



ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΘΕΡΜΟΚΗΠΙΑΚΩΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ
& ΑΝΘΟΚΟΜΙΑΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Μελέτη βακτηριακών στελεχών του
Agrobacterium tumefaciens από το φυτό *Aster* sp.



Σπουδάστρια: Παρασχάκη Δέσποινα
Εισηγητής: Δρ. Δημήτριος Γκούμας

Μελέτη βακτηριακών στελεχών του *Agrobacterium tumefaciens* από το φυτό *Aster* sp.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο καρκίνος των φυτών είναι ασθένεια πολύ διαδεδομένη τόσο στις ποώδεις καλλιέργειες όσο και στις καλλιέργειες θάμνων και δένδρων. Σύμφωνα με τον Δημητριάδη (1992) η ασθένεια αυτή φαίνεται πως αναφέρθηκε για πρώτη φορά από τον Αριστοτέλη και στην συνέχεια πολύ αργότερα από τον Hlubek στα 1839. Ωστόσο περιγράφηκε για πρώτη φορά με λεπτομέρεια το 1866 από τον Soraueer σε δένδρα μηλιάς και απιδιάς. Στα 1897, ο Canara απέδειξε πως η ασθένεια αυτή ήταν μεταδοτική πράγμα που επιβεβαιώθηκε από μεταγενέστερες εργασίες. Η συστηματική όμως μελέτη της ασθένειας του καρκίνου των φυτών άρχισε από το 1904 από τον Αμερικάνο βακτηριολόγο Erwin F. Smith, ο οποίος παρατήρησε την ύπαρξη βακτηρίων σε τομές όγκων μικρής ηλικίας. Αργότερα με την συνεργασία του Townsend, ο Smith απομόνωσε από το φυτό *Chrysanthemum frutescens* το παθογόνο, που ήταν βακτήριο και που ονομάστηκε τότε *Bacterium tumefaciens*.

Πρόκειται για ασθένεια με παγκόσμια εξάπλωση που προσβάλλει πολύ μεγάλο αριθμό φυτικών ειδών (περισσότερα από 643 είδη που ανήκουν σε περισσότερα από 391 γένη φυτών).

Το παθογόνο βακτήριο

Η περισσότερο συνηθισμένη περίπτωση όγκων στα φυτά είναι η ασθένεια που είναι γνωστή με το όνομα όγκος του λαιμού ή καρκίνος των φυτών και οφείλεται σε στελέχη του βακτηρίου *Agrobacterium tumefaciens*. Η ασθένεια αναφέρεται ως crown gall, gall, crown knot, root knot και root gall. Εκτός από το *Agrobacterium tumefaciens*, με την ασθένεια σχετίζονται σε άλλους ξενιστές και τα *A. rubi* και *A. vitis*, τα οποία εμφανίζουν παρόμοια βιολογία.

Οι ζημιές που προκαλούνται από την ασθένεια αυτή είναι συχνά πολύ σοβαρές, ιδιαίτερα στα οπωροφόρα δέντρα επειδή οι ποσότητες από τις θρεπτικές ουσίες και η ενέργεια που διοχετεύονται στους όγκους είναι μεγάλη και δαπανάται σε βάρος του φυτού. Το βάρος των όγκων που σχηματίζονται μπορεί να φτάσει τα 25 Kg.

Το *Agrobacterium tumefaciens* είναι αρνητικό κατά Gram και αερόβιο βακτήριο. Έχει μορφή ραβδίων διαστάσεων (0,4 - 0,8 X 1,0 - 3,0 μm) και κινείται χάρις την ύπαρξη 1-6 περίτριχων μαστιγίων. Σε θρεπτικό υπόστρωμα nutrient agar και D1M, οι αποικίες είναι μικρές στρογγυλές, κυρτές λευκές, στίλβουσες, διαφανείς με μαργαριτώδη εμφάνιση (Εικόνα 5). Το βακτήριο θανατώνεται με θέρμανση σε 51 °C για 10 λεπτά ή στην θερμοκρασία των 39 °C για τρεις μέρες. Αντίθετα η άριστη θερμοκρασία για την ανάπτυξη του βακτηρίου in vitro είναι 25-30 °C, η μέγιστη 37 °C και η ελάχιστη 0 °C. Η ανάπτυξη του βακτηρίου μετά την απομόνωση του σε θρεπτικό υπόστρωμα είναι αργή. Το παθογόνο ανήκει στην οικογένεια Rhizobiaceae, και

ταξινομείται ως εξής: (Bacteria; Proteobacteria;
Alphaproteobacteria; Rhizobiales; Rhizobiaceae;
Rhizobium/Agrobacterium group)

Στη φύση έχουν βρεθεί τρεις βιότυποι ή βιοποικιλίες του βακτηρίου που διαφέρουν μεταξύ τους σε αρκετούς φυσιολογικούς και βιοχημικούς χαρακτήρες. Έχει διαπιστωθεί η παρουσία στη χώρα μας και των τριών βιότυπων του παθογόνου. Ειδικότερα οι βιότυποι 1 και 2 έχουν ευρύ κύκλο ξενιστών και είναι υπεύθυνοι για τον καρκίνο στα μηλοειδή, τα πυρηνόκαρπα και την τριανταφυλλιά. Αντίθετα, ο βιότυπος 3 έχει στενό κύκλο ξενιστών και είναι κυρίως υπεύθυνος για τον καρκίνο στο αμπέλι. Σε πολύ λίγες περιπτώσεις έχουν απομονωθεί από το αμπέλι και βακτηριακά στελέχη των βιότυπων 1 και 2, όμως τα βακτήρια αυτά χαρακτηρίζονται από την ύπαρξη οκτοπινικών πλασμιδίων. Τα περισσότερα από τα βακτηριακά στελέχη των βιότυπων 1 και 2 που προσβάλλουν τα δένδρα και την τριανταφυλλιά έχουν νοπαλινικά πλασμίδια. Βακτήρια του βιότυπου 3 έχουν απομονωθεί σε άλλες χώρες και από χρυσάνθεμο και άλλα φυτά. Οι απομονώσεις του βιότυπου 3 από αμπέλι θεωρήθηκαν πρόσφατα ότι αποτελούν χωριστό είδος το οποίο ονομάστηκε *Agrobacterium vitis*. Το βακτήριο είναι ευαίσθητο στο ηλιακό φως, στη ξηρασία και στα αντισηπτικά σκευάσματα. Τα βακτήρια υπάρχουν σε μικρό σχετικά αριθμό μέσα στους όγκους και δεν συγκεντρώνονται σε κοιλότητες όπως συμβαίνει στην περίπτωση άλλων βακτηριολογικών ασθενειών. Το βακτήριο επιβιώνει κυρίως στους όγκους και το έδαφος. Θεωρείται μικροοργανισμός

εδάφους μέσα στο οποίο μπορεί να επιβιώσει για πολλά χρόνια. Όμως, οι σχετικές βιβλιογραφικές αναφορές πάνω στην μακροχρόνια επιβίωση του βακτηρίου σε έδαφος χωρίς φυτικά υπολείμματα είναι αντιφατικές. Επίσης, σε πρόσφατες μελέτες διαπιστώθηκε η παρουσία παθογόνων απομονώσεων μόνο σε εδάφη προσβεβλημένων δενδροκομιών, ενώ σχεδόν όλες οι απομονώσεις από έδαφος και ριζόσφαιρα υγιών φυτών ήταν μη παθογόνες. Ακόμη το βακτήριο μπορεί να ζήσει σαπροφυτικά μέσα στα αγγεία του ξύλου του αμπελιού και πιθανά και άλλων φυτών ξενιστών.

Συμπτώματα

Το χαρακτηριστικό σύμπτωμα της ασθένειας είναι ο σχηματισμός σε διάφορα μέρη του φυτού, σχεδόν σφαιρικών όγκων διαμέτρου 0.5 - 25 cm. Το βάρος τέτοιων όγκων μπορεί να φτάσει τα 25 Kg (Εικόνα 1).

Στην αρχή οι όγκοι εμφανίζονται σαν μικρές προεξοχές μεμονωμένες ή σε ομάδες έχουν χρώμα υπόλευκο και σύσταση μαλακή αργότερα όμως αποκτούν σκοτεινότερο χρώμα και γίνονται σκληροί. Η επιφάνεια των νεαρών όγκων είναι σχεδόν λεία, ενώ αργότερα γίνεται τραχεία και ανώμαλη και πολλές φορές εμφανίζει μικρές προεξοχές που μοιάζουν με καταβολές ριζών. Κατά τα αρχικά στάδια σχηματισμού τους οι καρκινικοί όγκοι μπορεί να συγχέονται με τον συνήθη επουλωτικό ιστό που σχηματίζεται κατά την επούλωση των διαφόρων πληγών. Σύντομα όμως αναπτύσσονται σε μεγάλους σφαιρικούς ή ημισφαιρικούς σχηματισμούς. Η σύσταση των όγκων ποικίλλει ανάλογα με την ηλικία τους και το είδος του φυτού. Γενικά οι νεαροί όγκοι είναι μαλακοί και λευκοί

αργότερα όμως γίνονται καστανοί και σκληρότεροι, ενώ στα ξυλώδη φυτά γίνονται περισσότερο σκληροί. Η σύσταση κάθε όγκου εξαρτάται ακόμη από το είδος των ιστών που επικρατούν σ' αυτόν. Γενικά οι όγκοι αποτελούνται από ανοργάνωτες μάζες παρεγχυματικού και αγγειώδους ιστού, που περιέχουν αδιαφοροποίητα κύτταρα που είναι πολυπύρρηνα και διαιρούνται με μεγάλη ταχύτητα. Η διάρκεια ζωής των όγκων εξαρτάται από την σύσταση τους σε όλες όμως τις περιπτώσεις οι καρκινικοί ιστοί τελικά νεκρώνονται και αποδιοργανώνονται. Αυτό γίνεται συνήθως το φθινόπωρο ή το χειμώνα. Οι όγκοι μεγάλης ηλικίας σε αποδιοργάνωση, περιέχουν συχνά διάφορους μικροοργανισμούς μέσα στους σάπιους ιστούς ή διάφορα έντομα. Σε πολυετή φυτά, στη θέση των όγκων που νεκρώθηκαν σχηματίζονται νέοι όγκοι την επόμενη περίοδο (νωρίς την άνοιξη) γεγονός που αποτελεί ιδιαίτερο χαρακτηριστικό των καρκινικών όγκων. Στα δέντρα και τα άλλα πολυετή φυτά οι όγκοι σχηματίζονται, τις περισσότερες φορές στο λαιμό και στο ριζικό σύστημα. Αντίθετα στο αμπέλι οι όγκοι σχηματίζονται συχνότερα στα υπέργεια μέρη του πρεμνού δηλαδή στον κορμό, βραχίονες, κεφαλές και κληματίδες. Σε εμβολιασμένα φυτά συχνά οι όγκοι σχηματίζονται στο σημείο εμβολιασμού. Τα προσβεβλημένα φυτά γίνονται καχεκτικά, νάνα, μερικές φορές χλωρωτικά, έχουν μικρή παραγωγικότητα και πολλά από αυτά τελικά ξηραίνονται. Στο αμπέλι τα υπέργεια καρκινώματα προκαλούν συνήθως ξηράνσεις βραχιόνων και μειωμένη παραγωγή. Οι ζημίες απ' την αρρώστια είναι ιδιαίτερα σοβαρές στα φυτά μικρής ηλικίας. Η σοβαρότητα

της αρρώστιας εξαρτάται επίσης από την έκταση της προσβολής και τη θέση εμφανίσεων των όγκων.

Στοιχεία επιδημιολογίας

Η μεταφορά των μολυσμάτων σε μεγάλης αποστάσεις και σε αμόλυντες περιοχές γίνεται συνήθως με προσβεβλημένο πολλαπλασιαστικό υλικό (σπόρος, δενδρύλλια, μοσχεύματα, εμφόλια). Τοπική διασπορά των βακτηρίων και μόλυνση υγιών φυτών γίνεται με τη βροχή, το νερό ποτίσματος ή το έδαφος. Επίσης το βακτήριο διασπείρεται με έντομα εδάφους, τα ζώα, τον άνθρωπο καθώς και με εργαλεία κλαδέματος ή κατεργασίας του εδάφους.

Η παθογόνος δύναμη του *Agrobacterium tumefaciens* ελέγχεται από ένα εξωχρωματοσωματικό τεμάχιο κυκλικού DNA, το ογκογόνο πλασμίδιο (Ti plasmid) και που εύκολα μπορεί να μεταφερθεί, με γενετικό ανασυνδυασμό, από ένα παθογόνο στέλεχος σε άλλο μη παθογόνο. Επίσης, ένα μη παθογόνο στέλεχος με την απόκτηση του πλασμιδίου Ti γίνεται παθογόνο. Η απώλεια του πλασμιδίου Ti συνεπάγεται την απώλεια της παθογόνου δυνάμεως του βακτηρίου (δηλαδή να προκαλεί όγκους).

Το παθογόνο μολύνει τα φυτά μόνο από πρόσφατες πληγές. Η ύπαρξη πληγών δεν είναι μόνο αναγκαία για την είσοδο του βακτηρίου μέσα στους φυτικούς ιστούς, αλλά έχει μεγάλη σημασία για την παθογένεση (δηλαδή το σχηματισμό όγκων). Πληγές στα φυτά δημιουργούνται με το κλάδεμα, τα εργαλεία κατεργασίας του εδάφους, κατά τη μεταφύτευση των δενδρυλλίων, τα έντομα και τους νηματώδες, τις τομές

εμβολιασμού, καθώς και από την επίδραση χαλαζιού και παγετού ή ακόμη από σχισμές που προκαλούνται μερικές φορές από τη γρήγορη ανάπτυξη των φυτικών οργάνων .

Αν και ο καρκίνος προκαλείται από τους τρεις βιότυπους του παθογόνου, η παρουσία ζωντανών βακτηρίων μέσα στους φυτικούς ιστούς είναι αναγκαία μόνο για τρεις περίπου ημέρες ώστε να γίνει η μετατροπή των φυσιολογικών κυττάρων σε καρκινικά. Κατά τη διάρκεια αυτής της περιόδου ένα μικρό τεμάχιο του πλασμιδίου Ti, το T-DNA μεταφέρεται από το βακτηριακό κύτταρο και ενσωματώνεται στο πυρηνικό DNA του φυτικού κυττάρου σαν φορέας γενετικών μηνυμάτων που εκφράζονται στη συνέχεια από αυτό. Έτσι το φυτικό κύτταρο μετατρέπεται μόνιμα σε καρκινικό και αποκτά την ικανότητα βιοσυνθέσεως ουσιών που λέγονται «οπίνες» και που υπάρχουν μόνο σε καρκινικούς ιστούς. Τις «οπίνες» αυτές μπορούν να χρησιμοποιήσουν σαν αποκλειστική πηγή άνθρακος και αζώτου μόνο βακτήρια που έχουν το αντίστοιχο πλασμίδιο Ti.

Το παρασιτικό σύστημα που δημιουργείται με τη καρκινογένεση στα φυτά ονομάστηκε «γενετικός αποικισμός». Το παράσιτο αποικίζει τον ξενιστή με ένα κομμάτι DNA το οποίο κατευθύνει τις βιοχημικές δραστηριότητες του φυτού στη παραγωγή απαραίτητων ουσιών προς όφελος του παθογόνου βακτηρίου. Οι οπίνες είναι ασυνήθεις μεταβολίτες, παράγωγα αμινοξέων που δεν βρίσκονται σε υγιείς φυτικούς ιστούς. Μέχρι σήμερα έχουν διαπιστωθεί στους καρκινικούς όγκους 6 οικογένειες τέτοιων ουσιών δηλαδή της οκτοπίνης, νοπαλίνης, αγροπίνης, αγροσιπίνης (Α

και Β), αγροπίνης (C και D) και λευκοπίνης. Πάντως οι περισσότεροι συνηθισμένες οπίνες που βρίσκονται στους όγκους είναι η οκτοπίνη που σχηματίζεται κατά κανόνα στους όγκους του αμπελιού και η νοπαλίνη που σχηματίζεται στους όγκους των δένδρων. Αυτά ισχύουν κυρίως για τη χώρα μας που τα βακτήρια των βιότυπων 1 και 2 που προσβάλλουν τα δένδρα περιέχουν νοπαλινικά πλασμίδια T_i ενώ τα βακτήρια του βιότυπου 3 που προσβάλλουν το αμπέλι περιέχουν οκτοπινικά πλασμίδια T_i. Βακτήρια του βιότυπου 1 που σπάνια απομονώνονται από αμπέλι φαίνεται πως περιέχουν επίσης οκτοπινικό πλασμίδιο T_i. Στα πλασμίδια αυτά υπάρχουν οι γόννοι για τη σύνθεση από τους φυτικούς ιστούς της αντίστοιχης οπίνης αλλά και για τη χρησιμοποίηση της σαν πηγή άνθρακα και αζώτου από τα ίδια τα βακτήρια. Στα πλασμίδια T_i υπάρχουν ακόμη και διάφοροι άλλοι γόννοι που ελέγχουν πολλές άλλες ιδιότητες των καρκινικών ιστών και των παθογόνων βακτηρίων.

Η διαδικασία μετατροπής του κανονικού κυττάρου σε καρκινικό ακολουθεί τρεις φάσεις : φάση προετοιμασίας, φάση επαγωγής, φάση ερεθισμού και συμπληρώσεως. Πολλές φορές παρατηρούνται δευτερογενείς όγκοι σε διάφορες αποστάσεις από το σημείο που σχηματίστηκε ο πρωτογενής όγκος. Οι όγκοι αυτοί συνήθως δεν έχουν βακτήρια.

Η θερμοκρασία του περιβάλλοντος παίζει σημαντικό ρόλο στο σχηματισμό των όγκων. Στην περισσότερο ευνοϊκή για την αρρώστια θερμοκρασία που είναι 14-28°C οι όγκοι εμφανίζονται μέσα σε 8-15 ημέρες από τη μόλυνση των φυτών. Σε θερμοκρασίες πάνω από 30 °C οι μολύνσεις δεν

είναι επιτυχείς και ο σχηματισμός των όγκων αναστέλλεται. Στις χαμηλές θερμοκρασίες η εμφάνιση των όγκων γίνεται μετά από 2-6 μήνες και με αρκετά βραδεία εξέλιξη. Αναλυτικά ο βιολογικός κύκλος του παθογόνου παρουσιάζεται στα σχήματα 1 & 2.

Ακόμη έχει βρεθεί ότι η ασθένεια ευνοείται σε σχετικώς αλκαλικά εδάφη με αμμώδη σύσταση και καλή αποστράγγιση, ενώ δεν ευνοείται στα όξινα και βαριά εδάφη.

Πολλές φορές, για τους λόγους που αναφέρονται στην εισαγωγή και ιδίως όταν πρόκειται για έλεγχο εισαγόμενου πολλαπλασιαστικού υλικού είναι απαραίτητη η εργαστηριακή διάγνωση της ασθένειας. Αυτό μπορεί να γίνει με την απομόνωση, προσδιορισμό και διαπίστωση της παθογένειας του βακτηρίου. Μερικές φορές όμως η μέθοδος αυτή είναι δύσκολο ή αδύνατο να εφαρμοστεί όπως π.χ αν πρόκειται για όγκους που δεν έχουν παθογόνα βακτήρια. Στον Πίνακα 1 παρουσιάζεται η συχνότητα εμφάνισης της ασθένειας σε διάφορους ξενιστές του παθογόνου.

Πίνακας 1. Συχνότητα μόλυνσης ξενιστών με βακτήρια του γένους

Agrobacterium spp.

Υψηλή συχνότητα

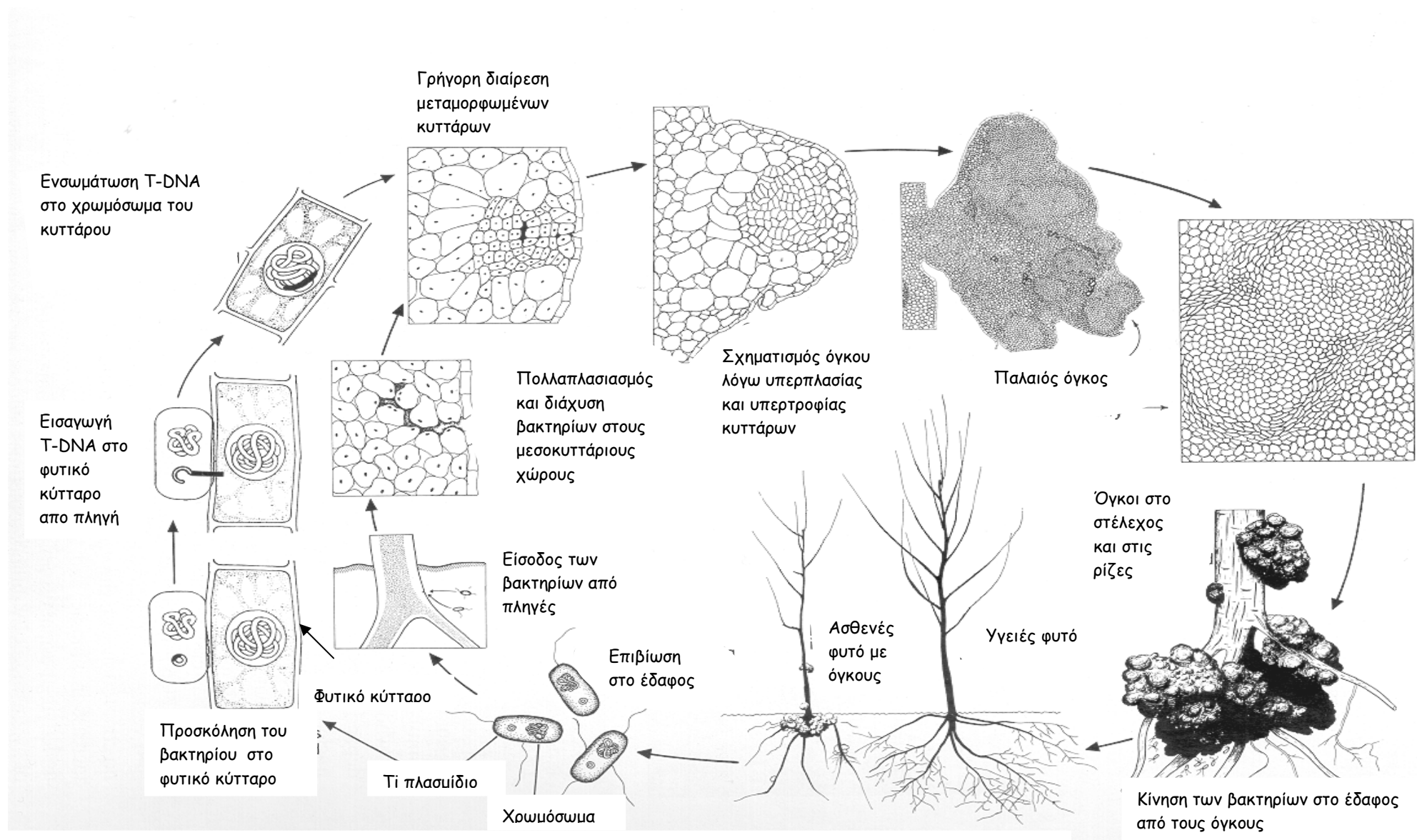
Αμυγδαλιά, κερασιά, βερικοκιά, ροδακινιά, δαμασκηνιά (*Prunus*), μηλιά (*Malus*), ευώνυμο (*Euonymus*), αμπέλι (*Vitis*), λεύκα (*Populus*), σμέουρο (*Rubus*), τριανταφυλλιά (*Rosa*), καρυδιά (*Juglans*), και ιτιά (*Salix*).

Χαμηλή συχνότητα

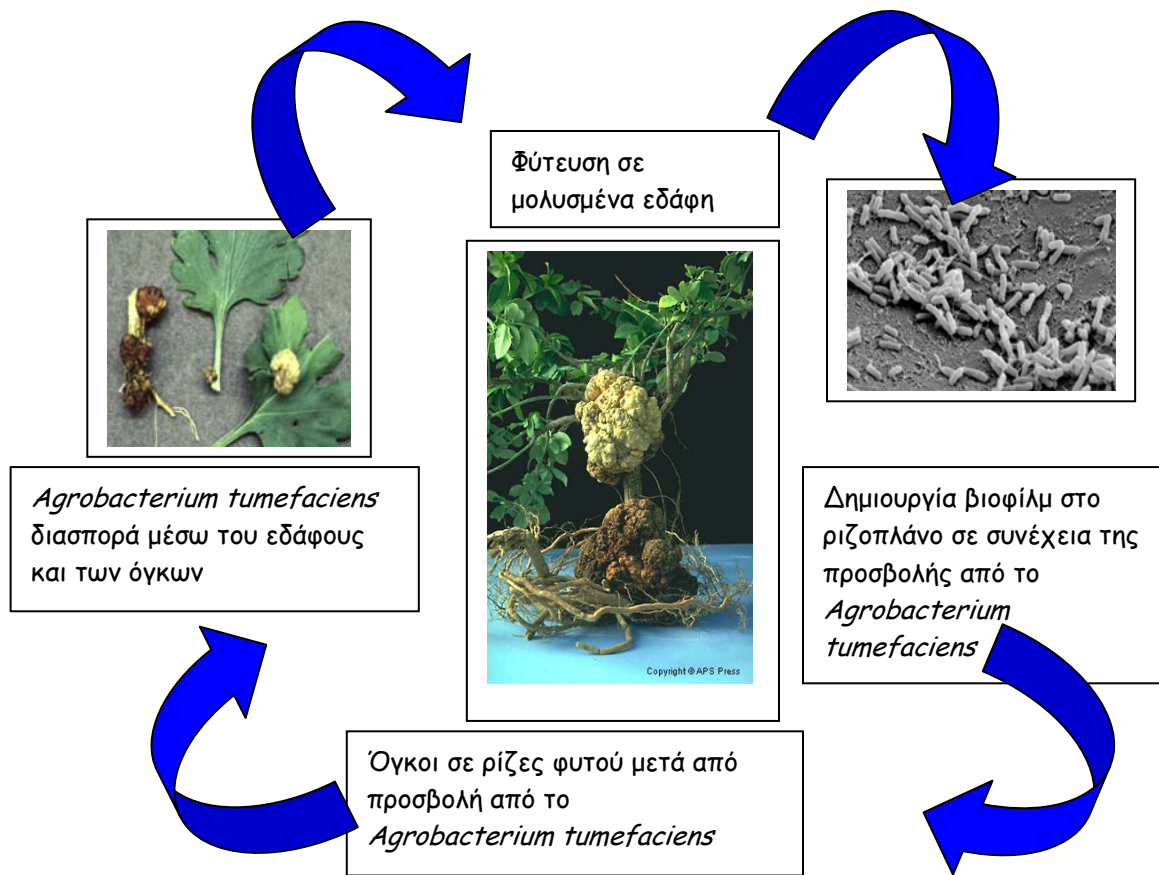
Χρυσάνθεμο (*Chrysanthemum* spp.), ξυνά (*Citrus* spp.), κληματίδα (*Clematis* spp.), φίκος (*Ficus* sp.), γυψοφίλη (*Gypsophila* sp.), πασχαλιά (*Syringae*), Macadamia, κατηφές Marigold (*Tagetes*), ελιά (*Olea*), εχλαδιά (*Pyrus*), τσιντόνια Quince (*Chaenomeles*), φραγκοσταφυλιά (*Ribes* spp.), Wild Blackberry (*Rubus*) και γλυτσίνα (*Wisteria*).

Περιστασιακά / Σπάνια

Αστράκι (*Aster*), βετούλη-σημύδα Birch (*Betula*), μурτιλιά Blueberry (*Vaccinium*), κακτώδη (*Cactus*), ντάλια (*Dahlia* spp.), Gossypium, ορτανσία Hydrangea, Impatiens, λιπόκεδρος Incense-Cedar (*Calocedrus*), άτσερ-σφένδαμος Maple (*Acer*), ροδόδενδρο (*Rhododendron* spp.), σεκόια (*Sequoia*) και πικέα Spruce (*Picea*).



Σχήμα 1. Αναλυτικός βιολογικός κύκλος του *Agrobacterium tumefaciens*



Σχήμα 2. Σύνοψη βιολογικού κύκλου του *Agrobacterium tumefaciens* (Προσαρμογή από Kado, 2002).

ΤΟ ΦΥΤΟ: ΑΣΤΕΡ (*Aster chinensis*)

Το άστερ ή αστράκι (*Aster chinensis*) είναι φυτό πολυετές, μικρής ημέρας, ιθαγενές της Β. Αμερικής. Ανήκει στην οικογένεια των Compositae όπως το χρυσάνθεμο. Στην Ελλάδα η καλλιέργεια του ως καλλωπιστικού φυτού είναι ακόμη περιορισμένη και κυρίως χρησιμοποιείται σε συνθέσεις βραχόκηπων ή ως συνοδευτικό φυτό σε ανθοδέσμες. Είναι φυτό που προσαρμόζεται πολύ καλά στις εδαφοκλιματικές συνθήκες της Ελλάδας και η καλλιέργειά του ευνοείται σε ουδέτερο εδαφικό pH, όπως το γαρύφαλλο και το χρυσάνθεμο. Το άστερ πολλαπλασιάζεται με φυλλοφόρα μοσχεύματα που παίρνονται από τη βάση του φυτού ενώ τα μητρικά φυτά συχνά προέρχονται από μεριστωματικό πολλαπλασιασμό. Η οικογένεια Asteraceae ή Compositae είναι η μεγαλύτερη όσον αφορά το πλήθος των ανθοκομικών κυρίως ειδών αφού περιλαμβάνει περισσότερα από 1600 είδη (Hind *et al.*, 1995), τα οποία απαντώνται συνήθως στις εύκρατες ζώνες και στα τροπικά υψίπεδα. Το χαρακτηριστικό των ειδών της οικογένειας είναι το άνθος που διαθέτουν το οποίο ουσιαστικά αποτελεί την ταξιανθία με πολλά άνθη τακτοποιημένα πάνω σε συμπαγή δίσκο (ανθικός δίσκος - κεφάλιο) (Wagner *et al.*, 1990; Γιαννοπολίτης, 2003). Ο σπόρος είναι αχάινιο και φέρει πάππο (πτητική κατασκευή του σπόρου). Επιπρόσθετα η εκμετάλλευση των ειδών της οικογένειας Asteraceae, επικεντρώνεται στους τομείς: της φαρμακευτικής, με είδη τα οποία παράγουν φαρμακευτικές ουσίες και χρησιμοποιούνται ως βότανα (π.χ. καλέντουλα, χαμομήλι, εχινάντσια κ.α.), της παραγωγικής ανθοκομίας, με καλλωπιστικά είδη όπως η ντάλια, το χρυσάνθεμο, η ζέρμπερα, το άστερ, η γαϊλάρδια κ.π.α.) και της φυτοπροστασία για την παραγωγή εντομοαπωθητικών ουσιών (π.χ. είδη του γένους *Chrysanthemum*, *Tanacetum*, *Pulicaria*). Φυτεύονται σε βραχόκηπους, ομάδες και γλάστρες. Τα ετήσια φυτά και τα τυπικά είδη πολλαπλασιάζονται με σπόρους που δε σκεπάζουμε κατά τη σπορά τους, ενώ οι ποικιλίες των πολυετών φυτών

πολλαπλασιάζονται με διαίρεση νωρίς την άνοιξη και με μοσχεύματα μη ανθοφόρων βλαστών το καλοκαίρι. Στον πίνακα 2 αναφέρονται τα σημαντικότερα παθογόνα που προσβάλλουν το άστερ (*Aster chinensis*).

ΠΙΝΑΚΑΣ 2. Ασθένειες του φυτού *Aster chinensis*

ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ & ΠΑΘΟΓΟΝΑ ΑΙΤΙΑ	
Φουζαρίωση	Fusarium wilt (<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>callistephi</i>)
Τεφρά Σήψη	Gray mold (<i>Botrytis cinerea</i>)
Κηλίδωση	Leaf spots (<i>Stemphylium callistephi</i>)
Σηψηρριζία	Root rot (<i>Pythium</i> and <i>Phytophthora</i> spp.)
Σκωρίαση	Rust (<i>Coleosporium asterum</i>)
Σήψη	Sclerotinia rot or Cottony rot (<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>)
Σήψη στελέχους	Stem rot (<i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Botrytis cinerea</i>)
Βερτισιλλίωση	Verticillium wilt (<i>Verticillium dahliae</i>)
Καρκίνος	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
Κιτρίνισμα	Aster yellows (Aster yellows phytoplasma)

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Στόχος της πτυχιακής εργασίας είναι να προσδιορίσουμε, να ταυτοποιήσουμε και να ελέγξουμε την παθογένεια βακτηριακών στελεχών του *Agrobacterium tumefaciens* που υπήρχαν στην συλλογή του εργαστηρίου Φυτοπαθολογίας - Βακτηριολογίας του ΤΕΙ Κρήτης, αλλά και νέων απομονώσεων του βακτηρίου από το καλλωπιστικό φυτό άστερ (*Aster chinensis* cv. Blue Monarch).

Απομόνωση βακτηριακών στελεχών

Για την απομόνωση νέων στελεχών του βακτηρίου έγιναν απομονώσεις από το εσωτερικό νέων όγκων από φυτά άστερ. Μικρή ποσότητα προσβλημένου ιστού τεμαχίστηκε σε 2-3 ml απεσταγμένου και αποστειρωμένου νερού. Είκοσι (20) ml από το αιώρημα που δημιουργήθηκε απλώθηκε σε τρυβλία που περιείχαν θρεπτικό υπόστρωμα NAG ή MGY ή/και σε θρεπτικά υποστρώματα : 1Α το οποίο είναι ημiekλεκτικό στο βióτυπο 1 του *Agrobacterium* (Schroth's medium), 2E το οποίο είναι εκλεκτικό στο βióτυπο 2 του *Agrobacterium* με (Brisbane & Kerr's Medium) και RSS3 το οποίο είναι εκλεκτικό στο βióτυπο 3 του *Agrobacterium* (Roy & Sasser Medium), με τη μέθοδο της διασποράς. Η επώαση έγινε στους 28 °C για τουλάχιστον 48 ώρες. Οι επικρατέστερες αποικίες που παρατηρήθηκαν κατά τις απομονώσεις, υποκαλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα NAG μέχρι να δημιουργηθεί καθαρή καλλιέργεια των απομονώσεων. Οι απομονώσεις που επιλέχθηκαν διατηρήθηκαν σε καλλιέργεια σωλήνα σε NAG στους 4 °C σε όλη την διάρκεια της εργασίας. Τα στελέχη που επιλέχθηκαν, απομονώθηκαν από διαφορετικά φυτά άστερ. Επιπρόσθετα χρησιμοποιήθηκαν στελέχη του βακτηρίου από παλαιότερες απομονώσεις του παθογόνου.

Ταυτοποίηση των απομονώσεων

Για την ταυτοποίηση των απομονώσεων του Άστερ ακολουθήθηκε η μεθοδολογία που περιγράφεται στο *Laboratory Guide for Identification of plant pathogenic bacteria* (Schaad *et al.*, 2001). Στη διάρκεια της εργασίας χρησιμοποιήθηκαν συγκριτικά δυο ταυτοποιημένα στελέχη του βακτηρίου *Agrobacterium tumefaciens* το στέλεχος Ag20 που ανήκει στο βιότυπο 1 και το στέλεχος Ag28 που ανήκει στο βιότυπο 2.

Δοκιμές παθογένειας

Οι μολύνσεις έγιναν, όπως περιγράφονται από τους Lelliot & Sands (1987), σε φυτά άστερ, πιπεριάς, καπνού, ηλιανθου και τομάτας. Είκοσι (20) μl βακτηριακού αιωρήματος συγκέντρωσης περίπου 10^8 cfu/ml τοποθετήθηκαν με τη πιπέτα σε τομές που έγιναν στα στελέχη των παραπάνω φυτών με αποστειρωμένη λεπίδα. Τα βακτηριακά αιωρήματα, για τις μολύνσεις, δημιουργήθηκαν σε αποστειρωμένο και απεσταγμένο νερό, από καλλιέργεια 48h των αντίστοιχων βακτηρίων σε θρεπτικό υπόστρωμα NAG. Οι θέσεις μόλυνσης καλύφθηκαν με ταινία παραφίλμ, για δύο μέρες, με σκοπό τη διατήρηση της υγρασίας των ιστών. Η δημιουργία όγκων αξιολογήθηκε για διάστημα 30 ημερών. Στο διάστημα αυτό τα φυτά αναπτύχθηκαν σε ελεγχόμενες συνθήκες θερμοκρασίας 25- 28 °C και σε φωτοπερίοδο 16h. Η επαναπομόνωση του βακτηρίου από τους σχηματισθέντες όγκους έγινε σε θρεπτικό υπόστρωμα NAG και D1M.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Συμπτώματα της ασθένειας

Η προσβολή σημειώθηκε σε επιδεικτική καλλιέργεια του φυτού άστερ (*Aster chinensis*) σε θερμοκήπιο στο αγρόκτημα του ΤΕΙ Κρήτης στο Ηράκλειο. Η ασθένεια εκδηλώνεται με τον σχηματισμό όγκων σε διάφορα σημεία στο στέλεχος του φυτού. Οι όγκοι αρχικά είναι υπόλευκοι έχουν μαλακή σύσταση και σταδιακά σκληραίνουν και παίρνουν χρώμα καστανό (Εικόνα 1). Αν και δεν παρατηρήθηκε άμεση ξήρανση του υπερκείμενου του όγκου τμήματος του στελέχους του φυτού, τα προσβεβλημένα στελέχη ήταν πιο κοντά και η ανθοταξία τους εμφάνιζε περιορισμένη ανάπτυξη.

Απομόνωση-Ταυτοποίηση του παθογόνου

Από τους όγκους των προσβεβλημένων φυτών απομονώνονται σταθερά βακτήρια στα θρεπτικά υποστρώματα NAG, MGY και 1A. Μη τυπικές αποικίες αναπτύχθηκαν στο υλικό 2E. Οι τυπικές αποικίες είχαν διάμετρο 2-3mm, ήταν κυρτές, λείες, άσπρες και γλοιώδεις σε θρεπτικό υλικό MGY και D1M (Εικόνα 5). Στο θρεπτικό υπόστρωμα 1A οι αποικίες μετά από επώαση 3-4 ημερών εμφανίζουν πορτοκαλί κέντρο με διαφανές άσπρο περιθώριο (Εικόνα 9&10). Με βάση το φαινότυπο των μορφολογικών, φυσιολογικών και βιοχημικών αντιδράσεων οι απομονώσεις του βακτηρίου που εξετάσαμε ταυτοποιούνται ως μέλη του βακτηρίου *Agrobacterium tumefaciens* με τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά να κατανέμονται μεταξύ των βιότυπων 1 και 3 του βακτηρίου

Αναλυτικά τα αποτελέσματα των δοκιμών ταυτοποίησης εμφανίζονται στον (Πίνακας 3).

Δοκιμές Παθογένειας

Οι περισσότερες από τις απομονώσεις του βακτηρίου από το Άστερ βρέθηκαν ικανές να προκαλούν τον σχηματισμό όγκων σε νεαρά φυτά Άστερ (Εικόνα 2, 4, 20 & 21), τομάτας (Εικόνα 18, 22 & 23), πιπεριάς (Εικόνα 1.3 & 19), ηλίανθου (Εικόνα 12-15), και καπνού. Όγκοι επίσης αναπτύχθηκαν σε ροδέλες καρότου (Εικόνα 16 & 17). Το μέγεθος των σχηματισθέντων όγκων ήταν παρόμοιο σε φυτά άστερ, τομάτας και πιπεριάς ενώ ήταν σημαντικά μικρότερο στον καπνό και το ηλίανθο. Αρκετές απομονώσεις βρέθηκαν να μην είναι παθογόνες σε κανένα φυτό (Εικόνα 18).

ΠΙΝΑΚΑΣ 3. Ταυτοποίηση βακτηριακών στελεχών που απομονώθηκαν από το φυτό Άστερ (*Aster chinensis*)

Διαγνωστικές Δοκιμές	<i>Agrobacterium</i>					
	Στελέχη ΑΣΤΕΡ	<i>tumefaciens</i>	<i>rhizogenes</i>	<i>vitis</i>	Ag20 2063 2007 2005	K84 Ag.28
		Moore et al. (2001)				
		biovar 1	biovar 2	biovar 3	biovar 1	biovar 2
Αριθμός στελεχών	15					
Παραγωγή 3-κετολακτόζη	-	+	-	V	+	-
Ανάπτυξη σε 2% NaCl	+	+	-	+	+	-
Ανάπτυξη στους 35 °C	+	+	V	V	+	-
Αντίδραση σε γάλα	Αλκαλική	Αλκαλική	Όξινη	Αλκαλική	Αλκαλική	Όξινη
Παραγωγή οξέος από:						
Ερυθριτόλη	-	-	+	-	-	+
Μελεζιτόζη	-	+	-	-	+	+
Παραγωγή αλκάλεος από:						
Μαλονικό οξύ	-	-	+	+	-	+
L(+) τρυγικό οξύ	-	-	+	+	-	+
Αμμωνιακός κιτρικός Fe	-	+	-	-	+	-
Αντίδραση οξειδάσης	+	+	V	V	+	-
Χρησιμοποίηση :						
κιτρικού Na	-	V	+	+	-	+
L - Τυροσίνη	-	-	+	-	-	+
Ζώνη διαύγειας σε: PDA + CaCO ₃	-	-	+	-	-	+
Κινητικότητα σε pH 7	+	+	+	-	+	+
Πηκτινόλυση σε pH 4,5	-	-	-	+	-	-
Ανάπτυξη σε θρεπτικό υπόστρωμα						
1A	-	+	-	-	+	-
2E	-	+	+	-	-	+
RSS 3	+	-	-	+	+	-
Παραγωγή Αγροσίνης	+	+	-	+	+	-

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Με βάση το φαινότυπο των μορφολογικών, φυσιολογικών και βιοχημικών αντιδράσεων και των δοκιμών παθογένειας, οι απομονώσεις του βακτηρίου που εξετάσαμε ταυτοποιήθηκαν ως ογκογόνα στελέχη του βακτηρίου *Agrobacterium tumefaciens*, με τα φαινοτυπικά τους χαρακτηριστικά να κατανέμονται ανάμεσα σε εκείνα των βιότυπων 1 και 3. Πρόκειται για την πρώτη αναφορά του παθογόνου σε φυτά *Aster chinensis* στην Ελλάδα και πιθανά στην Ευρώπη. Τα αποτελέσματα της εργασίας επιβεβαιώνουν και επικαιροποιούν τα αποτελέσματα παλαιότερης προκαταρκτικής προσπάθειας ταυτοποίησης στελεχών του βακτηρίου από το φυτό άστερ στο Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας - Βακτηριολογίας στο ΤΕΙ Κρήτης (Ρουμελη, 2003).

Μέχρι σήμερα ο καρκίνος των φυτών στην Κρήτη αποτελούσε μια σχετικά συνηθισμένη ασθένεια για τις δενδρώδεις καλλιέργειες, το αμπέλι και την τριανταφυλλιά (Γκούμας 1998). Ιδιαίτερα προβλήματα προκαλεί στο αμπέλι και την τριανταφυλλιά και η παρουσία του παθογόνου συνδέεται άμεσα με τη διασπορά του βακτηρίου διαμέσου του μολυσμένου πολλαπλασιαστικού υλικού. Πρόσφατα η ασθένεια εντοπίστηκε σε καλλιέργεια πιπεριάς (Γκούμας & Προυσανίδου, 2002), ενώ η παρουσία της σε κηπευτικές καλλιέργειες ήταν πάντα σποραδική και αφορούσε συνήθως μεμονωμένα φυτά κυρίως τομάτας. Η έξαρση της ασθένειας στις καλλιέργειες πιπεριάς στην Κρήτη αν και δεν είναι εύκολο να εξηγηθεί, όπως διαπιστώθηκε από τις δειγματοληψίες που πραγματοποιήθηκαν την τελευταία διετία 2000 - 2002, πιθανότατα να οφειλόταν στην διασπορά του παθογόνου με το φυτωριακό υλικό (σπορόφυτα) από συγκεκριμένα φυτώρια. Στην περίπτωση της ασθένειας του καρκίνου σε φυτά άστερ, πιστεύεται ότι το μόλυσμα πρέπει να προήλθε είτε από το έδαφος

του Θερμοκηπίου όπου αναπτυσσόταν η επιδεικτική καλλιέργεια του φυτού είτε να μεταφέρθηκε από φυτά τριανταφυλλιάς που αναπτύσσονταν σε γειτονικά τεμάχια σε επιδεικτικές καλλιέργειες στο ίδιο θερμοκήπιο.

Σε μελέτη των (Liao, *et al.*, 2001) τα βιοχημικά και φυσιολογικά φαινοτυπικά χαρακτηριστικά του *Agrobacterium tumefaciens* μελετήθηκαν σε απομονώσεις του βακτηρίου από φυτά τριανταφυλλιάς και άστερ. Πρόέκυψε ότι οι απομονώσεις από την τριανταφυλλιά ομαδοποιούνται σε μία ομάδα σε σχέση με τις απομονώσεις από το φυτό άστερ οι οποίες ομαδοποιούνται σε δύο διαφορετικές ομάδες, την ομάδα I και την ομάδα II. Οι απομονώσεις της ομάδας II από το φυτό άστερ βρέθηκαν ταυτόσημες με τα στελέχη της βιοovar 1 του *Agrobacterium tumefaciens*. Οι απομονώσεις της ομάδας I από τα φυτά άστερ και της τριανταφυλλιάς είχαν παρόμοια χαρακτηριστικά με στελέχη του *Agrobacterium rubi* και διέφεραν σημαντικά από τα στελέχη των βιοovar 1 and βιοovar 2 του *Agrobacterium tumefaciens*. Σύμφωνα με τη μοριακή ανάλυση με τη μέθοδο PCR-RFLP του 16S rDNA, οι απομονώσεις από την τριανταφυλλιά ομαδοποιούνται σε μία ομάδα. Αντίστοιχα, οι απομονώσεις από το φυτό άστερ ομαδοποιούνται πάλι σε δύο ομάδες οι οποίες όμως δεν ταυτίζονται με εκείνες των βιοχημικών και φυσιολογικών προφίλ. Με βάση λοιπόν όλα τα προηγούμενα οι απομονώσεις από την τριανταφυλλιά ομαδοποιούνται σε μια ομοιογενή ομάδα σε αντιδιαστολή με τις απομονώσεις από το άστερ που εμφανίζονται ετερογενείς και ομαδοποιούνται σε τρεις ομάδες. Ο εκκινητής (Primer pair of *δα*), που συσχετίζεται με την παραγωγή νοπαλίνης (nopaline) και οκτοπίνης (octopine), πολλαπλασίασε το αντίστοιχο τμήμα του DNA από τα βακτηριακά στελέχη του παθογόνου από το φυτό άστερ. Επίσης, τα ζεύγη εκκινητών *virA*, *virC1-D2*, and *iaaH*, μπόρεσαν πολλαπλασιάσουν το στόχο στο DNA από όλα τα στελέχη του φυτού άστερ και ως εκ τούτου φαίνεται ότι μπορούν να βρουν

εφαρμογή στη γρήγορη ταυτοποίηση και ανίχνευση των ογκογόνων στελεχών του *Agrobacterium* spp.

Στο Ισραήλ το *Agrobacterium tumefaciens* προκαλεί σημαντικά προβλήματα σε φυτώρια του φυτού άστερ και της τριανταφυλλιάς (Manulis *et al.*, 2001). Όσον αφορά το φυτό άστερ (*Aster* spp) τα φυτά προέρχονται είτε από nuclear stock, από μεριστωματικό πολλαπλασιασμό κορυφαίου μεριστώματος είτε από εισαγόμενα φυτά από την Ευρώπη. Όταν φυτά προερχόμενα και από τις δύο πηγές εξετάστηκαν για την παρουσία του *Agrobacterium tumefaciens* με τη μέθοδο Bio-PCR, βρέθηκε ότι τα φυτάρια από μεριστωματικό πολλαπλασιασμό και από το nuclear stock εμφάνισαν 4% & 15% μόλυνση, αντίστοιχα, ενώ το εισαγόμενο υλικό είχε 55% μόλυνση. Όταν η Bio-PCR χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο (plant indexing) υγιούς - αμόλυντου πολλαπλασιαστικού το ποσοστό μόλυνσης ήταν μηδέν. Τα αποτελέσματα αυτά υποστηρίζουν τη χρήση της μεθόδου Bio-PCR για την παραγωγή φυτών άστερ χωρίς μολύνσεις από το βακτήριο *Agrobacterium*.

Σε εργασία των Chen *et al.*, 1999, η βιοναρ 1 του βακτηρίου *Agrobacterium tumefaciens* προσδιορίστηκε ως το παθογόνο αίτιο του καρκίνου σε φυτά *Aster* spp., αν και ορισμένες απομονώσεις του βακτηρίου διαφοροποιούνται από το τυπικό βιοχημικό προφίλ της βιοναρ 1. Οι όγκοι, αναφέρεται ότι αναπτύσσονταν σε στελέχη, σε φύλλα και στην περιοχή του λαιμού σε εμπορικές καλλιέργειες του φυτού σε διάφορες περιοχές της Ταϊβαν. Αναφέρουν, ότι οι ποικιλίες με ροζ και μωβ άνθη ήταν πιο ευπαθείς από εκείνες με λευκά, με τα ποσοστά προσβολής να κυμαίνονται σε 90% και 25% αντίστοιχα. Στις ποικιλίες με λευκά άνθη οι όγκοι ήταν λιγότεροι σε αριθμό και μικρότεροι σε μέγεθος. Γενικά, οι όγκοι σχηματίζονταν σε πληγές και σε θέσεις που υπήρχαν νύγματα εντόμων, ενώ μεγάλοι όγκοι, με χρώμα σκούρο καστανό παρατηρήθηκαν στα εντός του εδάφους τμήματα, σε μερικά φυτά.

Το στέλεχος IL2 (πιθανά βιοναρ 1) του βακτηρίου *Agrobacterium tumefaciens* από το φυτό άστερ αναφέρεται σε μελέτη των Haas *et al.*, (1995), στο Ισραήλ χωρίς όμως την αναλυτική ταυτοποίηση του παθογόνου. Το Χρυσάνθεμο που ανήκει και αυτό στην οικογένεια Compositae, είναι γνωστό ότι είναι ευπαθές στις προσβολές από το *Agrobacterium tumefaciens* (Miller, 1975; Buch & Puerpke, 1991). Από τα παραπάνω συμπεραίνεται ότι τα αποτελέσματα της παρούσης εργασίας επιβεβαιώνονται από εκείνα παρόμοιων εργασιών.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Brisbane PG, Kerr A, 1983. Selective media for three biovars of *Agrobacterium*. *Journal of Applied Bacteriology* 54, 425-31.
2. Bush, A.L. and S.G. Pueppke. 1991. Characterization of an unusual new *Agrobacterium tumefaciens* strain from *Chrysanthemum morifolium* Ram. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 2468-2472.
3. Γιαννοπολίτης, Κ.Ν. 2003. Οδηγός αναγνώρισης των ζιζανίων της Ελλάδας (Μέρος 1ο). *Γεωργία - Κτηνοτροφία* 9: 94-145
4. Γκούμας Δ.Ε. 1998. Ο καρκίνος του αμπελιού. In: Η αμπελουργία στην Κρήτη προβλήματα και προοπτικές σελ. 321-324.
5. Γκούμας Δ.Ε. & Ε. Προυσανίδου 2002. Χαρακτηρισμός απομονώσεων του *Agrobacterium tumefaciens* από πιπεριά. Περίληψεις ανακοινώσεων 11^{ου} Πανελληνίου Φυτοπαθολογικού Συνεδρίου, Πρέβεζα 2002, σελ. 51.
6. Chen F-C, Hseu S-H, Hung S-T, Chen M-C, and Lin C-Y, 1999. Leaf, stem and crown galls on perennial asters caused by *Agrobacterium tumefaciens* in Taiwan. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 40: 237-242
7. Δημητριάδης Σ. Δ. 1992. Ο καρκίνος των φυτών. Αθήνα, σελ.286.
8. De Cleene, M. and J. De Ley. 1976. The host range of crown gall. *Bot. Rev.* 42: 389-466.
9. Haas, J.H., L.W. Moore, W. Ream, and S. Manulis. 1995. Universal PCR primers for detection of phytopathogenic *Agrobacterium* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 2879-2884.
10. Hind, D. J. N., Jeffrey C., and Pope G. V. 1995. Advances in Compositae systematics. - Royal Bot. Gardens, Kew, pp. 469
11. Kado, C. I. 2002. Crown gall tumors. Pages 1-3. in: Encyclopedia of Genetics. S. Brenner and J. H. Miller, eds. Academic Press, San Diego, CA.

12. Keane PJ, Kerr A, New PB, 1970. Crown gall of stone fruit. II Identification and nomenclature of *Agrobacterium* isolates. *Australian Journal of Biological Sciences*. 23, 585-95.
13. Liao, H.L., Huang, T.C., and Chen, C.Y. 2001. Characteristics of rose and aster strains of *Agrobacterium* in Taiwan. *Plant Pathol. Bull.* 10:27-36
14. Miller, I.N. 1975. Leaf, stem, crown, and root galls induced in *Chrysanthemum* by *Agrobacterium tumefaciens*. *Phytopathology* 65: 805-813.
15. Moore, L.W., Bouzar H. and Burr T. 2001. *Agrobacterium*. In: Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria, 2nd ed., ed. N.W. Schaad *et.al.*, pp. 17-35. Minneapolis: American Phytopathological Society Press.
16. Manulis S., Chalupowicz L., Dror O., and Kleitman F., 2002. Molecular diagnostic procedures for production of pathogen-free propagation material. *Pest Manag Sci*, 58:1126-1131
17. Παναγόπουλος Χ.Γ., 2007. Ασθένειες Καρποφόρων Δένδρων και Αμπέλου. Εκδόσεις Σταμούλη Α.Ε., Αθήνα 2007.
18. Ρούμελη Β., 2003. Aster: Ένας νέος ξενιστής του *Agrobacterium tumefaciens* στην Ελλάδα. Πτυχιακή εργασία, ΠΣΕ, ΤΕΙ Κρήτης
19. Schroth MN, Thompson JP, Hildebrand DC, 1965. Isolation of *Agrobacterium tumefaciens* - *A. radiobacter* group from the soil. *Phytopathology* 55, 645-7.
20. Wagner, W.L., D.R. Herbst, and S.H. Sohmer. 1990. Manual of the Flowering Plants of Hawaii, Vol. I. University of Hawaii Press, Honolulu. pp. 988

Επιλεγμένα sites από το διαδίκτυο:

<http://helios.bto.ed.ac.uk/bto/microbes/crown.htm>

<http://www4.nas.edu/beyond/beyonddiscovery.nsf/web/seeds4?OpenDocument>

<http://opbs.okstate.edu/~melcher/MG/MGW4/MG4373.html>

<http://www.sdcma.org/GMFoodsBrochure.pdf>

<http://www.gardenersnet.com/flower/aster.htm>

<http://www.flowersociety.org/showyasterstudy.htm>

<http://biologi.uio.no/plfys/haa/gen/gmo.htm>

ΦΩΤΟΓΡΑΦΙΚΟ ΥΛΙΚΟ

Εικόνα 1: Ανάπτυξη όγκων σε φυτά: 1. ευώνυμο. 2. πελαργόνιο. 3. πιπεριάς. 4. τριανταφυλλιάς. 5. πυρηνόκαρπα. 6. αμπέλι



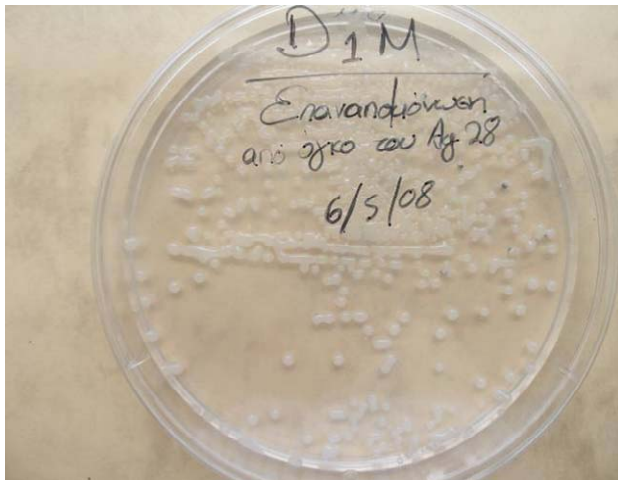
Εικόνα 2-4. Φυσική μόλυνση του *Agrobacterium tumefaciens* σε φυτά *Aster chinensis*



- Καλλιέργεια του *Aster chinensis*



Εικόνα 5 - 8. Καλλιέργεια - αποικίες και βιοχημικές δοκιμές ταυτοποίησης στελεχών του *Agrobacterium tumefaciens* από φυτά *Aster chinensis*



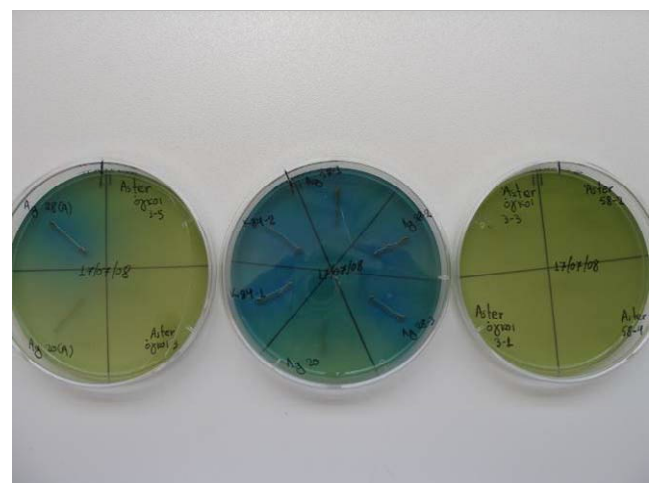
Καλλιέργεια του *Agrobacterium tumefaciens* σε θρεπτικό υπόστρωμα D1M



Δοκιμή αμμωνιακού κιτρικού Fe

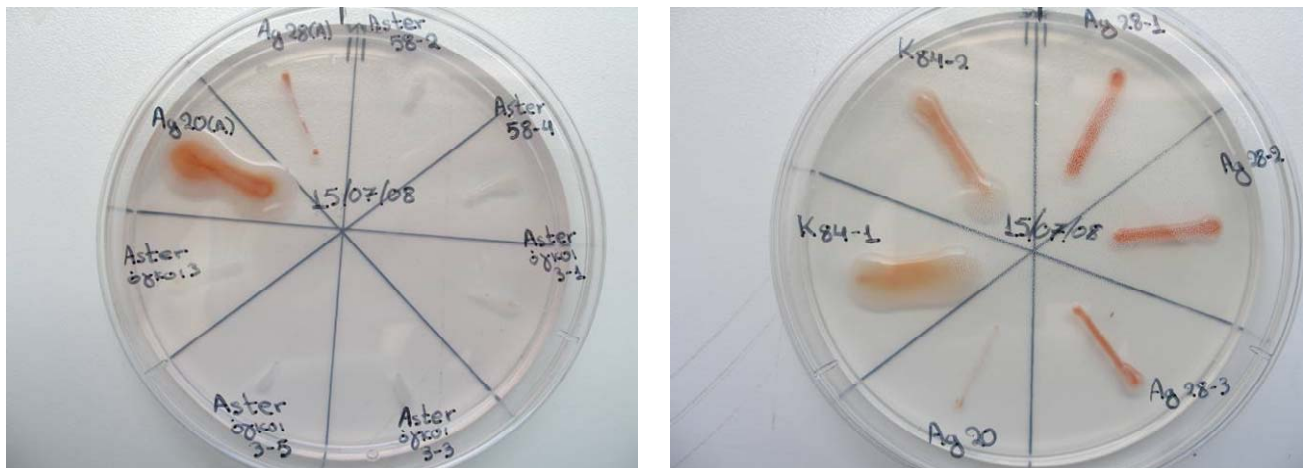


Ανάπτυξη βακτηριακών στελεχών σε 2% NaCl

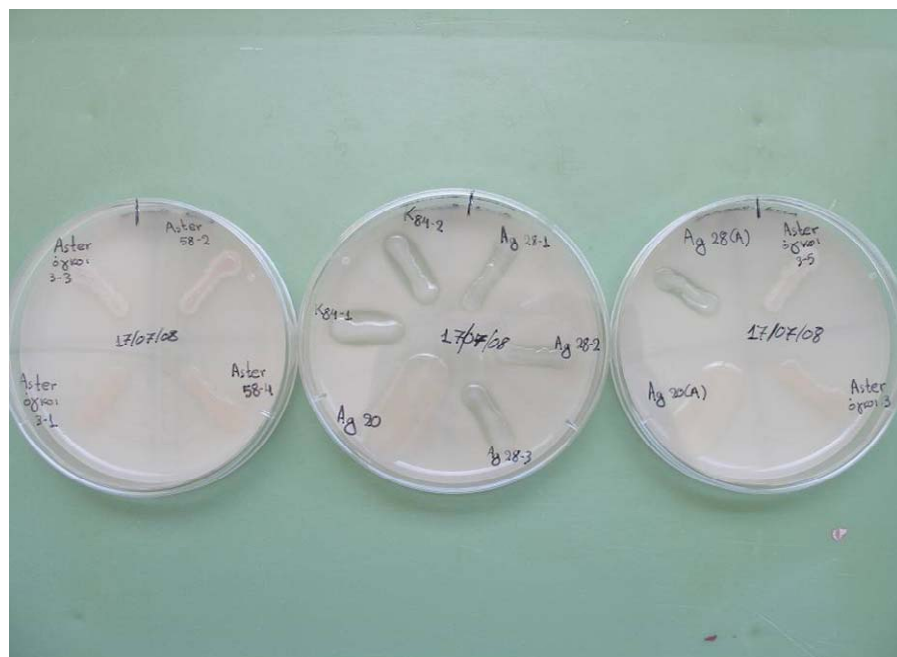


Δοκιμή χρησιμοποίησης κιτρικού Na

Εικόνα 9 - 11. Καλλιέργεια και βιοχημικές δοκιμές ταυτοποίησης στελεχών του *Agrobacterium tumefaciens* από φυτά *Aster chinensis*



Ανάπτυξη βακτηριακών στελεχών σε θρεπτικό υπόστρωμα 2Ε



Δοκιμή δημιουργίας ζώνης διαύγειας σε: PDA + CaCO₃

Εικόνα 12-15. Τεχνητές μολύνσεις στελεχών του *Agrobacterium tumefaciens* σε φυτά ηλιανθου



Στέλεχος Aster 3-1



Στέλεχος Aster 3-5



Στέλεχος Ag28-2

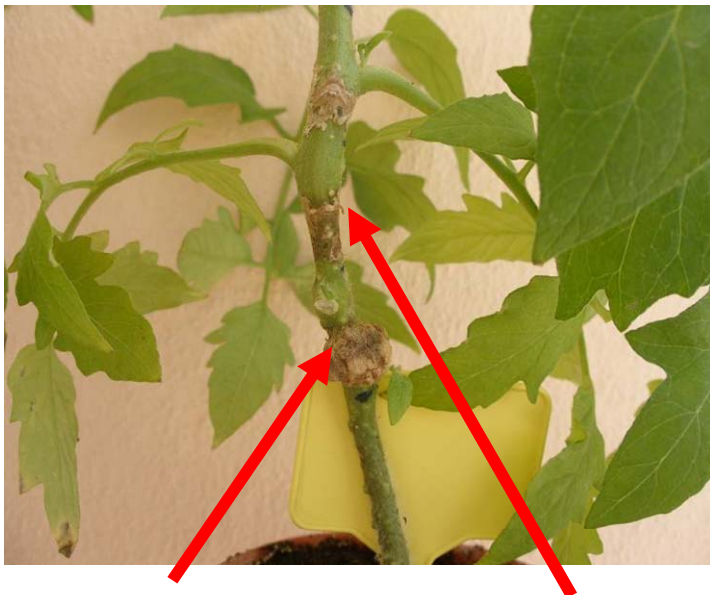


Στέλεχος Aster 3-5

Εικόνα 16 - 19. Τεχνητές μολύνσεις στελεχών του *Agrobacterium tumefaciens* σε ροδέλες καρώτου και σε φυτά τομάτας και πιπεριάς



Screenings παθογένειας σε ροδέλες καρώτου με απομονώσεις του βακτηρίου από το φυτό *Aster chinensis*

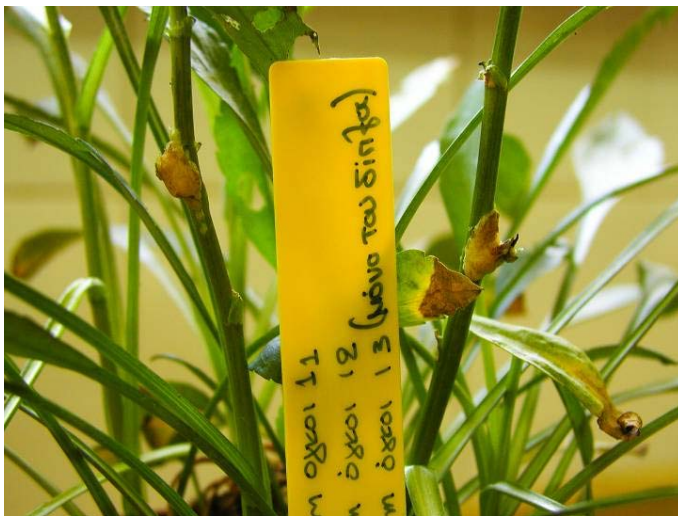


Επιτυχία και αποτυχία δημιουργίας μόλυνσης σε φυτά τομάτας με στελέχη του παθογόνου από το φυτό *Aster chinensis*



Ανάπτυξη όγκου σε φυτό πιπεριάς με στελέχη του παθογόνου από το φυτό *Aster chinensis*

Εικόνα 20-23. Δοκιμές παθογένειας: Τεχνητές μολύνσεις στελεχών του *Agrobacterium tumefaciens* σε φυτά *Aster chinensis* και τομάτας



Ανάπτυξη όγκων σε φυτά *Aster chinensis* με απομονώσεις του βακτηρίου από το φυτό *Aster chinensis*



Ανάπτυξη όγκων σε φυτά τομάτας με στελέχη του βακτηρίου από το φυτό *Aster chinensis*