, Μεταχρωματισμός αγγείων, Σήψη εντεριώνης
	2	Μεταχρωματισμός αγγείων, Σήψη εντεριώνης
2	1	Μεταχρωματισμός αγγείων
	2	Νανισμός, Μεταχρωματισμός αγγείων, Σήψη εντεριώνης
3	1	Νανισμός, Μεταχρωματισμός αγγείων, Σήψη εντεριώνης
4	1	Μεταχρωματισμός αγγείων
5	1	Νανισμός, Μεταχρωματισμός αγγείων, Σήψη εντεριώνης
	2	Μεταχρωματισμός αγγείων

Κωδικός Παραγωγού	Αριθμός Δείγματος	Μακροσκοπικά Συμπτώματα
6	1	Νανισμός, Μεταχρωματισμός αγγείων, Σήψη εντεριώνης
	2	Νανισμός, Μεταχρωματισμός αγγείων, Σήψη εντεριώνης
7	1	Νανισμός, Μεταχρωματισμός αγγείων, Σήψη εντεριώνης
	2	Μεταχρωματισμός αγγείων, Σήψη εντεριώνης
	3	Μεταχρωματισμός αγγείων, Σήψη εντεριώνης
	4	Νανισμός, Μεταχρωματισμός αγγείων, Σήψη εντεριώνης
7	5	Μεταχρωματισμός αγγείων, Σήψη εντεριώνης
8	1	Νανισμός, Μεταχρωματισμός αγγείων, Σήψη εντεριώνης
	2	Μεταχρωματισμός αγγείων, Σήψη εντεριώνης
9	1	Μεταχρωματισμός αγγείων, Σήψη εντεριώνης
	2	Μεταχρωματισμός αγγείων, Σήψη εντεριώνης
10	1	Μεταχρωματισμός αγγείων
	2	Μεταχρωματισμός αγγείων
	3	Μεταχρωματισμός αγγείων, Σήψη εντεριώνης
	4	Μεταχρωματισμός αγγείων
	5	Νανισμός, Μεταχρωματισμός αγγείων, Σήψη εντεριώνης
	6	Νανισμός, Μεταχρωματισμός αγγείων, Σήψη εντεριώνης
11	1	Νανισμός, Μεταχρωματισμός αγγείων, Σήψη εντεριώνης
	2	Νανισμός, Μεταχρωματισμός αγγείων, Σήψη εντεριώνης
12	1	Νανισμός, Μεταχρωματισμός αγγείων
13	1	Μεταχρωματισμός αγγείων, Σήψη εντεριώνης
	2	Νανισμός, Μεταχρωματισμός αγγείων, Σήψη εντεριώνης
14	1	Μεταχρωματισμός αγγείων, Σήψη εντεριώνης
	2	Μεταχρωματισμός αγγείων, Σήψη εντεριώνης
15	1	Νανισμός, Μεταχρωματισμός αγγείων, Σήψη εντεριώνης
	2	Νανισμός, Μεταχρωματισμός αγγείων, Σήψη εντεριώνης
16	1	Μεταχρωματισμός αγγείων, Σήψη εντεριώνης
	2	Νανισμός, Μεταχρωματισμός αγγείων, Σήψη εντεριώνης
17	1	Νανισμός, Μεταχρωματισμός αγγείων, Σήψη εντεριώνης
	2	Νανισμός, Μεταχρωματισμός αγγείων, Σήψη εντεριώνης
18	1	Μεταχρωματισμός αγγείων, Σήψη εντεριώνης
	2	Νανισμός, Μεταχρωματισμός αγγείων, Σήψη εντεριώνης
	3	Μεταχρωματισμός αγγείων, Σήψη εντεριώνης

Κωδικός Παραγωγού	Αριθμός Δείγματος	Μακροσκοπικά Συμπτώματα
19	1	Μεταχρωματισμός αγγείων, Σήψη εντεριώνης
	2	Νανισμός, Μεταχρωματισμός αγγείων
	3	Νανισμός, Μεταχρωματισμός αγγείων, Σήψη εντεριώνης
20	1	Μεταχρωματισμός αγγείων, Σήψη εντεριώνης
	2	Νανισμός, Μεταχρωματισμός αγγείων, Σήψη εντεριώνης
	3	Μεταχρωματισμός αγγείων, Σήψη εντεριώνης
21	1	Νανισμός, Μεταχρωματισμός αγγείων
	2	Μεταχρωματισμός αγγείων, Σήψη εντεριώνης
	3	Μεταχρωματισμός αγγείων, Σήψη εντεριώνης
	4	Μεταχρωματισμός αγγείων, Σήψη εντεριώνης
22	1	Νανισμός, Μεταχρωματισμός αγγείων, Σήψη εντεριώνης
	2	Νανισμός, Μεταχρωματισμός αγγείων, Σήψη εντεριώνης
23	1	Μεταχρωματισμός αγγείων
24	1	Νανισμός, Μεταχρωματισμός αγγείων, Σήψη εντεριώνης
	2	Νανισμός, Μεταχρωματισμός αγγείων
	3	Μεταχρωματισμός αγγείων
	4	Νανισμός, Μεταχρωματισμός αγγείων, Σήψη εντεριώνης
	5	Νανισμός, Μεταχρωματισμός αγγείων, Σήψη εντεριώνης
25	1	Νανισμός, Μεταχρωματισμός αγγείων, Σήψη εντεριώνης
	2	Νανισμός, Μεταχρωματισμός αγγείων, Σήψη εντεριώνης
	3	Μεταχρωματισμός αγγείων, Σήψη εντεριώνης
26	1	Νανισμός, Μεταχρωματισμός αγγείων, Σήψη εντεριώνης
	2	Νανισμός, Μεταχρωματισμός αγγείων, Σήψη εντεριώνης
	3	Νανισμός, Μεταχρωματισμός αγγείων
27	1	Νανισμός, Μεταχρωματισμός αγγείων, Σήψη εντεριώνης

Στον Πίνακα 4, παρουσιάζεται η ομαδοποίηση των δειγμάτων με βάση την πλήρη ή τη μερική συμπτωματολογική εικόνα που προκαλεί το *Erwinia chrysanthemi* σε φυτά γαριφαλιάς και η συσχέτιση της εκάστοτε συμπτωματολογικής εικόνας με την απομόνωση - ανίχνευση του βακτηρίου στους φυτικούς ιστούς των δειγμάτων της γαριφαλιάς.

Σε σύνολο 66 δειγμάτων 32 εμφάνισαν και τα τρία βασικά συμπτώματα της ασθένειας με υψηλό ποσοστό συσχέτισης 84,4 % μεταξύ συμπτωματολογίας και

απομόνωσης του παθογόνου, ενώ στις περιπτώσεις των συνδυασμών του συμπτώματος του μεταχρωματισμού με εκείνα της σήψης της εντεριώνης κυρίως ή / και του νανισμού τα ποσοστά συσχέτισης βρέθηκαν 67% και 60 % αντίστοιχα. Τέλος παρατηρούμε ότι το ποσοστό μειώνεται στο 25 % στην περίπτωση που το μοναδικό σύμπτωμα που καταγράφηκε ήταν ο μεταχρωματισμός.

Πίνακας 4: Σύνδεση μακροσκοπικών συμπτωμάτων και εργαστηριακής διάγνωσης της ασθένειας.

Ομάδες Συμπτωμάτων	Αριθμός δειγμάτων με συμπτώματα	Αριθμός μολυσμένων δειγμάτων που απομονώθηκε το βακτήριο	Συσχέτιση συμπτωμάτων /απομόνωση παθογόνου(%)
Μεταχρωματισμός – Σήψη εντεριώνης – Νανισμός	32	27	84,4
Μεταχρωματισμός – Σήψη εντεριώνης	21	14	67
Μεταχρωματισμός Νανισμός	5	3	60
Μεταχρωματισμός	8	2	25
ΣΥΝΟΛΟ	66	46	70

Στον Πίνακα 5 αναφέρονται τα συγκεντρωτικά αποτελέσματα ανά ποικιλία της απομόνωσης του παθογόνου, με τη μεθοδολογία της απομόνωσης από ροδέλα στελέχους γαριφαλιάς και της ανίχνευσης του παθογόνου με τη μέθοδο του ανοσοφθορισμού σε εκχύλισμα φυτικών ιστών στελέχους γαριφαλιάς.

Παρατηρούμε ότι σε σύνολο 66 δειγμάτων, που αντιστοιχούν σε 27 παραγωγούς, τα 46 βρέθηκαν μολυσμένα από το βακτήριο *Erwinia chrysanthemi* και με τις δύο μεθοδολογίες. Στα υπόλοιπα είκοσι δείγματα δεν απομονώθηκε ή δεν ανιχνεύθηκε η παρουσία του βακτηρίου.

Η πλειοψηφία των εξετασθέντων δειγμάτων ανήκαν στις ποικιλίες Frantzesco στην οποία παρατηρήθηκε αρχικά η ασθένεια από τους παραγωγούς και στην οποία σε σύνολο 41 δειγμάτων τα 39 ήταν θετικά, δηλαδή σε ποσοστό: 95,1%. Από τις υπόλοιπες ποικιλίες

(της ίδιας εταιρείας) στις οποίες ο αριθμός των δειγμάτων ήταν περιορισμένος, μολυσμένα βρέθηκαν δείγματα στις ποικιλίες Tasman (1/1), SR 1006 (1/1), Alma (1/1), Dona (1/1), San light, (1/2), Leila (3/8), Felitsa (1/2), και σε δείγμα από διάφορες mini ποικιλίες (1/1). Στις ποικιλίες 6161, Wizzard, Dolce vita και Condor δεν βρέθηκε κανένα δείγμα μολυσμένο με το βακτήριο *Erwinia chrysanthemi*.

Πίνακας 5: Αποτελέσματα ανίχνευσης του *Erwinia chrysanthemi* με τις δοκιμές της απομόνωσης από ροδέλα στελέχους σε θρεπτικό υπόστρωμα NAG και του ανοσοφθορισμού.

ΠΟΙΚΙΛΙΑ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ <i>E.chr.</i> ΣΕ ΘΡΕΠΤ. ΥΠΟΣΤΡ. NAG	ΑΝΟΣΟΦΘΟΡΙΣΜΟΣ (IF)
FRANTZESCO	21	19	19
PINK FRANTZESCO	17	17	17
FRANTZESCO ΑΣΠΡΟ	3	3	3
TASMAN	1	1	1
SR1006	1	1	1
ALMA	1	1	1
SAN LIGHT	2	1	1
6161	4	-	-
WIZZARD	1	-	-
DOLCE VITA	1	-	-
DONA	1	1	1
LEILA	8	3	3
CONDOR	2	-	-
FELITSA	2	1	1
ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ Mini	1	1	1
ΣΥΝΟΛΟ	66	46	46

5.2 Ταυτοποίηση των απομονώσεων του βακτηρίου

5.2.1 Προκαταρτική ταυτοποίηση απομονώσεων του παθογόνου από τα στελέχη γαριφαλιάς

Εκατόν δέκα απομονώσεις του παθογόνου, που προήλθαν από την ανάπτυξη της τυπικής καλλιέργειας του βακτηρίου γύρω από τη ροδέλα στελέχους της γαριφαλιάς σε θρεπτικό υπόστρωμα NAG, προσδιορίστηκαν προκαταρκτικά ως μέλη του γένους *Erwinia* spp.. Όλες οι απομονώσεις εμφάνισαν τον ακόλουθο φαινότυπο: αρνητικά κατά Gram, προαιρετικά αναερόβιο μεταβολισμό της γλυκόζης, δεν φθορίζουν σε θρεπτικό υπόστρωμα King 's B και έδωσαν αντίδραση υπερευαισθησίας σε καπνό.

5.2.2. Ταυτοποίηση σε επίπεδο είδους και παθοποικιλίας

Τριάντα εννέα επιλεγμένες απομονώσεις του παθογόνου (τουλάχιστον μια ανά καλλιεργητή) από τις προηγούμενες 110 απομονώσεις ταυτοποιήθηκαν περαιτέρω με βάση τα αποτελέσματα που εμφανίζονται στον Πίνακα 6. Παρατηρούμε ότι οι 39 απομονώσεις εμφανίζουν όμοιο φαινοτυπικό προφίλ με τα ήδη ταυτοποιημένα στελέχη του *Erwinia chrysanthemi* ενώ διαφοροποιούνται από τα ταυτοποιημένα στελέχη των *Erwinia carotovora* subsp *carotovora* και *Erwinia carotovora* subsp *atroseptica*.

Πίνακας 6: Ταυτοποίηση των απομονώσεων της γαριφαλιάς. Συγκριτικές δοκιμές με ταυτοποιημένα στελέχη του *Erwinia chrysanthemi* (Echr), *Erwinia carotovora subsp carotovora*(Ecc), *Erwinia carotovora subsp atroseptica* (Eca).

ΔΟΚΙΜΕΣ	Απομονώσεις γαριφαλιάς	Echr	Ecc	Eca
<i>Αριθμός στελεχών</i>	39	5	2	2
Growth at 37°C	+	+	-	+
Reducing sugars from sucrose	-	-	-	+
Phosphatase activity	+	+	-	-
Sensitivity to erythromycin	+	+	-	-
Indole production	+	+	-	-
Sorbitol	-	-	-	-
Melibiose	+	+	+	+
Citrate	+	+	+	+
Raffinose	+	+	+	+
Arabitol	-	-	-	-
Lactose	D	+	+	+
Utilization of keto- methyl glucoside	-	-	-	+

Στον Πίνακα 7 αναφέρονται τα αποτελέσματα της ταυτοποίησης των 39 απομονώσεων του *Erwinia chrysanthemi* σε επίπεδο παθοποικιλίας από τα δείγματα γαριφαλιάς που εξετάστηκαν στη διάρκεια της μελέτης. Η σύγκριση έγινε με βάση το προτεινόμενο βιοχημικό προφίλ από τους Samson *et al.*, 1987. Με βάση τα αποτελέσματα προκύπτει ότι 29 απομονώσεις αποτελούν μέλη της βιοποικιλίας 1 δηλαδή ανήκουν στην παθοποικιλία *dianthicola* και οι υπόλοιπες 10 αποτελούν μέλη της βιοποικιλίας 5 δηλαδή ανήκουν στην παθοποικιλία *chrysanthemi*.

Πίνακας 7: Ταυτοποίηση απομονώσεων του *Erwinia chrysanthemi* από φυτά γαριφαλιάς σε επίπεδο παθοποιικιλίας με βάση το προτεινόμενο βιοχημικό προφίλ από τους Samson *et al.*, 1987.

ΔΟΚΙΜΕΣ	Στελέχη Γαριφαλιάς		Προσδιορισμός biovars του <i>E. chrysanthemi</i> σύμφωνα με Samson <i>et al.</i> , 1987						
	1	5	1	2	3	4	5	6	7
bvs <i>E. chrysanthemi</i>	1	5	1	2	3	4	5	6	7
Αριθμός στελεχών	29	10							
Growth at 39°C	-	+	-	+	+	+	+	+	-
Arginine (Moeller)	+	+	+	-	-	-	+	-	+
Cis aconitate	+	+	+	-	+	-	+	+	-
D(-)arabinose	-	-	-	+	+	+	-	-	-
5-cetogluconate	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Inuline	-(66%)	+	+	-	-	-	+	-	+
Mannitol	+	+	+	+	+	-	+	+	+
Melibiose	+	+	+	-	+	+	+	-	+
Raffinose	+	+	+	-	+	+	+	+	-
D(-)tartate	+	+	+	-	-	+	-	-	+

Υπόμνημα 1: Biovar1: pv. *dianthicola*, Biovar2: pv. *dieffenbachia*, Biovar3: pv. *zea*, Biovar 4: pv. *paradisiaca*, Biovar 5: pv. *chrysanthemi*, Biovar 6: pv. *parthenii*, Biovar 7: Biotype CFBP 2015

Υπόμνημα 2 (στελέχη γαριφαλιάς):

Biovar 1: 26-3α, 24-4β, 24-2β, 24-1α, 23-1β, 20-3α, 18-1β, 16-2β, 16-1α, 1-2α, 14-1β, 13-1α, 10-5β, 8-1β, 7-2δ, 6-2α, 6-1β, 15-2δ, 3-1β, 5-1δ, 26-2α, 20-2α, 17-2α, 14-2γ, 10-6γ, 7-4γ, 2-1α, 11-1γ, 24-5γ

Biovar 5: 20-1β, 19-3β, 15-1α, 11-2γ, 7-1β, 6-2α, 6-1β, 2-2γ, 26-1ε, 25-1α

5.3 Ανοσοφθορισμός

Οι τριάντα εννέα απομονώσεις του βακτηρίου από τη γαριφαλιά αντέδρασαν στον ανοσοφθορισμό παρόμοια με το ομόλογο στέλεχος του *Erwinia chrysanthemi* pv. *dianthicola* (30317) από φυτό ντάλιας, παρουσιάζοντας ένταση φθορισμού πολύ

υψηλή (Φ3 - Φ4) σε αραιώση 1/400 του αντιορού anti Echr 30317, σε αντιδιαστολή με στελέχη του *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora* και *Erwinia carotovora* ssp. *atroseptica* στα οποία η ένταση φθορισμού κυμάνθηκε από Φ0 - Φ2.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η εργασία αυτή είχε ως σκοπό την επισκόπηση καλλιεργειών γαριφαλιάς, για τη διαπίστωση της έκτασης της προσβολής τους από το *Erwinia chrysanthemi* μετά την εκτεταμένη εμφάνιση της ασθένειας, στη διάρκεια του καλοκαιριού του 2002 στην περιοχή Χερσονήσου του Ν. Ηρακλείου. Τα δείγματα που συλλέχθηκαν προέρχονταν από καλλιέργειες που είχαν φυτευτεί τον Μάιο του ίδιου έτους με φυτωριακό υλικό από το γερμανικό οίκο SELECTA. Τα περισσότερα δείγματα από αυτά ανήκαν στην ποικιλία Frantzesco, στην οποία παρατηρήθηκε αρχικά η ασθένεια. Πρόκειται για μια ποικιλία η οποία καλλιεργείται κυρίως για κομμένα άνθη.

Από τα αποτελέσματα της εργασίας προκύπτει, ότι η εμφάνιση και η έξαρση της ασθένειας του βακτηριακού νανισμού της γαριφαλιάς στην Κρήτη, κατά τη διάρκεια του Αυγούστου του 2002, οφείλεται στη μαζική εισαγωγή μολυσμένου φυτωριακού πολλαπλασιαστικού υλικού (έρριζα μοσχεύματα) από την συγκεκριμένη εταιρεία. Η ασθένεια διαπιστώθηκε εργαστηριακά στο 95 % περίπου των αγροτεμαχίων που φυτεύτηκαν τον Μάιο – Ιούνιο του 2002 με την ποικιλία Frantzesco. Επίσης, από τη μελέτη προκύπτει ότι οι περισσότερες από τις ποικιλίες της ίδιας εταιρείας, παρά τον περιορισμένο αριθμό δειγμάτων που εξετάστηκαν, ήταν μολυσμένες με το βακτήριο *Erwinia chrysanthemi*.

Διαπιστώθηκε η αναμενόμενη άμεση συσχέτιση της συμπτωματολογικής εικόνας των ασθενών φυτών και της παρουσίας του παθογόνου στους φυτικούς ιστούς.

Επίσης, από τη μελέτη προκύπτει, ότι με βάση τους μορφολογικούς, φυσιολογικούς, βιοχημικούς και ορολογικούς χαρακτήρες οι 39 απομονώσεις του παθογόνου ανήκουν στο είδος *Erwinia chrysanthemi*. Είκοσι εννέα από αυτές ταυτοποιήθηκαν σύμφωνα με τις προτεινόμενες δοκιμές (Samson *et al.*, 1987) ως μέλη της biovar 1 (*Erwinia chrysanthemi* pv. *dianthicola*) και δέκα ως μέλη της biovar 5 (*Erwinia chrysanthemi* pv. *chrysanthemi*) δεδομένα που συμφωνούν με

εκείνα των Janse & Ruissen, 1988, δηλαδή ότι στελέχη από το ίδιο φυτό ξενιστή από διάφορες γεωγραφικές περιοχές μπορεί να υπάγονται σε διαφορετικές βιοποικιλίες. Έτσι απομονώσεις του βακτηρίου από την πατάτα από την Ολλανδία έχουν ταυτοποιηθεί ως βιοποικιλίες 5 και 7 από την Γαλλία ως 1 και 7, από τη Ταϊβάν ως 6 και από την Αυστραλία και το Περού ως 3. Πιστεύεται ότι μολύνσεις από γειτονικές καλλιέργειες παίζουν σημαντικό ρόλο στην διαφοροποίηση των βιοποικιλιών στον ίδιο ξενιστή. Επίσης, σύμφωνα με τους Singh *et al.*, 2000, απομονώσεις της γαριφαλιάς από την Ολλανδία βρέθηκαν να ανήκουν στις βιοποικιλίες 1 και 5 που αντιστοιχούν στις παθοποικιλίες *dianthicola* και *chrysanthemi*. Σύμφωνα με τους προμηθευτές του πολλαπλασιαστικού υλικού τα έρριζα μοσχεύματα γαριφαλιάς της εταιρείας παράγονται σε διάφορες χώρες εκτός Ευρώπης, γεγονός που πιθανά δικαιολογεί την αναγνώριση δύο διαφορετικών παθοποικιλιών στη μελέτη. Μέχρι πρόσφατα τα στελέχη που απομονώνονταν από ασθενή φυτά γαριφαλιάς στην Κρήτη αλλά και στην υπόλοιπη Ελλάδα ανήκαν στην παθοποικιλία *dianthicola* (Γκούμας, προσωπική επικοινωνία) η οποία χαρακτηρίζεται από μεγαλύτερο εύρος ξενιστών.

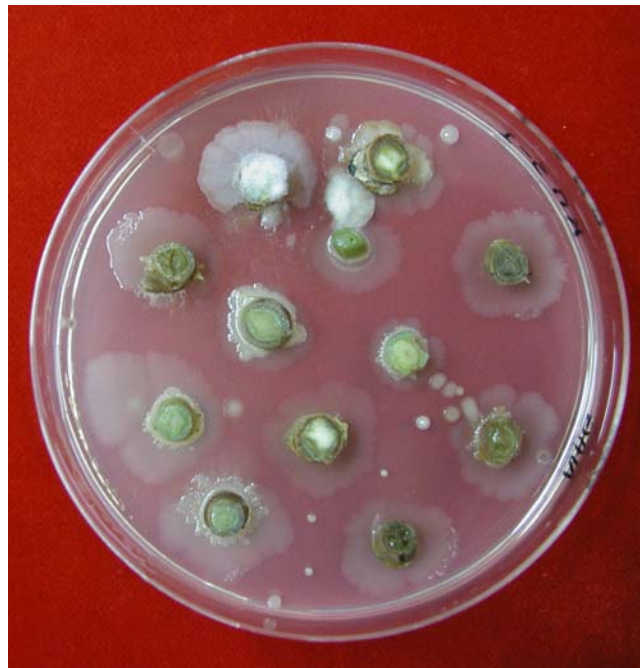
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Αλιβιζάτος Α. Σ., 1979. Βακτηριακός Νανισμός της γαριφαλιάς. Χρονικά Μπενακείου Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου (Ν. Σ.). 12:119-137.
2. Γιακανίκης Γ. Ι., Αθήνα 1991, Ορολογική ανίχνευση του *Erwinia chrysanthemi* της γαριφαλιάς.
3. De Boer S. H. and A. Kelman 2001. *Erwinia* Soft Rot Group, in Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria, Third Edition 2001, N. W. Schaad, J. B. Jones and W. Chun, σελ. 56-72.
4. Goumas D. 1987, Possibilites de détection d'*Erwinia chrysanthemi* pv. *dianthicola* (Hellmers) DICKEY 1979 -Agent de la bacteriose du *Dahlia* sp. (Διδακτορική διατριβή).
5. Janse, J.d., and Ruissen , M.A. 1988. Characterization and classification of *Erwinia chrysanthemi* strains from several hosts in The Netherlands. *Phytopathology* 78, 800-808.
6. Παναγόπουλος Χ. Γ., 2003. Ασθένειες Καλλωπιστικών Φυτών. Εκδόσεις Σταμούλης, Αθήνα 2003, σελ. 65-67.
7. Παπαδημητρίου Μ., 2000. Σημειώσεις Ανθοκομίας Θεωρία, ΣΤΕΓ, ΤΕΙ Κρήτης, Ηράκλειο, σελ. 9-29.
8. Samson, R., Poutier, F, Saily, M., and Jouan, B. 1987.Characterisation des *Erwinia chrysanthemi* isolees de *Solanum tuberosum* et d' autres plantes- hotew selon les biovars et serogroupew. *EPPO Bull.* 17, 11-16.
9. Singh, U., Trevors, C.M. De Boer, S.H., and Janse,J. D. 2000.Fimbrial-specificmonoklonal antibody-based ELISA for European potato strains of *Erwinia chrysanthemi* and comparison to PCR. *Plant Dis.* 84, 443-448.

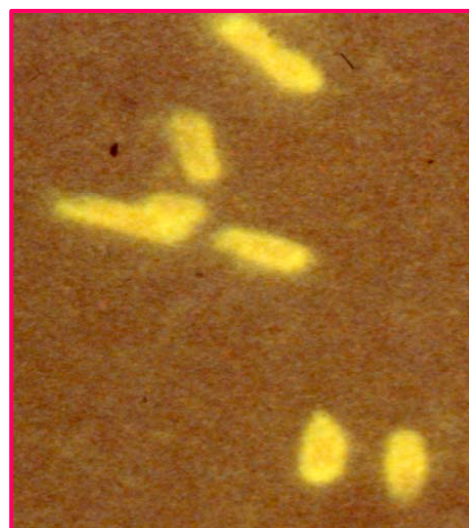
ΦΩΤΟΓΡΑΦΙΚΟ ΥΛΙΚΟ



ΕΙΚΟΝΑ 1, 2 & 3. Σήψη εντεριώνης, Νανισμός - Ξήρανση και Μεταχρωματισμός αγγείων.



ΕΙΚΟΝΑ 4. Απομόνωση του παθογόνου με τη μεθοδολογία της ροδέλας.



ΕΙΚΟΝΑ . Ανίχνευση του παθογόνου με τη μεθοδολογία του ανοσοφθορισμού