

2008

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

ΠΤΥΧΙΑΚΗ
ΜΕΛΕΤΗ



**ΣΥΓΚΟΝΙΟ (*SYNGONIUM PODOPHYLLUM*): ΕΝΑΣ ΝΕΟΣ
ΞΕΝΙΣΤΗΣ ΤΟΥ *PSEUDOMONAS VIRIDIFLAVA* ΣΤΗΝ
ΕΛΛΑΔΑ**

ΣΠΟΥΔΑΣΤΡΙΑ : ΧΑΛΑΚΑΤΕΒΑΚΗ ΑΘΗΝΑ

ΕΙΣΗΓΗΤΗΣ : ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ Δρ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ ΓΚΟΥΜΑΣ

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

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ
ΣΥΓΚΟΝΙΟ(*SYNGONIUM PODOPHYLLUM*) : ΕΝΑΣ ΝΕΟΣ
ΞΕΝΙΣΤΗΣ ΤΟΥ *PSEUDOMONAS VIRIDIFLAVA* ΣΤΗΝ ΕΛΛΑΔΑ



ΣΠΟΥΔΑΣΤΡΙΑ: ΧΑΛΑΚΑΤΕΒΑΚΗ ΑΘΗΝΑ
ΕΙΣΗΓΗΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΔΡ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ ΓΚΟΥΜΑΣ
ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2008

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	ΣΕΛΙΔΑ
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	4
1.1 Ξενιστής : Συγκόνιο (<i>Syngonium podophyllum</i>).....	4
1.2 Γενικά για το βακτήριο <i>Pseudomonas viridiflava</i>	5
1.3 Βακτηριακή κηλίδωση του συγκόνιου	7
2.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	8
2.1 Απομόνωση του παθογόνου	8
2.2 Δοκιμές παθογένειας.....	10
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	11
3.1 Περιγραφή των συμπτωμάτων της ασθένειας.....	11
3.2 Απομόνωση και ταυτοποίηση του παθογόνου.....	12
3.3 Δοκιμές παθογένειας	13
3.3.1 Αντίδραση υπερευαισθησίας στον καπνό και σήψη κονδύλων πατάτας.....	13
3.3.2 Τεχνητές μολύνσεις σε φυτά συγκόνιου	13
3.3.3 Τεχνητές μολύνσεις σε φυτά τομάτας	16
3.3.4 Τεχνητές μολύνσεις σε λοβούς φασολιάς.....	16
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	17
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	18
6. ΦΩΤΟΓΡΑΦΙΚΟ ΥΛΙΚΟ	19

Συγκόνιο (*Syngonium podophyllum*): Ένας νέος ξενιστής του *Pseudomonas viridiflava* στην Ελλάδα.

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Ξενιστής : Συγκόνιο (*Syngonium podophyllum*)

Η οικογένεια των Αρωδών (Aracea) μας έχει χαρίσει πολύ όμορφα φυτά. Ένα από αυτά είναι το συγκόνιο με 14 περίπου είδη που προέρχονται από την Τροπική Κεντρική και Νότιο Αμερική.

Τα συγκόνια είναι φυτά συγγενικά με τα Φιλόδεντρα και τους Πόθους, αλλά η φροντίδα τους είναι κάπως πιο δύσκολη. Είναι βασικά αναρριχητικά φυτά και αναπτύσσονται καλύτερα αν τοποθετηθεί στη γλάστρα τους υποστηρικτικός πάσσαλος από βρύα ή καλάμι.

Γενικά καλλιεργούνται δυο είδη. Το *Syngonium podophyllum* (συγκόνιο το ποδόφυλλο) «Σμαραγδόπετρα» έχει καταπράσινα φύλλα και πιο συγκροτημένη εμφάνιση. Επίσης, στην αγορά προσφέρεται η ποικιλόχρωμη ποικιλία το ποδόφυλλο το λευκόγραμμο. Το δεύτερο είδος το *Syngonium vellozianum* (συγκόνιο το Βελλοζιανό) είναι επίσης αναρριχητικό φυτό με ελκυστικότερα και στιλπνότερα φύλλα από τις άλλες ποικιλίες. Απαιτούν ελάχιστη χειμερινή θερμοκρασία 16-18 °C η οποία θα πρέπει να διατηρηθεί αυξανόμενη μέχρι 20-30 °C κατά τη διάρκεια της βλαστικής περιόδου. Επίσης απαιτούν υψηλή υγρασία συμπεριλαμβανομένης και της ύγρανσης των φύλλων τακτικά, καλό φωτισμό αλλά όχι άμεση ηλιακή ακτινοβολία, ενώ ανέχονται και χαμηλά επίπεδα φωτισμού.

Το *Syngonium podophyllum* είναι το πιο συχνά καλλιεργούμενο είδος το οποίο χρησιμοποιείται ως καλλωπιστικό φυτό εσωτερικού και εξωτερικού χώρου από το τέλος του 19^{ου} αιώνα. Αρχικά μπερδευόταν με το παρόμοιο αφρικάνικο γένος *Nepenthes* όπου ακόμα και σήμερα χρησιμοποιείται σαν κοινό όνομα για το φυτό. Το δικό του γένος του δόθηκε το 1879.

1.2 Γενικά για το παθογόνο βακτήριο *Pseudomonas viridiflava*.

Τα φθορίζοντα, αρνητικά στη δοκιμή της οξειδάσης, φυτοπαθογόνα βακτήρια του γένους *Pseudomonas* ταξινομούνται παραδοσιακά σε δύο είδη: ως *P. syringae* και ως *P. viridiflava*, με το πρώτο να περιλαμβάνει περισσότερους από 40 παθότυπους. Ο όρος παθότυπος αναφέρεται σε στελέχη που ομαδοποιούνται σε επίπεδο υποείδους βάση του εύρους των ξενιστών του βακτηρίου και τα συμπτώματα αλλά και με τη βοήθεια βιοχημικών δοκιμών. Από αυτά, η διαγνωστική ομάδα δοκιμών L.O.P.A.T. (L-παραγωγή Levan, O- παραγωγή οξειδάσης, P-πηκτινόλυση κονδύλων πατάτας, A-διάσπαση αργινίνης, T-υπερευαισθησία καπνού) χρησιμοποιείται ευρέως για τη διαφοροποίηση των απομονώσεων. (Conzalez, A.J. , Rodicio, M.R. , Mendoza, M.C. , 2003)

Οι σημαντικότερες βακτηριολογικές ασθένειες που προκαλούνται από το βακτήριο *Pseudomonas viridiflava* είναι οι εξής:

Βακτηριακή κηλίδωση κολοκυνθοειδών. (αγγουριά, πεπονιά) όπου οι πρώτες κηλίδες εμφανίζονται στα κατώτερα φύλλα αναπτυγμένων φυτών νωρίς το χειμώνα και στη συνέχεια επεκτείνονται προς τα ανώτερα φύλλα. Οι προσβολές αρχίζουν από τις θέσεις του φύλλου που διατηρούνται βρεγμένες για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα, όπως η περιφέρεια και οι πτυχές του φύλλου. Για την αντιμετώπιση της ασθένειας συστήνονται :

- Περιορισμός της υγρασίας στα θερμοκήπια των φυτών και αποφυγή χρησιμοποίησης της υδρονέφωσης μόλις διαπιστωθούν οι πρώτες προσβολές.
- Καλός αερισμός του θερμοκηπίου.
- Εφαρμογή ψεκασμών καλύψεως με χαλκούχα σκευάσματα σε μικρές δόσεις.
- Κλάδεμα και κάψιμο των έντονα προσβεβλημένων κατώτερων φύλλων.

Βακτηριακή κηλίδωση των καρπών τομάτας. Η ασθένεια είναι διαδεδομένη κυρίως στις υπαίθριες καλλιέργειες τομάτας της Κρήτης, προκαλώντας συχνά τη σημαντική ποιοτική υποβάθμιση των καρπών. Αρχικά σε άωρους καρπούς παρατηρούνται υδαρείς ανοιχτού καστανού χρώματος κηλίδες. Το μέγεθος των κηλίδων αυξάνει καθώς οι καρποί μεγαλώνουν και ωριμάζουν. Το κέντρο των κηλίδων σταδιακά ξηραίνεται παίρνοντας διαδοχικά χρώμα γκρι, καστανό ή και

μαύρο ενώ περιβάλλεται από ένα στενό μαύρο περιθώριο. Τα συμπτώματα της ασθένειας είναι χαρακτηριστικά και διαφοροποιούνται εύκολα από εκείνα άλλων κηλιδώσεων των καρπών της τομάτας. Το παθογόνο έχει μεγάλο εύρος ξενιστών, επιβιώνει επιφυτικά σε πολλά καλλιεργούμενα φυτά και ζιζάνια και προκαλεί μολύνσεις τις βροχερές περιόδους, που συνοδεύονται από αέρα. Η αντιμετώπιση της ασθένειας θεωρείται δύσκολη και επιτυγχάνεται μόνο με προληπτικούς ψεκασμούς με χαλκούχα σκευάσματα κατά τις ευαίσθητες περιόδους.

Βακτηριακή σήψη τομάτας. Η ασθένεια αποτελεί σημαντικό πρόβλημα στις καλλιέργειες θερμοκηπίου. Σε πρώιμο στάδιο παρατηρείται περιφερειακό και μεσονεύριο κιτρίνισμα στα κατώτερα φύλλα που σταδιακά επεκτείνεται σε όλο το φύλλωμα του φυτού. Στο φλοιό συνήθως παρατηρούνται εκτενείς επιμήκεις κηλιδώσεις, που συνήθως ξεκινούν από θέσεις τομών και οι οποίες καταλήγουν σε έλκη με σταδιακή διάρρηξη και αποσύνθεση των προσβεβλημένων ιστών. Παρόμοιος μεταχρωματισμός και έλκη δημιουργούνται σε μίσχους και ποδίσκους. Τα αγγεία και η εντεριώνη του στελέχους εμφανίζουν έντονο κίτρινο-καστανό μεταχρωματισμό ο οποίος επεκτείνεται προς τους μίσχους, τους ποδίσκους και τις ρίζες του φυτού. Η εντεριώνη αρχικά εμφανίζεται υδαρής με έντονο πράσινο χρωματισμό και στη συνέχεια αποσυντίθεται, σήπεται και συρρικνώνεται αφήνοντας τη θέση της κενή. Σπανιότερα, παρατηρείται υγρή σήψη σε καρπούς που φέρονται σε προσβεβλημένα φυτά, μπορεί όμως να εκδηλωθεί κατά τη διάρκεια της διακίνησης και αποθήκευσης. Η μόλυνση ξεκινά από ένα ή περισσότερα σημεία και γρήγορα μετατρέπει το καρπό σε μια μαλακή υδαρή άμορφη μάζα. Η αρχική μόλυνση γίνεται από πληγές που προκαλούνται από τις τομές του κλαδέματος, από τις ρίζες και από το σπόρο. Τα παθογόνα επιβιώνουν επιφυτικά σε φυτά τομάτας αλλά και σε πολλούς άλλους ξενιστές και ζιζάνια, στο έδαφος, στις επιφάνειες του θερμοκηπίου και στο νερό. Για την αντιμετώπιση της ασθένειας συστήνονται :

- Εκρίζωση και κάψιμο των ασθενών φυτών μόλις εντοπιστούν.
- Προληπτικές επεμβάσεις με χαλκούχα μετά από κάθε καθαρισμό και κλάδεμα των φυτών.
- Βελτίωση του αερισμού του θερμοκηπίου.
- Ισορροπημένη λίπανση.

- Απολύμανση εργαλείων, με εμβάπτιση σε οινόπνευμα ή διάλυμα φορμόλης 5%.
- Αποφυγή των καρπών όταν είναι υγροί.

Κηλίδωση βρακτίων φύλλων αγκινάρας (*Cynara scolymus* L). Πρόκειται για μια νέα ασθένεια της αγκινάρας που σημειώθηκε στην Κρήτη. Η προσβολή εκδηλώθηκε σε ποσοστό 70% του συνόλου των κεφαλών της καλλιέργειας.

Τα συμπτώματα της προσβολής εντοπίζονται στις κεφαλές (άωρες ταξιανθίες) του φυτού. Η προσβολή εκδηλώνεται μόνο στα βράκτια φύλλα της ταξιανθίας, αρχικά με την εμφάνιση υδαρών κηλίδων με έντονο πράσινο χρωματισμό. Ανάλογα με το στάδιο ανάπτυξης της ταξιανθίας και των βρακτίων φύλλων (εσωτερικά ή εξωτερικά) αλλά και το στάδιο εξέλιξης της προσβολής οι παρατηρούμενες κηλίδες μπορεί να είναι βυθισμένες, λιγότερο ή περισσότερο επιμήκεις, με υδαρή ή νεκρωτική όψη, μεμονωμένες ή να συνενώνονται και να σχηματίζουν μεγαλύτερα τμήματα με νεκρωτική ή και υδαρή εμφάνιση. Το κέντρο των κηλίδων συνήθως αποκτά χρωματισμούς που κυμαίνονται από έντονο πράσινο μέχρι καστανό και μαύρο χρώμα. Συχνά η κηλίδα οριοθετείται από ένα λεπτό υδατώδες περιθώριο. Τέλος οι κηλίδες ή τα προσβεβλημένα νεκρωτικά τμήματα συνήθως περιβάλλονται από ένα ευρύ περιθώριο καστανοκόκκινου – ιώδους χρωματισμού. Η ασθένεια μείωσε δραστικά την εμπορευσιμότητα των κεφαλών. (Γκούμας, 2006).

1.3 Βακτηριακή κηλίδωση του συγκόνιου

Την άνοιξη του 2007 σε φυτά συγκόνιου που αναπτύσσονται στο θερμοκήπιο του Τεχνολογικού Εκπαιδευτικού Ιδρύματος Κρήτης στο Ηράκλειο, παρατηρήθηκε έντονη **κηλίδωση των φύλλων** που σταδιακά προκάλούσε την καταστροφή του φυλλώματος των φυτών. Τα συμπτώματα της ασθένειας ήταν διαφορετικά από εκείνα που προκαλούνται από το βακτήριο του γένους *Xanthomonas* που έχει βρεθεί να προσβάλλει το *Syngonium*. (Γκούμας & Χαντζάκη, 2000).

Η εκδήλωση της ασθένειας αρχίζει με την εμφάνιση υδαρών κηλίδων, που συνήθως οριοθετούνται από τις δευτερεύουσες νευρώσεις του ελάσματος του φύλλου. Σταδιακά

οι κηλίδες νεκρώνονται και αποκτούν χρώμα καστανό μέχρι σκούρο μαύρο. Συχνά η έναρξη της προσβολής γίνεται από την περιφέρεια του φύλλου και σταδιακά επεκτείνεται προς το εσωτερικό του ελάσματος. Τέλος η συνένωση των κηλίδων οδηγεί συνήθως στη νέκρωση μεγάλου τμήματος του ελάσματος του φύλλου. Σε συνθήκες υψηλής υγρασίας και σκίασης παρατηρείται γρήγορη καταστροφή του φυλλώματος και μείωση της ανάπτυξης του φυτού. Τα προσβεβλημένα φυτά σπάνια καταστρέφονται, όμως η αισθητική τους υποβάθμιση είναι σημαντική.

2.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Απομόνωση του παθογόνου

Για την απομόνωση των στελεχών του βακτηρίου, πάρθηκαν δείγματα φύλλων μολυσμένων φυτών συγκόνιου από το αγρόκτημα του Τ.Ε.Ι Κρήτης στο Ηράκλειο, τα οποία ξεπλύθηκαν αρχικά με νερό βρύσης για την απομάκρυνση ξένων υλών και στη συνέχεια με απεσταγμένο και αποστειρωμένο νερό. Κατόπιν επιλέχθηκαν τμήματα από την περιφέρεια των κηλίδων τα οποία μετά την κοπή τους τοποθετήθηκαν σε τριβλίο που περιείχε περίπου 2ml αποστειρωμένο νερό, όπου και τεμαχίστηκαν σε πολύ μικρά τεμάχια.

Ποσότητα 20 μl από το αιώρημα που δημιουργήθηκε, απλώθηκε σε τριβλία που περιείχαν θρεπτικό υπόστρωμα King's B με τη μέθοδο της διασποράς και επώαστηκε στους 27°C για 2-4 ημέρες. Οι επικρατέστερες αποικίες που παρατηρήθηκαν κατά τις απομονώσεις υποκαλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα King's B μέχρι να δημιουργηθεί καθαρή καλλιέργεια. Οι απομονώσεις που επιλέχθηκαν διατηρήθηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα Gelose profonde στους 4 °C σε όλη τη διάρκεια της εργασίας.

Από τις απομονώσεις που έγιναν σε θρεπτικό υπόστρωμα King's B 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 συγκόνιου 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 συγκόνιου			
<i>Pseudomonas viridiflava</i>	13-1A1	Συγκόνιο	Αγρόκτημα Τ.Ε.Ι
	13-1A2	Συγκόνιο	Αγρόκτημα Τ.Ε.Ι
	13-1A3	Συγκόνιο	Αγρόκτημα Τ.Ε.Ι
	13-1B1	Συγκόνιο	Αγρόκτημα Τ.Ε.Ι
	13-1B2	Συγκόνιο	Αγρόκτημα Τ.Ε.Ι
	13-1B3	Συγκόνιο	Αγρόκτημα Τ.Ε.Ι
Στελέχη αναφοράς			
<i>Pseudomonas viridiflava</i>	518	Τομάτα	Άρβη Ηρακλείου
	561	Βλήτο	Κουντούρα Χανιά
	565	Μελιτζάνα	Πετροκεφάλι
	566	Μελιτζάνα	Πετροκεφάλι
	5076	Τομάτα	Ιεράπετρα
	1	Άκανθος	Ηράκλειο
	4	Άκανθος	Ηράκλειο
	6	Άκανθος	Ηράκλειο
	8	Άκανθος	Ηράκλειο

	7-1	Αγκινάρα	Καλέσσα Ηρακλ.
	7-2	Αγκινάρα	Καλέσσα Ηρακλ.
	7-3	Αγκινάρα	Καλέσσα Ηρακλ.
	7-4	Αγκινάρα	Καλέσσα Ηρακλ.
	7-5	Αγκινάρα	Καλέσσα Ηρακλ.
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	1	Τομάτα	Τυμπάκι Ηρακλ.
	2	Τομάτα	Τυμπάκι Ηρακλ.
	3	Τομάτα	Τυμπάκι Ηρακλ.
<i>Pseudomonas</i> subsp. <i>savastanoi</i>	1	Ελιά	Ηράκλειο
	4	Ελιά	Ηράκλειο
	5	Ελιά	Ηράκλειο

2.2 Δοκιμές παθογένειας

Η παθογένεια των απομονωθέντων βακτηρίων εξετάστηκε αρχικά με την πραγματοποίηση τεχνητών μολύνσεων στο παρέγχυμα των φύλλων, υγιών φυτών συγκόνιου που είχαν αγοραστεί από φυτώριο. Οι μολύνσεις έγιναν στα φύλλα των φυτών με την μέθοδο της έγχυσης βακτηριακού αιωρήματος με τη 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 κυμαίνονταν από 10^3 - 10^7 cfu/ml περίπου. Τα φυτά καλύφθηκαν με σακούλες πολυαιθυλαινίου για την διατήρηση της σχετικής υγρασίας σε επίπεδο κορεσμού και στη συνέχεια παρέμειναν για 2 ημέρες στο θερμοκήπιο σε συνθήκες υγρασίας (70-80%) και θερμοκρασίας 15 - $26^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$. Παρατηρήσεις λαμβάνονταν τουλάχιστον για 15 ημέρες.

Επιπλέον, μολύνσεις πραγματοποιήθηκαν σε λοβούς φασολιάς με εναποθέτηση βακτηριακής καλλιέργειας στο φλοιό των καρπών με την χρήση αποστειρωμένης

οδοντογλυφίδας. Οι μολύνσεις έγιναν με παραλαβή καλλιέργειας των απομονωθέντων βακτηρίων σε θρεπτικό υπόστρωμα King's B, με το άκρο της οδοντογλυφίδας και βύθιση αυτού σε βάθος 2mm από την επιφάνεια των λοβών. Στη συνέχεια οι λοβοί τοποθετήθηκαν σε πλαστικά δοχεία, κατά τέτοιο τρόπο ώστε να μην εφάπτονται, και στα οποία είχε προηγουμένως προστεθεί νερό για τη διατήρηση υψηλής σχετικής υγρασίας. Τα δοχεία στη συνέχεια τοποθετήθηκαν σε θάλαμο ανάπτυξης φυτών σε συνθήκες υγρασίας και θερμοκρασίας ίδιες με αυτές που έχουν αναφερθεί και στις προηγούμενες μολύνσεις, όπου και παρέμειναν για 10 μέρες.

Τέλος, έλεγχος της παθογένειας των απομονωθέντων βακτηρίων έγινε και σε σπορόφυτα τομάτας ηλικίας ενός μήνα με εναπόθεση βακτηριακού αιωρήματος στο βλαστό των φυτών με τη χρήση αποστειρωμένης οδοντογλυφίδας. Οι μολύνσεις έγιναν με λήψη της καλλιέργειας των βακτηρίων από θρεπτικό υπόστρωμα King's B, με το άκρο της οδοντογλυφίδας και βύθιση αυτού στο στέλεχος του φυτού. Τα σημεία στα οποία έγινε η μόλυνση καλύφθηκαν με ειδική ταινία (παραφίλμ) και στη συνέχεια τα φυτά παρέμειναν στο θερμοκήπιο σε συνθήκες υγρασίας 60-70% και θερμοκρασίας $15-26^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$, ως την τελική μέτρηση, δηλαδή περίπου 10 ημέρες.

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. Με παρόμοιο τρόπο πραγματοποιήθηκαν τεχνητές μολύνσεις με τα στελέχη αναφοράς του *Pseudomonas viridiflava*.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Περιγραφή των συμπτωμάτων της ασθένειας

Το Μάρτιο του 2007 σε φυτά συγκόνιου (*Syngonium podophyllum*) στο αγρόκτημα του Τ.Ε.Ι Κρήτης στο Ηράκλειο, παρατηρήθηκε μια ασθένεια σε φυτά που αναπτύσσονταν σε γλάστρες στο θερμοκήπιο. Τα προσβεβλημένα φυτά παρουσίαζαν τα εξής συμπτώματα. Οι προσβολές περιορίζονταν στη φυλλική επιφάνεια των φυτών. Αρχικά παρατηρούνται υδαρείς κηλίδες, οι οποίες συνήθως οριοθετούνται από τις δευτερεύουσες νευρώσεις του ελάσματος του φύλλου. Σταδιακά, οι κηλίδες

νεκρώνονται και αποκτούν χρώμα σκούρο καστανό μέχρι μαύρο και έχουν πατυρώδη εμφάνιση. Συνήθως, η έναρξη της προσβολής γίνεται από την περιφέρεια του φύλλου και σταδιακά επεκτείνεται προς το εσωτερικό του ελάσματος. Συχνά, η συνένωση των κηλίδων οδηγεί στη νέκρωση μεγάλου τμήματος του ελάσματος του φύλλου (Εικόνα 1 – 6). Η ασθένεια φαίνεται ότι ευνοείται από συνθήκες υψηλής υγρασίας και σκίασης, αφού κάτω από αυτές τις συνθήκες παρατηρήθηκε η έντονη και γρήγορη εξάπλωση των κηλίδων, η καταστροφή του φυλλώματος και η μείωση της ανάπτυξης του φυτού. Τα προσβεβλημένα φυτά σπάνια καταστρέφονται ολοσχερώς, όμως η αισθητική τους υποβάθμιση είναι σημαντική.

3.2 Απομόνωση και ταυτοποίηση του παθογόνου

Κατά τη διάρκεια της μελέτης στο εργαστήριο Φυτοπαθολογίας και Βακτηριολογίας του Τ.Ε.Ι Κρήτης, πραγματοποιήθηκε μεγάλος αριθμός απομονώσεων από προσβεβλημένα φυτά συγκόνιου που παρουσίαζαν τα συμπτώματα της βακτηριολογικής κηλίδωσης. Οι πρώτες απομονώσεις έγιναν από τα φυτά στα οποία επισημάνθηκε η ασθένεια, στο αγρόκτημα του Τ.Ε.Ι Ηρακλείου. Ακολούθησαν απομονώσεις από μολυσμένα φυτά που συλλέχθηκαν από διάφορα φυτώρια της πόλης (Εικόνα 7). Σε απομονώσεις που έγιναν σε θρεπτικό υπόστρωμα King's B, οι αποικίες των βακτηρίων 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 υδατικό διάλυμα 3% KOH και αερόβιες δηλαδή εμφάνισαν οξειδωτικό μεταβολισμό της D-γλυκόζης στο υλικό Hugh et Leifson. Σε θρεπτικό υλικό NA-Sucrose 5%, όπου εξετάζεται η παραγωγή Levan, οι αποικίες των βακτηρίων, εμφάνιζαν σχήμα κυκλικό με ομαλά περιθώρια διαμέτρου 4-5mm, υπερυψωμένες, γυαλιστερές, βλεννώδους υφής αλλά είχαν χρώμα κιτρινωπό δηλαδή δεν εμφάνισαν το χαρακτηριστικό φαινότυπο των αποικιών των βακτηρίων που έχουν την ικανότητα να παράγουν 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 εμφάνισαν τον φαινότυπο: [- - + - +] δηλαδή παραγωγή Levan (-), παραγωγή οξειδάσης (-), πηκτινόλυση των κονδύλων της πατάτας (+), αναερόβια διάσπαση της αργινίνης (-), αντίδραση

υπερευαισθησίας (+). Στην ομάδα αυτή ανήκει μόνο το είδος *Pseudomonas viridiflava* ως μέλη του οποίου ταυτοποιούνται οι απομονωθείσες αποικίες από το *Syngonium*.

Στον πίνακα 2, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της αναλυτικής φαινοτυπικής ταυτοποίησης σε σύγκριση με ταυτοποιημένα στελέχη συγγενικών παθογόνων (Εικόνα 8 - 9). Παρατηρούμε ότι οι απομονώσεις του συγκόνιου εμφανίζουν όμοιο φαινοτυπικό προφίλ με τα ταυτοποιημένα στελέχη του *P.viridiflava* από διάφορους ξενιστές του παθογόνου. Τα άλλα στελέχη αναφοράς που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια του πειράματος εμφάνισαν τον φαινότυπο της ομάδας όπου ανήκουν. Με βάση όλες τις παραπάνω δοκιμές όλα τα στελέχη που απομονώθηκαν και μελετήθηκαν στην παρούσα μελέτη ταυτοποιούνται ως μέλη του είδους *P. viridiflava*.

3.3 Δοκιμές παθογένειας

3.3.1 Αντίδραση υπερευαισθησίας στον καπνό και σήψη κονδύλων πατάτας

Όλα τα απομονωθέντα στελέχη εξετάστηκαν ως προς την αντίδραση υπερευαισθησίας και όλα εμφάνισαν φαινότυπο HR +, επίσης όλα προκάλεσαν τη σήψη των κονδύλων της πατάτας σε διάστημα 24-48 h (Εικόνα 10 - 11).

3.3.2 Τεχνητές μολύνσεις σε φυτά συγκόνιου

Οι έξι απομονώσεις από το συγκόνιο (13-1A1,13-1A2,13-1A3,13-1B1,13-1B2,13-1B3) που επιλέχθηκαν για τις τεχνικές μολύνσεις προκάλεσαν την εκδήλωση των παρακάτω συμπτωμάτων σε διάστημα 10 ημερών: Αρχικά παρατηρήθηκαν υδαρείς κηλίδες οι οποίες οριοθετούνταν από τις δευτερεύουσες νευρώσεις του ελάσματος του φύλλου. Σταδιακά οι κηλίδες νεκρώθηκαν και απόκτησαν σκούρο καστανό χρώμα μέχρι μαύρο. Στη συνέχεια η συνένωση των κηλίδων οδήγησε στη νέκρωση μεγάλου τμήματος του ελάσματος του φύλλου. Κατά γενικό κανόνα οι κηλίδες ήταν παρόμοιες με εκείνες που παρατηρήθηκαν κατά τις φυσικές μολύνσεις στο φυτό (Εικόνα 13 - 15). Σε τεχνητές μολύνσεις φυτών συγκόνιου με στελέχη του *Pseudomonas viridiflava* από άλλους γνωστούς ξενιστές (τομάτα, αγκινάρα, μελιτζάνα, ακάνθου και βλήτου) τα συμπτώματα που αναπτύχθηκαν δεν διαφοροποιούνται από εκείνα των στελεχών του βακτηρίου από το συγκόνιο.

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

ΔΟΚΙΜΕΣ	Απομονώσεις από Συγκόνιο	<i>Pseudomonas</i>		
			<i>savastanoi</i> subsp.	<i>syringae</i>
		<i>viridiflava</i>	<i>savastanoi</i>	<i>tomato</i>
Κωδικός Στελέχους	13-1A1, 13-1A2, 13-1A3, 13-1B1, 13-1B2, 13-1B3	518, 561, 565, 566, 5076, 1, 4, 6, 8, 7-1, 7-2, 7-3, 7-4, 7-5	Ps.sav1, Ps.sav4, Ps.sav5	Pst1, Pst2, Pst3
Αριθμός στελεχών	6	14	3	3
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	+	+	+	+

**ΣΥΓΚΟΝΙΟ (SYNGONIUM PODOPHYLLUM):ΕΝΑΣ ΝΕΟΣ ΞΕΝΙΣΤΗΣ ΤΟΥ
PSEUDOMONAS VIRIDIFLAVA ΣΤΗΝ ΕΛΛΑΔΑ**

Βενζοϊκό οξύ	-	-	-	-
Κελλοβιόζη	-	-	-	-
D-σορβιτόλη	-	-	+	+
D(+) -τρεαλόζη	-	-	-	-
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	+	+	+	-
Ανθρανιλλικό οξύ	-	-	-	-
DL-ομοσερίνη	-	-	-	-
DL-γαλακτικό οξύ	+	+	+	-
Βεταΐνη	+	+	+	+
D(+) ξυλόζη	-	-	+	+
D(+) μανόζη	-	+	+	+
Μηλονικό νάτριο	+	+	+	+

3.3.3 Τεχνητές μολύνσεις σε φυτά τομάτας

Σπορόφυτα τομάτας ηλικίας ενός μήνα μολύνθηκαν τεχνητά με εναπόθεση βακτηριακής καλλιέργειας στο βλαστό των φυτών με τη χρήση αποστειρωμένης οδοντογλυφίδας. Οι μολύνσεις έγιναν με τη λήψη της καλλιέργειας των βακτηρίων από το θρεπτικό υπόστρωμα King's B με το άκρο της οδοντογλυφίδας και τη βύθιση αυτού στο στέλεχος του φυτού. Χρησιμοποιήθηκαν 6 στελέχη (13-1A1,13-1A2,13-1A3,13-1B1,13-1B2,13-1B3) τα οποία προέρχονταν από τις αρχικές απομονώσεις από τα φυτά του συγκόνιου. Από τις παρατηρήσεις που πάρθηκαν σε διάστημα 10 ημερών , τα φυτά εκδήλωσαν τα παρακάτω συμπτώματα : σήψη στο στέλεχος, νέκρωση της εντεριώνη, μεταχρωματισμό των αγγείων και μάρανση (Εικόνα 16 - 18). Από τα στελέχη αναφοράς παρόμοια συμπτώματα έδωσαν όλα τα στελέχη του *P. viridiflava* από τους διαφορετικούς ξενιστές, ενώ τα υπόλοιπα στελέχη αναφοράς που ανήκουν στο *P. syringae* pv. *tomato* (1,2,3) και τα στελέχη που ανήκουν στην ομάδα στο *Pseudomonas* subsp. *savastanoi*. (1,4,5) δεν μολύναν τα φυτά αφού δεν προκάλεσαν κανένα σύμπτωμα.

3.3.4 Τεχνητές μολύνσεις σε λοβούς φασολιάς

Οι μολύνσεις πραγματοποιήθηκαν στους λοβούς φασολιάς με εναποθέτηση βακτηριακής καλλιέργειας στο φλοιό των λοβών με τη χρήση αποστειρωμένης οδοντογλυφίδας. Οι μολύνσεις έγιναν με παραλαβή καλλιέργειας των απομονωθέντων βακτηρίων σε θρεπτικό υπόστρωμα King's B, με το άκρο της οδοντογλυφίδας και βύθιση αυτού σε βάθος 2mm από την επιφάνεια των λοβών. Οι λοβοί με τεχνητές μολύνσεις με τις απομονώσεις από το συγκόνιο, όπως και τα στελέχη αναφοράς του *P. viridiflava* αναπαρήγαγαν, σε διάστημα 72 h, τις χαρακτηριστικές ερυθροπορτοκαλόχρες κηλίδες που αναπτύσσουν τα βακτήρια του είδους, όταν μολύνουν τους λοβούς της φασολιάς (Εικόνα 12). Τέλος τα στελέχη του *P. syringae* pv. *tomato* (1,2,3) και τα στελέχη του *Pseudomonas savastanoi* subsp. *savastanoi* (1,4,5) δεν μολύναν τους λοβούς, αφού όπως και ο μάρτυρας (μόλυνση με νερό) δεν εμφάνισαν κανένα σύμπτωμα.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Από τα αποτελέσματα της εργασίας αυτής, προκύπτει ότι τα συμπτώματα της βακτηριακής κηλίδωσης του συγκόνιου, προκαλούνται από το βακτήριο *Pseudomonas viridiflava*. Το βακτήριο αυτό αποτελεί γνωστό ευκαιριακό παθογόνο διαφόρων καλλιεργούμενων λαχανοκομικών και καλλωπιστικών φυτών (Goumas, 1998, 1999, Γκούμας, *et al.*, 2006, Λαλλά, 2003) και το οποίο απομονώνεται πολύ συχνά από διάφορα ασθενή φυτά. Το μορφολογικό, φυσιολογικό και βιοχημικό φαινοτυπικό προφίλ που παρουσίασαν οι απομονώσεις από το συγκόνιο, δεν φαίνεται ότι διαφοροποιείται ουσιαστικά από εκείνο των αντίστοιχων ταυτοποιημένων στελεχών του βακτηρίου *Pseudomonas viridiflava* που χρησιμοποιήθηκε συγκριτικά στην παρούσα μελέτη. Το βακτήριο *Pseudomonas viridiflava* απομονώνεται συχνά μόνο του ή σε συνδυασμό με άλλα παθογόνα βακτήρια από διάφορες ασθένειες καλλιεργούμενων φυτών στην Κρήτη.(Γκούμας, προσωπική επικοινωνία). 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 συγκόνιου από την οποία απομονώθηκε.

Όπως προκύπτει από την ανασκόπηση της βιβλιογραφίας, για την αντιμετώπιση της ασθένειας συνιστώνται τα ακόλουθα μέτρα: 1) Να χρησιμοποιείται υγιές πολλαπλασιαστικό υλικό. 2) Τα ασθενή φυτά να καταστρέφονται και να μη χρησιμοποιούνται για τη λήψη πολλαπλασιαστικού υλικού. 3) Να αποφεύγεται η συνεχής διύγρανση του φυλλώματος. 4) Να αποφεύγεται η εφαρμογή υψηλών δόσεων λίπανσης, ιδιαίτερα σε άζωτο. 5) Για την προστασία του φυλλώματος, εφόσον κρίνεται αναγκαίο, συνιστώνται προστατευτικοί ψεκασμοί με χαλκούχα σκευάσματα.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

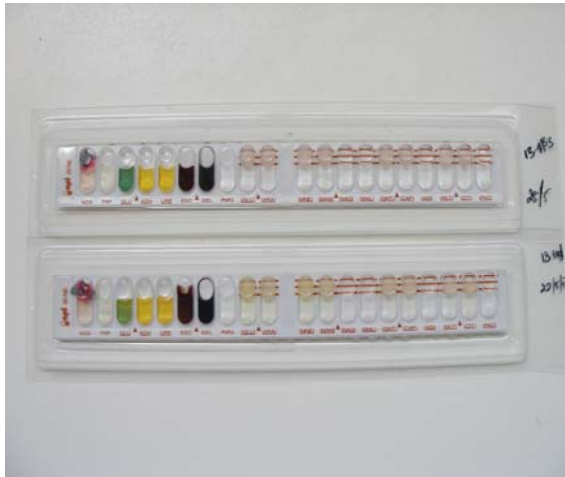
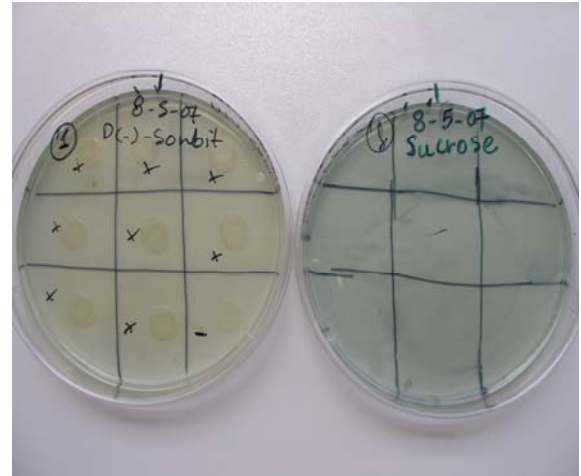
1. Alippi A.M and Wolcan S, 1999. First Report of Bacterial Leaf Spot of Basil Caused by *Pseudomonas viridiflava* in Argentina. *Plant Disease* 83,876.
2. Conzalez, A.J., Rodicio, M.R., Mendoza, M.C., 2003. Identification of an Emergent and Atypical *Pseudomonas viridiflava* Lineage Causing Bacteriosis in Plants of Agronomic Importance in a Spanish Region. *Applied and Environmental Microbiology*, 2936-2941.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. Γκούμας, Δ.Ε., Γκατζιλάκης, Χ.Ξ., Ναβρούζογλου, Κ.Η., 2006. Άκανθος (*Acanthus mollis*): Ένας νέος ξενιστής του *Pseudomonas viridiflava*. 13^ο Πανελλήνιο Φυτοπαθολογικό Συνέδριο, Αθήνα 17/10/06. Περιλήψεις Ανακοινώσεων σελ 112.
7. Γκούμας, Δ.Ε., Γκατζιλάκης, Χ.Ξ., Γκούμα, Σ. 2006. Παθογόνο αίτιο μιας νέας βακτηρίωσης της αγκινάρας. 13^ο Πανελλήνιο Φυτοπαθολογικό Συνέδριο, Αθήνα 17/10/06. Περιλήψεις Ανακοινώσεων σελ.76.
8. ΓΚΟΥΜΑΣ Δ.Ε & ΧΑΤΖΑΚΗ Α.Κ., 2000. Επισήμανση βακτηριολογικών ασθενειών στην Κρήτη. Περιλήψεις Ανακοινώσεων, 10^ο Πανελλήνιο Φυτοπαθολογικό Συνέδριο, 3-5 Οκτωβρίου 2000, Καλαμάτα, σελ.36.
9. Γκούμας, Δ.Ε. 2006. Επιλεγμένα Θέματα Ειδικής Φυτοβακτηριολογίας. Έκδοση: ΤΕΙ Κρήτης, Ηράκλειο 2006, σελ.85
10. Λαλλά Π. 2003. Μελέτη μιας νέας ασθένειας του σέλινου. Πτυχιακή Μελέτη, ΤΕΙ Κρήτης, ΣΤΕΓ (Σχολή Τεχνολογίας Γεωπονίας) Τμήμα Φυτικής Παραγωγής σελ.21.

6. ΦΩΤΟΓΡΑΦΙΚΟ ΥΛΙΚΟ



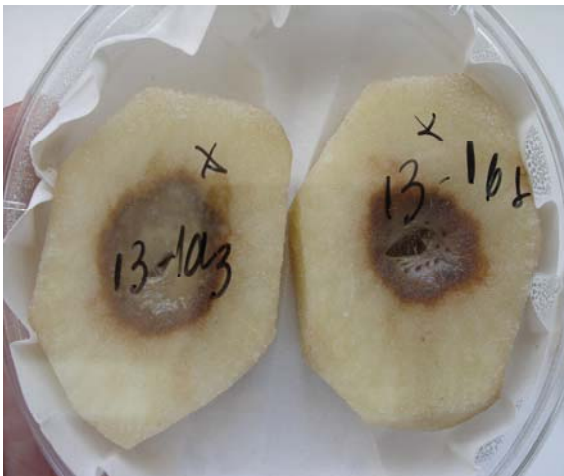
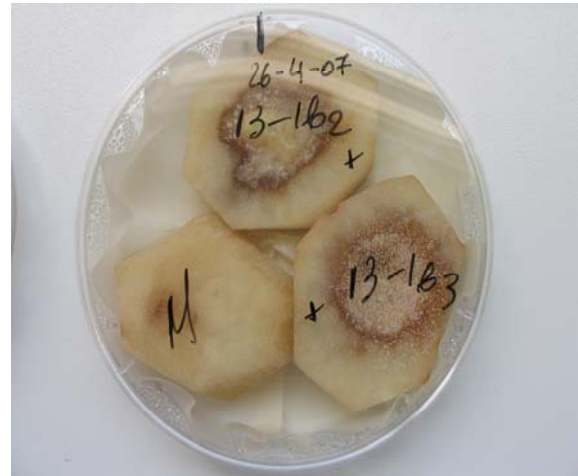
Εικόνα 1 - 6. Τυπικά συμπτώματα της ασθένειας. Υδαρείς, νεκρωτικές, παπυρώδεις κηλίδες – νεκρώσεις.

**ΣΥΓΚΟΝΙΟ (*SYNGONIUM PODOPHYLLUM*):ΕΝΑΣ ΝΕΟΣ ΞΕΝΙΣΤΗΣ ΤΟΥ
PSEUDOMONAS VIRIDIFLAVA ΣΤΗΝ ΕΛΛΑΔΑ**



**Εικόνα 7. Αποικίες του *Pseudomonas viridiflava* σε NAG.
Εικόνα 8 - 9. Βιοχημικές δοκιμές & δοκιμές αρί.**

**Εικόνα 10 – 12. Δοκιμές παθογένειας.
Τεχνητές μολύνσεις σε κονδύλους πατάτας & σε λοβούς φασολιάς.**





Εικόνα 13 – 15. Δοκιμές παθογένειας. Τεχνητές μολύνσεις σε φυτά συγκόνιου



Εικόνα 16 – 18. Δοκιμές παθογένειας. Τεχνητές μολύνσεις σε φυτά τομάτας