

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ
ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ
ΚΡΗΤΗΣ

Τμήμα Βιολογικών, Θερμοκηπιακών
Καλλιεργειών και Ανθοκομίας



TECHNOLOGICAL
EDUCATIONAL
INSTITUTE *of* CRETE

Department of Organic Greenhouse
Crops & Floriculture

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

«ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΟΡΓΑΝΙΚΩΝ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΒΑΚΙΛΩΝ ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΟΥ
CLAVIBACTER MICHIGANENSIS SPP. *MICHIGANENSIS* ΣΕ ΦΥΤΑ ΤΟΜΑΤΑΣ»

ΚΑΡΠΑΘΙΩΤΑΚΗ ΜΑΡΙΑ-ΕΛΕΝΗ

ΕΙΣΗΓΗΤΗΣ : ΔΡ. ΓΚΟΥΜΑΣ ΔΗΜΗΤΡΗΣ

ΙΑΝΟΥΑΡΙΟΣ 2014

Αφιερωμένη στην μητέρα μου

**ΤΟ ΕΡΓΟ ΑΥΤΟ ΥΛΟΠΟΙΗΘΗΚΕ ΣΤΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ – ΒΑΚΤΗΡΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ, ΘΕΡΜΟΚΗΠΙΑΚΩΝ ΚΑΙ ΑΝΘΟΚΟΜΙΚΩΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ ΤΗΣ
ΣΧΟΛΗΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΤΟΥ ΤΕΙ ΚΡΗΤΗΣ**

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διατριβή ξεκίνησε και ολοκληρώθηκε στο εργαστήριο Φυτοπαθολογίας - Βακτηριολογίας του τμήματος Βιολογικών, Θερμοκηπιακών και Ανθοκομικών Καλλιεργειών, της Σχολής Γεωπονίας, του ΤΕΙ Κρήτης με την επιστημονική υποστήριξη του εργαστηρίου Φυτοπαθολογίας – Βακτηριολογίας. Αυτή τη στιγμή που το έργο έχει ολοκληρωθεί, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή Δρ. Γκούμα Δημήτρη για την ευκαιρία που μου έδωσε να εργαστώ στο εργαστήριό του και να προσπαθήσω να φέρω σε πέρας ένα, όπως αποδείχθηκε, δύσκολο έργο.

Επιπρόσθετα, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κυρία Κασελάκη Άννα για την βοήθεια και τον χρόνο που αφιέρωσε να με βοηθήσει. Τέλος, αναμφίβολα πολλά ευχαριστώ αξίζουν οι Μαρκάκης Μανώλης, Γκατζηλάκης Χρήστος και στον Γούτο Δημήτρη που με στήριξαν με τον δικό τους τρόπο.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ	5
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	6
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	7
<u>1^ο ΚΕΦΑΛΑΙΟ</u>	9
<u>ΕΙΣΑΓΩΓΗ</u>	9
1.1 Η ΑΣΘΕΝΕΙΑ.....	10
1.2 ΠΑΘΟΓΟΝΟ ΑΙΤΙΟ	10
1.3 ΕΙΣΟΔΟΣ ΠΑΘΟΓΟΝΟΥ.....	12
1.4 ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΗΜΕΙΑ ΤΗΣ ΑΣΘΕΝΕΙΑΣ	12
1.4.1 ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΑ ΔΙΑΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΗΣ ΠΡΟΣΒΟΛΗΣ	13
1.4.2 ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΑ ΤΟΠΙΚΩΝ ΔΕΥΤΕΡΟΓΕΝΩΝ ΠΑΡΕΓΧΥΜΑΤΙΚΩΝ ΠΡΟΣΒΟΛΩΝ.....	16
1.5 ΕΠΙΒΙΩΣΗ ΚΑΙ ΜΕΤΑΔΟΣΗ ΤΟΥ ΠΑΘΟΓΟΝΟΥ	16
1.6 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΟΥ CMM	20
1.7 ΚΑΤΑΠΟΛΕΜΗΣΗ	20
<u>1.7.1 ΧΗΜΙΚΗ ΚΑΤΑΠΟΛΕΜΗΣΗ</u>	20
<u>1.7.2 ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΚΑΤΑΠΟΛΕΜΗΣΗ</u>	21
<u>1.7.3 Η ΧΡΗΣΗ ΤΩΝ ΚΟΜΠΟΣΤ ΣΤΗ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΚΑΤΑΠΟΛΕΜΗΣΗ</u>	22
1.7 ΑΝΘΕΚΤΙΚΑ ΥΒΡΙΔΙΑ	23
1.8 ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΗΣΗ.....	24
1.9 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	24
<u>2^ο ΚΕΦΑΛΑΙΟ</u>	25
<u>ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</u>	25
2.1 ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ	26
2.2 ΈΛΕΓΧΟΣ ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑΣ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΤΟΥ CMM.....	27
2.3 ΚΟΜΠΟΣΤ	27
2.4 ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΒΑΚΙΛΩΝ.....	28
2.5 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΣΧΕΔΙΟ	28
2.6 ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΑΣΘΕΝΕΙΑΣ ΣΤΟ ΘΕΡΜΟΚΗΠΙΟ	31
2.7 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ	32
<u>3^ο ΚΕΦΑΛΑΙΟ</u>	35
<u>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ</u>	35
3.1 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΕΠΕΜΒΑΣΕΩΝ	36
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	41

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το βακτηριακό έλκος, μια πολύ σοβαρή αδροβακτηρίωση, αποτελεί μια από τις σημαντικότερες ασθένειες της τομάτας. Εκτός από την τομάτα προσβάλλει υπό φυσικές συνθήκες και άλλα είδη της οικογένειας Solanaceae. Η παρούσα μελέτη έγινε στα πλαίσια μιας σειράς πειραμάτων όπου μελετήθηκε η αποτελεσματικότητα διάφορων κόμποστ στη παρεμπόδιση μυκητολογικών και βακτηριολογικών ασθενειών καλλιεργειών των σολανωδών και κολοκυνθοειδών, που προκαλούν μερικά από τα σημαντικότερα και δυσκολότερα στη καταπολέμηση, παθογόνα εδάφους. Η αντιμετώπιση των ασθενειών αυτών βασίζεται στην χρησιμοποίηση προληπτικών μέτρων. Το βασικότερο είναι η χρήση υγιούς πολλαπλασιαστικού υλικού. Στην παρούσα μελέτη σκοπός ήταν να εξεταστεί η δυνατότητα αντιμετώπισης ή ελαχιστοποίησης της εμφάνισης του βακτηρίου με την χρήση διαφόρων εκχυλισμάτων τύπων κομποστας και της εφαρμογής βιολογικών ανταγωνιστών του παθογόνου (βακίλων). Η μελέτη προσέφερε περιορισμένα αποτελέσματα, έδειξε όμως ξεκάθαρα ότι η εφαρμογή κόμποστ και βακίλων για τον περιορισμό των διασυστηματικών προσβολών του εδαφογενούς *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* είναι μια δυνατή μέθοδος καταπολέμησης που θα μπορούσε να συνδυαστεί και με άλλα, κυρίως προστατευτικά μέτρα κατά του βακτηριακού έλκους της τομάτας. Μας έδειξε επίσης ότι οι συνθήκες καλλιέργειας είναι σημαντικές τόσο στην εξάπλωση του παθογόνου όσο και στην λειτουργία των μεθόδων αντιμετώπισης του.

1ο ΚΕΦΑΛΑΙΟ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Η Ασθένεια

Το βακτηριακό έλκος, μια πολύ σοβαρή αδροβακτηρίωση, αποτελεί μια από τις σημαντικότερες ασθένειες της τομάτας, τόσο στις υπαίθριες όσο και στις υπό κάλυψη καλλιέργειες σε πολλές χώρες συμπεριλαμβανομένης και της χώρας μας. Οι ζημιές από την ασθένεια μπορεί να φτάσουν το 80% της παραγωγής (Παναγόπουλος, 2000). Πρόσφατα στην Κρήτη σημειώθηκαν σημαντικές προσβολές (Μπαγκής, Γκούμας Δ., 2012)

Η ασθένεια ευνοείται από περιβαλλοντικές συνθήκες που προάγουν την ανάπτυξη πλούσιων σε χυμό φυτών. Συγκεκριμένα, θερμοκρασία μεταξύ 24-32°C μετά από μια αρχική περίοδο με θερμοκρασία εδάφους/ατμόσφαιρας αρκετούς βαθμούς πάνω ή κάτω των 24°C, ιδανική σχετική υγρασία για την ανάπτυξη των φυτών, υψηλή συγκέντρωση θρεπτικών ουσιών και pH 8 είναι οι ιδανικές συνθήκες για την ανάπτυξη της ασθένειας (Murtaza, 2009).

Η συγκέντρωση του αρχικού μολύσματος αλλά και οι δευτερογενείς μολύνσεις μαζί με τους περιβαλλοντικούς παράγοντες και τις κατά τόπους καλλιεργητικές πρακτικές εξηγούν το φαινόμενο των απρόβλεπτων επιδημιών του βακτηρίου (de Leon et al., 2011).

1.2 Παθογόνο Αίτιο

Η ασθένεια οφείλεται στο βακτήριο *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm), έχει ως προγενέστερες συνώνυμες ονομασίες: *Corynebacterium michiganense* pv. *michiganense* Jensen και *Corynebacterium michiganense* pv. *michiganense*. Ταξινομικά ανήκει στην οικογένεια *Microbacteriaceae* (Σχήμα 1.1) (Stackebrandt et al., 1997). Το βακτήριο μορφολογικά όταν βρίσκεται στα κύτταρα του ξενιστή, έχει κατά κανόνα σχήμα κορύνης (προηγούμενη ονομασία *Corynebacterium*). Είναι θετικό κατά Gram, με βακτηριακά κύτταρα στην καλλιέργεια να διατάσσονται σε χαρακτηριστικά σχήματα V και Y, δεν έχει αυτόνομη κίνηση, είναι βραδείας ανάπτυξης ενώ έχει άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης 26°C με ελάχιστη τους 11°C και μέγιστη τους 35°. Σχηματίζει αποικίες άσπρου, κίτρινου και ροζ χρώματος, από τις οποίες μόνο οι άσπρες και οι κίτρινες είναι παθογόνες. (Murtaza, 2009) (Εικόνα 1).

Σχήμα 1.1: Συστηματική ταξινόμηση του παθογόνου *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*.

Kingdom:	Monera
Division:	Actinobacteria
Class:	High GH Gram+
Subclass:	Actinobacteridae
Order:	Actinomycetales
Suborder:	Micrococccineae
Family:	<i>Microbacteriaceae</i>
Genus:	<i>Clavibacter</i>
Species:	<i>Clavibacter michiganensis</i>
Subspecies:	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>

Το βακτήριο παράγει οξύ από τη mannose, χρησιμοποιεί τα acetate, citratate, fumarate, malate και succimate, δεν λύνει τα λιπίδια και δεν υδρολύει το άμυλο. Για την ανάπτυξη του χρειάζεται τα αμινοξέα: βιοτίνη, νικοτινικό οξύ και θυαμίνη.

Ο μηχανισμός με τον οποίο προκαλεί μάρανση στα φυτά δεν είναι απόλυτα γνωστός, όμως πρόσφατες μελέτες υποστηρίζουν ότι οφείλεται στη παραγωγή κυτταρίνης που δρά ως ενδο-β-1,4 γλουκανάση και στη παραγωγή μιας προτεάσης. Η ενζυματική αυτή δράση σχετίζεται με τα ταυτοποιημένα γονίδια παθογένεσης του βακτηρίου καθώς χωρίς την ενεργοποίησή τους δεν υπάρχει εμφάνιση συμπτωμάτων στα φυτά (Murtaza, 2009).

Εκτός από την τομάτα προσβάλλει υπό φυσικές συνθήκες και άλλα είδη της οικογένειας Solanaceae, όπως τα φυτά *Solanum mammosum*, *Solanum douglasii*, *Solanum nigrum* και *Solanum triflorum*. Σαν ξενιστές του παθογόνου σε τεχνητές ή φυσικές μολύνσεις αναφέρονται ακόμη τα φυτά *Solanum melongena*, *Capsicum frutescens*,

Chyromandra betaceae αλλά και διάφορα είδη των γενών *Solanum*, και *Nicotiana* (Παναγόπουλος, 2000, Kodo,2010).

Το Cmm ανήκει στα παθογόνα καραντίνας καθώς δεν υπάρχει πιο αποτελεσματική μέθοδος καταπολέμησης για το βακτήριο από την πρόληψη και την αποφυγή μεταφοράς του στη καλλιέργεια (de Leon et al., 2011).

1.3 Είσοδος παθογόνου

Το Cmm εμφανίζει δυο τρόπους προσβολής του φυτού:

- διασυστηματική προσβολή, κατά την οποία το παθογόνο μπαίνει στο φυτό από πληγές στις ρίζες και το λαιμό που προκαλούνται από έντομα, νηματώδεις αλλά και κατά την μεταφύτευση και τις καλλιεργητικές φροντίδες. Αρχικά εγκαθίσταται στα αγγεία του ξύλου και στη συνέχεια στο φλοιό και την εντεριόνη και προκαλεί την διασυστηματική προσβολή (de Leon et al., 2011).
- δευτερογενής παρεγχυματική προσβολή (τοπική), μέσω των φυσικών ανοιγμάτων της φυλλικής επιφάνειας όπως στομάτια, φακίδια, τριχίδια και διάφορες υπέργειες πληγές (de Leon et al., 2011). Βέβαια θα πρέπει να αναφερθεί ότι οι τοπικές προσβολές μπορούν να προχωρήσουν στα ξυλώδη αγγεία και να οδηγήσουν σε συμπτώματα διασυστηματικής προσβολής (Gleason et al., 1993), ειδικά όταν οι περιβαλλοντικές συνθήκες είναι ευνοϊκές και ανάλογα πάντα με τη φυσιολογία του φυτού (ηλικία και υβρίδιο) (Chang et al., 1992).

1.4 Συμπτώματα και σημεία της ασθένειας

Το είδος και η έκταση των συμπτωμάτων ποικίλλουν ανάλογα με τη μολυσματικότητα του βακτηριακού στελέχους, την ευπάθεια της ποικιλίας, τις συνθήκες καλλιέργειας και του περιβάλλοντος, τον χρόνο και τον τρόπο της μόλυνσης και την ηλικία των φυτών. Τα νεαρά φυτά παρουσιάζουν συνήθως μαρασμό και νεκρώνονται γρήγορα, ενώ αν επιβιώσουν παρουσιάζουν έντονο νανισμό. Τα μεγαλύτερης ηλικίας φυτά εμφανίζουν τα τυπικά συμπτώματα αδροβακτηρίωσης. Στην περίπτωση διασυστηματικής προσβολής (άμεση μόλυνση των αγγείων από σπόρο ή πληγή), τα παλαιότερα φύλλα του φυτού

γέρνουν προς τα κάτω, ενώ τα φυλλάρια τους εμφανίζουν κατσάρωμα και συστροφή προς τα πάνω χωρίς μάρανση. Μάρανση μονόπλευρη, παροδική ή μόνιμη παρατηρείται πιο συχνά στα φύλλα της κορυφής. Τα αγγεία του ξύλου σε όλο το μήκος του στελέχους εμφανίζουν σταδιακά κίτρινο μέχρι έντονο καστανό-μαύρο μεταχρωματισμό, ο οποίος στη θέση πρόσφυσης των φύλλων στο στέλεχος έχει την μορφή ή ίχνος πετάλου αλόγου (Γκούμας, 2012).

Στη τομάτα, τα συμπτώματα της ασθένειας είναι πολλά και ποικίλα και εξαρτώνται από την ευπάθεια του υβριδίου, τις καλλιεργητικές πρακτικές το χρόνο και τον τύπο της προσβολής και άλλους παράγοντες (de Leon et al., 2011), ενώ σε κάποιες περιπτώσεις μπορεί να έχουμε ασυμπτωματικές προσβολές.

Επιπρόσθετα, η περίοδος από την προσβολή μέχρι την εκδήλωση των συμπτωμάτων (της διασυστηματικής προσβολής) κυμαίνεται από 7 έως 84 μέρες (Gleason et al., 1992). Μελέτες έχουν δείξει ότι οι χαμηλές θερμοκρασίες, η ηλικία του φυτού και η έλλειψη θρεπτικών στοιχείων είναι παράγοντες που επηρεάζουν την εμφάνιση των συμπτωμάτων (Gleason et al., 1992). Οι Chang et al. (1992) έδειξαν ότι η περίοδος επώασης ήταν μεγαλύτερη και τα συμπτώματα λιγότερο έντονα σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες ή μικρότερες των 25°C, σε υβρίδια μέτριας ανθεκτικότητας και σε περιπτώσεις μικρής ποσότητας μολύσματος.

Για όλους τους παραπάνω λόγους η σωστή διάγνωση της ασθένειας δεν μπορεί να βασισθεί αποκλειστικά στη συμπτωματολογία των φυτικών ιστών (Gleason et al., 1993)

1.4.1 Συμπτώματα διασυστηματικής προσβολής

Τα φυτάρια στο σπορείο παρουσιάζουν συνήθως μάρανση και αποξηραίνονται. Αν όμως επιζήσουν παρουσιάζουν έντονο νανισμό. Πολλές φορές τα πρώτα συμπτώματα εμφανίζονται μετά την μεταφύτευσή.

Στα μεγαλύτερης ηλικίας φυτά παρατηρείται το σύνδρομο του βραδέως μαρασμού. Πολλά φύλλα, ιδίως τα κατώτερα, βαθμιαία μαραίνονται. Η μάρανση εκδηλώνεται με μορφή ημιπληγίας στην αρχή, ενώ λιγότερο συχνά εμφανίζονται έλκη στο βλαστό (de Leon et al., 2011), στα προχωρημένα στάδια της προσβολής καταστρέφεται ο φλοιός των βλαστών και σχίζεται η επιδερμίδα (Παναγόπουλος, 2000). Σε συνθήκες υψηλής υγρασίας είναι δυνατόν να παρατηρηθεί βακτηριακό έκκριμα. Αναλυτικότερα, για την διασυστηματική μόλυνση τα φυτάρια του σπορείου συνήθως φτάνουν σε μαρασμό και

ξηραίνονται. Αν όμως επιζήσουν παρουσιάζουν έντονο νανισμό ενώ πολλές φορές τα συμπτώματα μπορούν να εμφανιστούν αργότερα μετά την μεταφύτευση. Στα μεγαλύτερα φυτά παρατηρείται το σύμπτωμα βραδέως μαρασμού. Αρχικά, στα κατώτερα φύλλα, παρατηρείται επιναστία και μαραίνονται αργότερα βαθμιαία, ενώ τα ανώτερα φύλλα διατηρούν την σπαργή τους. Η μαρανση μπορεί να είναι μονόπλευρη (ημιπληγία, Εικόνα 1.1) με την περιφέρεια των φύλλων να συστρέφεται προς τα πάνω. Στην περίπτωση που η μόλυνση ξεκινά από πληγή κλαδέματος, τότε τα συμπτώματα εμφανίζονται πρώτα στην κορυφή και προχωρούν ταχύτατα προς τα κάτω, θανατώνοντας το φυτό. (Παναγόπουλος 1992, Παναγόπουλος 2000)



Εικόνα 1.1: Συμπτώματα ημιπληγίας σε φύλλα τομάτας

Χαρακτηριστικό σύμπτωμα της ασθένειας είναι ο κίτρινος μέχρι καστανός-μαύρος μεταχρωματισμός των αγγείων σ' ολόκληρο το μήκος των προσβεβλημένων βλαστών και μίσχων των φύλλων (Εικόνα 1.2, Εικόνα 1.3.). Σε εγκάρσια τομή στη βάση μίσχου φύλλου παρατηρείται καστανός μεταχρωματισμός των αγγείων ημισελινοειδούς μορφής ή πετάλου αλόγου. Συχνά οι μεταχρωματισμένοι ιστοί εμφανίζουν μαλακή αποσύνθεση. Λόγω καταστροφής της αγγειακής μοίρας από τη δράση του παθογόνου, παρατηρείται αποκόλληση του κεντρικού κυλίνδρου από την εντεριώνη. Στα προχωρημένα στάδια της προσβολής καταστρέφεται ο φλοιός των βλαστών και σχίζεται η επιδερμίδα με αποτέλεσμα να σχηματίζονται επιμήκη ανοιχτά έλκη στην επιφάνεια του στελέχους. Η παρουσία τέτοιων

ελκών εξηγεί την ονομασία της ασθένειας και επιπλέον αποτελεί χαρακτηριστικό σύμπτωμα.



Εικόνα 1.2 : Μεταχρωματισμός των αγγείων, σχηματισμός πέταλου.



Εικόνα 1.3 : Ξήρανση των άκρων των φυλλαρίων και καστανός μεταχρωματισμός του βλαστού.

Χαρακτηριστικά συμπτώματα επίσης μπορούν να εμφανιστούν και σε προσβεβλημένους καρπούς όταν τα βακτήρια κινηθούν διασυστηματικά διαμέσου του δικτύου των αγγείων του βλαστού και περάσουν στους ποδίσκους των καρπών. Οι νεαροί καρποί παραμορφώνονται ενώ οι μεγαλύτεροι, αν και μπορεί να μην έχουν εξωτερικά συμπτώματα, παρουσιάζουν αδυναμία πρόσφυσης του ποδίσκου στον καρπό καθώς και κιτρίνισμα στο εσωτερικό του (Παναγόπουλος, 2000). Σπανιότερα παρατηρείται το σύμπτωμα της μαρμάρωσης του καρπού δηλαδή της εμφάνισης των νευρώσεων του.

1.4.2 Συμπτώματα τοπικών δευτερογενών παρεγχυματικών προσβολών

Στις περιπτώσεις επιδημίας, το κύριο σύμπτωμα είναι η περιφερειακή νέκρωση των φύλλων και η συστροφή προς τα πάνω (de Leon et al., 2011),

Λιγότερο συχνά, στο έλασμα των φύλλων, στους μίσχους, στα στελέχη και τους κάλυκες των ανθέων, παρατηρούνται κυκλικές υπερυψωμένες φλυκταινώδεις κηλίδες ανοιχτού καστανού χρώματος με ανώμαλη επιφάνεια και φελλώδη υφή.

Ενώ, στους καρπούς σχηματίζονται κηλίδες κυκλικές, χρώματος αρχικά υπόλευκου και στην συνέχεια καστανού που περιβάλλονται από μία υπόλευκη άλω. Οι κηλίδες είναι διαμέτρου 3-6 mm που συχνά σχίζονται στο κέντρο και μοιάζουν με «μάτι πτηνού». Η προσβολή μπορεί να γίνει και μέσω των αγγείων και τέτοιοι καρποί είναι συνήθως μικροί, παραμορφωμένοι και με αλλοιωμένη απόχρωση κατά θέσεις, ιδίως όταν η προσβολή γίνεται στο στάδιο της ανάπτυξης (Εικόνα1.4)(Παναγόπουλος, 2000).



Εικόνα 1.4: Χαρακτηριστικό σύμπτωμα «μάτι πτηνού» μετά από προσβολή με το Cmm

1.5 Επιβίωση και Μετάδοση του παθογόνου

Το βακτήριο επιβιώνει στον σπόρο, με τον οποίο και μεταδίδεται σε αμόλυντες περιοχές. Σε φυσικά μολυσμένο σπόρο το βακτήριο απαντάται σε πληθυσμούς 10^2 και 10^4 cfu / σπόρο με το 10^2 cfu / σπόρο να είναι το ελάχιστο μόλυσμα που απαιτείται για τη μετάδοση του βακτηρίου (de Leon et al., 2011). Φυσικά μολυσμένος σπόρος σε αναλογία

1:10.000 μπορεί να οδηγήσει σε επιδημική εκδήλωση της ασθένειας στον αγρό εφόσον επικρατήσουν ευνοϊκές συνθήκες (Gleason et al., 1993).

Στο σπόρο το παθογόνο εντοπίζεται γύρω από το έμβρυο, όπου φθάνει δια μέσου της μικροπύλης. Οι μολυσμένοι σπόροι είναι δυνατό να μην εκδηλώσουν αμέσως την προσβολή αφού δίνουν φυτάρια φαινομενικά υγιή, στα οποία η ασθένεια θα εμφανιστεί συνήθως μόνο σε προχωρημένο στάδιο ανάπτυξης του φυτού (Kaselaki et al., 2011).

Στο έδαφος μπορεί να επιβιώσει από 2,5 έως και 5 χρόνια, σε κόμποστ μέχρι 2 χρόνια, στα υλικά υποστύλωσης των φυτών, στα υπολείμματα της καλλιέργειας της τομάτας (βλαστός και άλλα μέρη) και στα πολυετή ζιζάνια της οικογένειας Solanaceae μέχρι 10 μήνες (Murtaza, 2009).

Μπορεί επίσης να παραμείνει σε θερμοκήπιο και στο χωράφι, όταν οι καλλιέργειες είναι συνεχείς κατά την διάρκεια του έτους, καθώς και σε άλλους ξενιστές και μη ξενιστές επιφυτικά, (Chang et al., 1992), οι οποίοι μπορεί να αποτελέσουν συνεχείς πηγές μόλυσματος (de Leon et al., 2011). Τέλος, το παθογόνο επιβιώνει στα εργαλεία (Παναγόπουλος, 2000).

Στη περίπτωση της επιβίωσης στο σπόρο, αρκούν μερικά μόνο μολυσμένα φυτά που θα αποτελέσουν τη πηγή πολλών δευτερογενών μολύνσεων καθώς η μετάδοση είναι ραγδαία μέσω των καλλιεργητικών φροντίδων (κλάδεμα, δέσιμο, συλλογή καρπών κλπ.) (Chang et al., 1992).

Η χρήση εμβολιασμένων φυταρίων, η διαδικασία παραγωγής των οποίων δημιουργεί πληγές, αποτελεί έναν ακόμα ιδιαίτερα αποτελεσματικό τρόπο για τη είσοδο και μετάδοση του βακτηρίου στα φυτά. (de Leon et al., 2011)

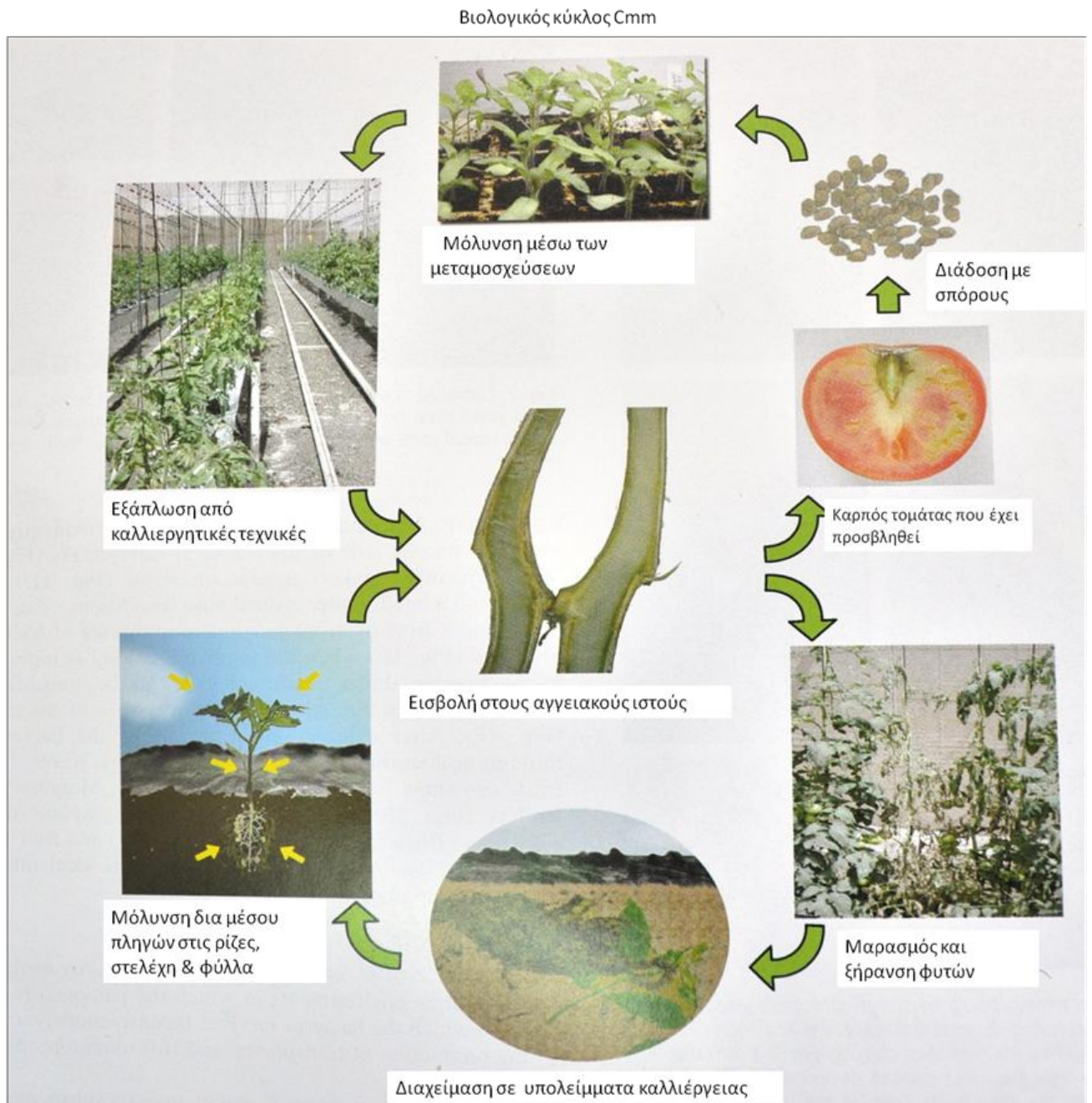
Από τις επιφυτικές πηγές, το βακτήριο μεταδίδεται με τη βροχή, τους ψεκασμούς, το νερό άρδευσης και αναπτύσσεται στη φυλλική επιφάνεια. Σε κάποιες περιπτώσεις οι πληθυσμοί της φυλλικής επιφάνειας ευθύνονται για την έναρξη επιδημιών της ασθένειας (Chang et al., 1992).

Στο χωράφι, 1-5 φυτάρια με διασυστηματική προσβολή μπορεί να καταλήξουν σε επιφυτικούς πληθυσμούς των 10^7 - 10^9 cfu /g νωπού βάρους σε απόσταση 2.7 μέτρων από την εστία της προσβολής (Chang et al., 1992), που μπορεί να αποτελέσουν πηγές δευτερογενών μολύνσεων (de Leon et al., 2011).

Το μόλυσμα που παραμένει στα υπολείμματα καλλιέργειας τομάτας στο έδαφος, μπορεί να διατηρηθεί από μερικούς μήνες μέχρι και παραπάνω από ένα χρόνο και να αποτελέσει τοπική πηγή μόλυσματος για τη καινούργια καλλιέργεια (de Leon et al., 2011). Η διατήρηση του επηρεάζεται από τις συνθήκες του εδάφους και συγκεκριμένα το ρυθμό της αποσύνθεσης των φυτικών υπολειμμάτων. Στη μελέτη των Chang et al. (1992) αναφέρεται ότι όταν τα υπολείμματα θάβονται, ο ρυθμός αποσύνθεσης είναι γρηγορότερος και το μόλυσμα μειώνεται δραστικά.

Στο έδαφος το βακτήριο απελευθερώνεται από τα φυτικά υπολείμματα αλλά ο πληθυσμός μειώνεται 10-100 φορές σε σχέση με τον πληθυσμό πάνω στα φυτικά υπολείμματα. Γενικά η επιβίωση του στο χωράφι εξαρτάται από τις συνθήκες που επικρατούν (ευνοείται από δροσερό και υγρό καιρό) και την διαθεσιμότητα φυτικού ιστού που θα παρέχει τα θρεπτικά στοιχεία για τις ελάχιστες μεταβολικές ανάγκες του *Cmm*.

Η τοπική εξάπλωση στο χωράφι και οι προσβολές σε κάποιες περιπτώσεις διευκολύνονται από: τον αέρα, τη βροχή, το τρεχούμενο νερό, τα έντομα και τις καλλιεργητικές πρακτικές (μεταφύτευση, δέσιμο, κλάδεμα, επικονίαση, ψεκασμούς και συγκομιδή (Murtaza, 2009, Μπαγκής και Γκούμας, 2012). Το παθογόνο εισάγεται σε αμόλυντους αγρούς διαμέσου των προσβεβλημένων σποροφύτων που φέρουν λανθάνουσες μολύνσεις και στις φυτωριακές μονάδες από τους μολυσμένους σπόρους (Gitaitis et al, 1991). Στην εικόνα 1.5 παρουσιάζονται τα διαδοχικά στάδια του βιολογικού κύκλου του βακτηρίου *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Προφανής είναι η σημασία χρήσης υγιούς πολλαπλασιαστικού υλικού (σπόροι-σπορόφυτα) στη διασπορά του παθογόνου.



Εικόνα 1.5: Βιολογικός κύκλος του Cmm (προσαρμογή από Leon et al, 2011).

1.6 Ανίχνευση του Cmm

Η ανίχνευση και απομόνωση του βακτηρίου ιδιαίτερα σε ασυμπτωματικά φυτά είναι δύσκολη (Chang et al., 1992), αλλά απαραίτητη για τη σωστή διάγνωση της ασθένειας όσο και τη σωστή ερμηνεία των δεδομένων πειραματικών μελετών.

Για τη σωστή ανίχνευση του Cmm, η μέθοδος που θα χρησιμοποιηθεί θα πρέπει να είναι ευαίσθητη στο να εντοπίζει ακόμα και μικρούς πληθυσμούς του παθογόνου και να τους διαφοροποιεί από άλλους οργανισμούς που συνυπάρχουν στο φυτικό ιστό.

Σύμφωνα με τους Gitaitis et al. (1995) μια μέθοδος απομόνωσης του Cmm από τα φυτά τομάτας είναι με τη μέθοδο του ‘αποτυπώματος’, σε ημικλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα, κομματιού του βλαστού, 1 cm από τη κορυφή και αποκλειστικά μέσα σε 48 ώρες από τη τεχνητή μόλυνση.

Η απομόνωση ακόμα και σε εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα για την δημιουργία τυπικών αποικιών του βακτηρίου μπορεί να είναι ανεπιτυχής καθώς τα κύτταρα, όπως συμβαίνει και με άλλα βακτήρια, μπορεί να είναι σε λανθάνουσα μορφή σε κατάσταση ‘ζωντανή αλλά μη καλλιεργήσιμη’ (Viable But Not Culturable-VBNC), που ‘επάγεται από ξηρή ατμόσφαιρα, απουσία θρεπτικών στοιχείων, διάφορες χημικές επεμβάσεις κ.α που χρειάζονται μελέτη όπως αναφέρεται απ’ τους de Leon et al. (2011). Άλλοι λόγοι μπορεί να είναι ότι τα βακτηριακά κύτταρα είναι στρεσαρισμένα ή ‘πληγωμένα’ με αποτέλεσμα και πάλι τη μη δημιουργία αποικιών σε τεχνητό θρεπτικό υπόστρωμα (de Leon et al., 2011)

Επίσης ευρέως χρησιμοποιείται η μέθοδος του ανοσοφθορισμού, η οποία όμως δεν διαφοροποιεί τα νεκρά από τα ζωντανά κύτταρα και διάφορες μοριακές τεχνικές όπως η PCR.

1.7 Καταπολέμηση

1.7.1 Χημική Καταπολέμηση

Η στρεπτομυκίνη και η χρήση χαλκούχων σκευασμάτων έχουν δοκιμασθεί προστατευτικά σε φυτά μολυσμένα με Cmm στο χωράφι για την αποφυγή δευτερογενών μολύνσεων με καλά αποτελέσματα (de Leon et al., 2008) που όμως δεν έχουν μελετηθεί εκτενώς στις θερμοκηπιακές καλλιέργειες τομάτας στη Νότια Ευρώπη (de Leon et al.,

2008). Βέβαια η χρήση της στρεπτομυκίνης και γενικότερα αντιβιοτικών για τη καταπολέμηση βακτηριακών ασθενειών έχει απαγορευθεί στην Ε.Ε.

Σε θερμοκηπιακές καλλιέργειες τομάτας μετά από τεχνητή μόλυνση επιφυτικά και διασυστηματικά, οι de Leon et al. (2008) αναφέρουν ότι το αντιβιοτικό kasugamisin (εγκεκριμένο για χρήση σε πολλές χώρες της Ε.Ε.) δεν κατάφερε να μειώσει την ανάπτυξη της ασθένειας σε φυτά με διασυστηματικές προσβολές. Ο χαλκός σε συνδυασμό με το mancozeb, που φάνηκε να έχει συνεργιστική δράση στη μείωση του πληθυσμού του Cmm και την εξάπλωση του ενώ το mancozeb μόνο του δεν ήταν αποτελεσματικές. Ο θειικός χαλκός σε συνδυασμό με το 8-hydroxy-quinoline (και τα δύο στη μισή συνιστώμενη δόση) ήταν η πιο αποτελεσματική επέμβαση στη καταπολέμηση των επιφυτικών προσβολών στα φύλλα και τους καρπούς, σημαντικά καλύτερη από τη μεμονωμένη εφαρμογή του καθενός. Σύμφωνα με τους de Leon et al. (2008) μπορεί να χρησιμοποιηθεί προστατευτικά πριν τη προσβολή αλλά και μετά την προσβολή για τη μείωση των δευτερογενών επιφυτικών μολύνσεων.

Παρόμοια καλά αποτελέσματα για το χαλκό και συγκεκριμένα το υδροξείδιο του χαλκού, είτε μεμονωμένα ή σε συνδυασμό με το mancozeb αναφέρονται και από τους Werner et al. (2002)

1.7.2 Βιολογική Καταπολέμηση

Έχουν διεξαχθεί μελέτες με αιθέρια έλαια, εκχυλίσματα πρόπολης και εκκρίματα ρητίνης αλλά αποκλειστικά σε *in vitro* πειράματα (de Leon et al., 2008)

Έχουν παρουσιασθεί μελέτες με δοκιμές επαγωγή αντοχής και βακτηριακούς ανταγωνιστές του Cmm, που όμως δεν παρουσιάζουν σταθερή αποτελεσματικότητα και επαναληψιμότητα στην καταπολέμηση της ασθένειας στο χωράφι (de Leon et al., 2008).

Στη μελέτη των Werner et al.(2002), εφαρμόστηκε ο επαγωγέας αντοχής Asibenzolar-S-methyl (ABM) σε φυτάρια στο θερμοκήπιο και αποδείχθηκε ότι έχει ικανοποιητική αποτελεσματικότητα ως προστατευτικό προϊόν, ειδικά όταν εφαρμόζεται σε συνδυασμό με οξυχλωριούχο χαλκό, αλλά είναι σημαντικά λιγότερο αποτελεσματικό συγκριτικά με τα χαλκούχα σκευάσματα και το mancozeb.

Οι Boudyach et al.(2001) δοκίμασαν 178 στελέχη ριζοβακτηρίων εναντίον του Cmm σε θερμοκηπιακή καλλιέργεια τομάτας, απομονωμένων από το έδαφος, τη ριζόσφαιρα και την επιφάνεια των ριζών. Αποτελεσματικότερα στη γρήγορη και επιτυχή αποίκηση της ρίζας αποδείχθηκαν τα βακτηριακά στελέχη που απομονώθηκαν από την επιφάνεια της ρίζας (rhizoplane). Ταυτοποιήθηκαν ως στελέχη των γενών *Bacillus* και *Pseudomonas*, ακτινομυκήτων και άλλων κατά gram αρνητικών βακτηρίων. Αυτά δοκιμάστηκαν για την αποτελεσματικότητα τους εναντίον του Cmm και αποδείχθηκε ότι η εφαρμογή τους με ψεκασμό πρώτα σε σπόρο τεχνητά μολυσμένο με Cmm και κατόπιν στις ρίζες των αναπτυσσόμενων φυταρίων, τα προστάτευσαν από την ασθένεια για 45 μέρες, διάστημα αρκετό για τη τομάτα μέχρι να ενεργοποιηθεί η αντίσταση του φυτού. Οι συγγραφείς υποστηρίζουν ότι η αποτελεσματικότητα των στελεχών οφείλεται στην καλή ανταγωνιστική τους ικανότητα κατάληψης του χώρου και λήψης των θρεπτικών στοιχείων.

Βακτηριακά στελέχη και συγκεκριμένα του γένους *Bacillus* spp. έχουν δοκιμασθεί και για την ικανότητα τους να παρεμποδίσουν τη δημιουργία αποικιών in vitro, από μολυσμένο με Cmm σπόρο τομάτας με πολύ καλά αποτελέσματα (μηδενική εμφάνιση αποικιών σε σχέση με τον μάρτυρα) (Kasselaki et al., 2011).

1.7.3 Η χρήση των Κόμποστ στη βιολογική καταπολέμηση

Υπάρχουν πάρα πολλές μελέτες για τη χρήση διάφορων τύπων κόμποστ στη καταπολέμηση παθογόνων εδάφους που όμως αναφέρονται κυρίως σε παθογόνους μύκητες (Yoven et al., 2009).

Σύμφωνα με τις περισσότερες μελέτες, η αποτελεσματικότητα των κόμποστ αποδίδεται κυρίως σε βιολογικούς παράγοντες (ανταγωνιστικοί μικροοργανισμοί) και λιγότερο σε κάποιους αβιοτικούς παράγοντες (Yoven et al., 2009)

Συγκεκριμένα οι Utkhede and Koch (2004) αναφέρουν ότι ο ψεκασμός με τσάι από vermicompost (κομποστ με γαιοσκώλικες) στο θερμοκήπιο παρεμπόδισε την εξέλιξη του Cmm, αποδίδουν όμως αυτή την αποτελεσματικότητα στην επαγωγή αντοχής. Ενδεχομένως οι πληθυσμοί των ριζοβακτηρίων προάγονται με τη προσθήκη κόμποστ στο έδαφος και ως γνωστόν τα ριζοβακτήρια επάγουν αντοχή στα φυτά απέναντι στα παθογόνα εδάφους.

Σε άλλη μελέτη, οι Kasselaki et al. (2011) αναφέρουν ότι η εμφάνιση σε τσάι, μολυσμένων με Cmm σπόρων τομάτας, διάφορων κόμποστ είχε ως αποτέλεσμα την ολική παρεμπόδιση ανάπτυξης του Cmm *in vitro*.

Ένα άλλο πλεονέκτημα των κόμποστ ως μέσα καταπολέμησης σε σχέση με τη χημική καταπολέμηση, είναι ότι όχι μόνο περιορίζουν την αύξηση του υπάρχοντος μολύσματος στο έδαφος, αλλά προστατεύουν το έδαφος και από καινούργιες μολύνσεις μέσω του νερού άρδευσης, ή τους μολυσμένους φυτικούς ιστούς.

Οι Yonev et al. (2009) στη μελέτη τους καταλήγουν ότι τα κόμποστ από φυτικά υπολείμματα που δοκιμάστηκαν έχουν τη δυνατότητα να περιορίσουν τους πληθυσμούς του Cmm και θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως μέσα καταπολέμησης σε προγράμματα ολοκληρωμένης διαχείρισης της ασθένειας.

Μόνη προϋπόθεση πριν τη χρήση στο χωράφι: η έκθεση σε υψηλές θερμοκρασίες στη διάρκεια της κομποστοποίησης προκειμένου να εξασφαλισθεί η ολοκληρωτική καταστροφή πιθανού μολύσματος των παθογόνων εδάφους.

1.7 Ανθεκτικά υβρίδια

Στο παρόν υπάρχουν πολύ λίγα υβρίδια τομάτας στην αγορά που εμφανίζουν σημαντική ανεκτικότητα στην ασθένεια στο χωράφι (de Leon et al., 2008). Ως μέτρο διαχείρισης της ασθένειας όμως και μείωσης του πληθυσμού του παθογόνου για την αποφυγή των επιδημιών είναι ιδιαίτερα σημαντικό, ειδικά όταν εφαρμόζεται σε συνδυασμό με χαλκούχα σκευάσματα (Werner et al., 2002).

Συμπερασματικά με βάση τα παραπάνω είναι σαφές ότι η ανάγκη για εναλλακτικούς τρόπους καταπολέμησης του βακτηριακού έλκους είναι δεδομένη.

Τα αντιβιοτικά αν και ιδιαίτερα αποτελεσματικά, στην πλειονότητα τους δεν επιτρέπονται στις χώρες της Ε.Ε., ενώ η εντατική χρήση του χαλκού παρουσιάζει τον κίνδυνο συσσώρευσης στο έδαφος με δυσμενείς επιπτώσεις στα φυτά και το περιβάλλον. Επιπρόσθετα από το 1980 και μετά φαίνεται πως έχει αυξηθεί η ανθεκτικότητα των παθογόνων βακτηρίων στο χαλκό (de Leon et al., 2009)

1.8 Αντιμετώπιση

- Η χρήση υγιούς πολλαπλασιαστικού υλικού είναι ο σημαντικότερος παράγοντας για την πρόληψη της διάδοσης και εκδήλωσης της ασθένειας.
- Ο ύποπτος μολυσμένος σπόρος απολυμαίνεται με εμβάπτιση σε νερό θερμοκρασίας 50-55° C επί 25-30 λεπτά.
- Εκρίζωση των προσβεβλημένων φυταρίων με μέρος του εδάφους και κατόπιν καταστροφή σε απομακρυσμένο από την φυτεία μέρος.
- Καταστροφή των υπολειμμάτων μετά το τέλος της καλλιεργητικής περιόδου
- Το κλάδεμα να γίνεται με το χέρι ή τα εργαλεία του κλαδέματος να απολυμαίνονται συνεχώς.
- Το νερό άρδευσης να μη διέρχεται από προσβεβλημένες φυτείες
- Καταπολέμηση των σολανοειδών ζιζανίων
- Εφαρμογή προγράμματος αμειψισποράς.
- Χρήση ανεκτικών ποικιλιών.
- Εφαρμογή της μεθόδου ηλιοαπολύμανσης του εδάφους η οποία έχει δώσει ικανοποιητικά αποτελέσματα σε διάφορες περιοχές της Ελλάδας (Τζάμος Γ., 2011).

1.9 Σκοπός της εργασίας

Η παρούσα μελέτη έγινε στα πλαίσια μιας σειράς πειραμάτων όπου μελετήθηκε η αποτελεσματικότητα διάφορων κόμποστ στη παρεμπόδιση μυκητολογικών και βακτηριολογικών ασθενειών καλλιεργειών των σολανωδών και κολοκυνθοειδών, που προκαλούν μερικά από τα σημαντικότερα και δυσκολότερα στη καταπολέμηση, παθογόνα εδάφους όπως οι μύκητες του γένους *Verticillium* και *Fusarium* και το βακτήριο *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*.

Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκε η δυνατότητα χρησιμοποίησης διαφόρων κόμποστ και βακτηρίων του γένους *Bacillus* spp στην αντιμετώπιση του Cmm (*in vivo*).

2^ο ΚΕΦΑΛΑΙΟ

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Βακτηριακά στελέχη

Τα βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία προέρχονται από τη συλλογή του εργαστηρίου Βακτηριολογίας του Τ.Ε.Ι. Κρήτης. Με τη βοήθεια αποστειρωμένης οδοντογλυφίδας μεταφυτεύτηκαν από τους σωλήνες διατήρησης στους 4°C και καλλιεργήθηκαν σε τριβλία που περιείχαν ημικλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα m-SCM. Το εν λόγω εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα έχει την εξής σύνθεση:

- Mannose 10g/l
- Yeast extract 0.1g/l
- K₂HPO₄ 2g/l
- KH₂PO₄ 0.5 g/l
- MgSO₄·7H₂O 0.25g/l
- Boric acid 1.5g/l και
- Agar

Μετά από την αποστείρωση προστέθηκαν:

- Cycloheximide 0,08gr (Διάλυση σε 1ml μεθανόλης)
- Nalidixic acid 0,015 (Διάλυση σε 0,5ml 0,1M NaOH) και
- Nicotinic acid 0,04gr (Διάλυση σε 8ml AA H₂O).

Το υπόστρωμα απλώθηκε σε πλαστικά τριβλία Petri διαμέτρου 9 cm. Τα βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν στη διάρκεια της μελέτης παρουσιάζονται στον Πίνακα 1.

Στελέχη	Περιοχή	Χρονολογία Απομόνωσης
4263	Καλλιάνη Κορινθίας	2008
4280	Κοντούρα Χανιά	2009
4284	Κυπαρισσία	2010
4304	Κόρινθος	2011
4306	Κόρινθος	2011

Πίνακας 1. Τα στελέχη του *Cmm* που χρησιμοποιήθηκαν

2.2 Έλεγχος παθογένειας στελεχών του Cmm

Για τον έλεγχο της παθογένειας των απομονώσεων όλα τα στελέχη εξετάστηκαν ως προς την ικανότητα έκλυσης αντίδρασης υπερευαισθησίας (HR) σε φύλλα φυτών δειλινού (νυχτολούλουδο, *Mirabilis jalapa*), με τη μέθοδο της έκχυσης βακτηριακού αιωρήματος συγκέντρωσης 10^8 cfu/ml με τη βοήθεια σύριγγας. Η παρασκευή των αιωρημάτων έγινε σε αποσταγμένο και αποστειρωμένο νερό με την βοήθεια αποστειρωμένης οδοντογλυφίδας, από καλλιέργεια 48 ωρών σε θρεπτικό υπόστρωμα m-SCM. Τα φυτά μετά την έκχυση καλύφθηκαν με διαφανείς πλαστικές σακούλες για την διατήρηση της σχετικής υγρασίας σε υψηλό επίπεδο. Μετρήσεις για την πρόκληση αντίδρασης υπερευαισθησίας λήφθηκαν μετά από 24 μέχρι 48 ώρες.

Επιπρόσθετα, έλεγχος της παθογένειας του βακτηρίου έγινε με δυο τρόπους:

α) μόλυνση πέντε φυτών τομάτας στο σταδιο 3-4 πραγματικών φύλλων cv Erani με τη μέθοδο της οδοντογλυφίδας που έφερε μόλυσμα από αποικία του βακτηρίου από καλλιέργεια 2 ημερών σε Nutrient Agar Glucose (NAG) η οποία τοποθετήθηκε στο στέλεχος του φυτού και τυλίχθηκε με παραφίλμ.

β) μόλυνση πέντε φυτών τομάτας cv Erani με ριζοπότισμα 25ml πυκνού βακτηριακού αιωρήματος συγκέντρωσης 5×10^8 / ml, ανά φυτό.

2.3 Κόμποστ

Στην πτυχιακή εργασία αυτή χρησιμοποιήθηκαν οργανικά υποστρώματα (Compost) προερχόμενα από το Εργαστήριο Επεξεργασίας Υγρών και Στερεών Απόβλητων του ΤΕΙ Κρήτης. Παρακάτω περιγράφεται η σύσταση των κόμποστ.

Κόμποστ C1: κλαδιά διάφορων δέντρων

Κόμποστ C2: λάσπη βιολογικού καθαρισμού

Κόμποστ C3: στέμφυλα

Κόμποστ C4: πελτέ, πριονίδι και κλαδιά.

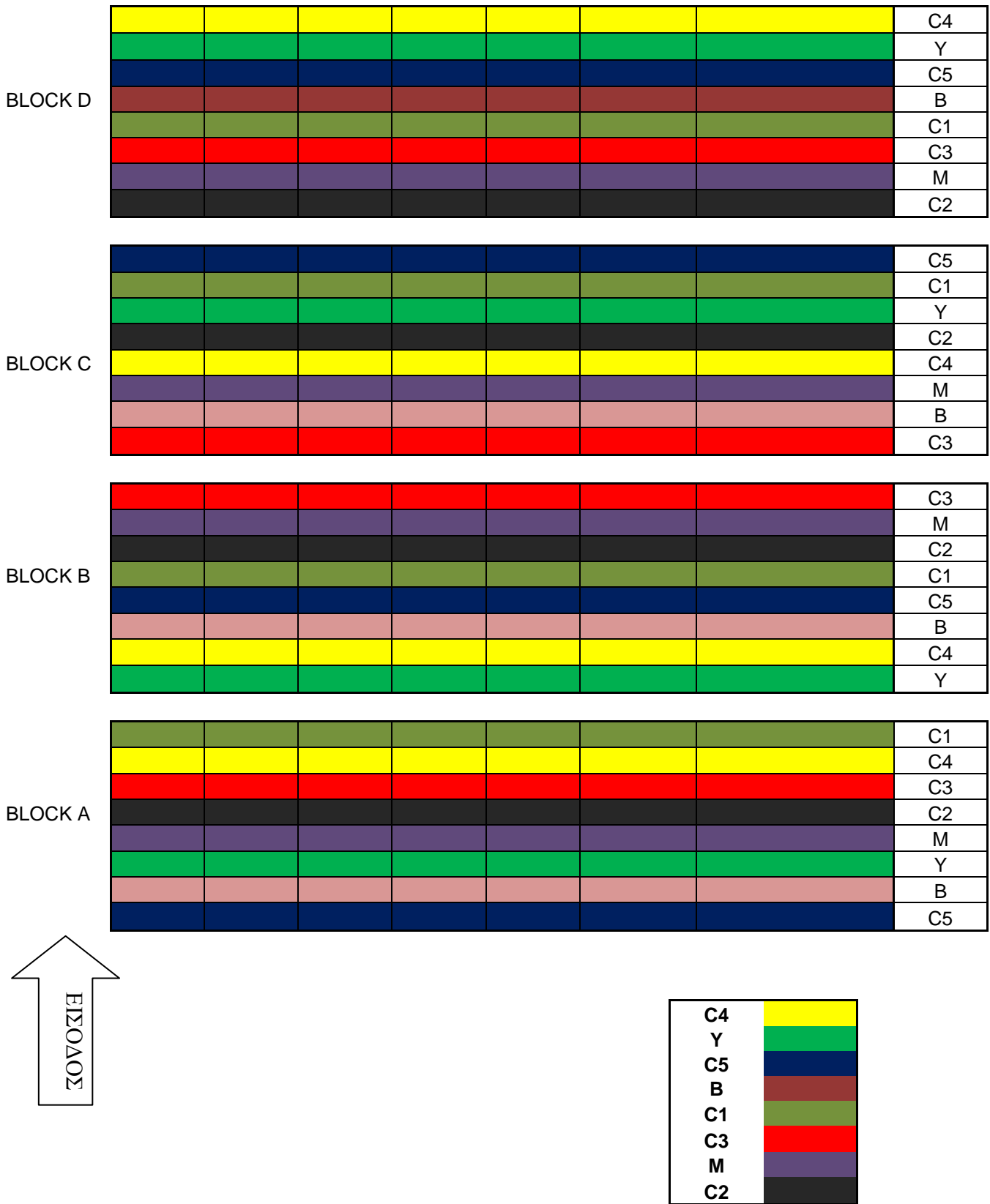
Κόμποστ C5: φυτικά υπολείμματα καλλιέργειών και οικιακά υπολείμματα κουζίνας που συσκευάζεται από την Διαδημοτική Επιχείρηση Διαχείρισης Στερεών Αποβλήτων (ΔΕΔΙΣΑ)

2.4 Καλλιέργεια και ανάπτυξη βακίλων

Χρησιμοποιήθηκαν οι βάκιλοι D1/8, D1/9, D1/4, D9/3 και D9/5 του γένους *Bacillus* spp. από το εργαστήριο Βακτηριολογίας- Φυτοπαθολογίας οι οποίοι αναπτύχθηκαν σε TSA (Thyrtone Soy Agar) για 24 ώρες σε θάλαμο επώασης στους 28 °C. Στη συνέχεια έγινε αιώρημα των βακίλων σε απιονισμένο και αποστειρωμένο (AA) νερό και μετρήθηκε η οπτική πυκνότητα με τιμή 0,1, με την βοήθεια του φωτόμετρου, στα 600nm. Στη συνέχεια, σε κωνικές φιάλες των 200ml, τοποθετήθηκαν 100 ml TSB (Thyrtone Soy Broth) και 100μl από το τελικό αιώρημα κάθε βακίλου. Οι καλλιέργειες επωάστηκαν σε περιστροφικό θάλαμο ανάπτυξης (Orbit) 100mot/min χωρίς φως για 3 ημέρες στους 28 °C. Κατόπιν, 400ml TSB εμβολιάστηκαν με 0,5ml αιωρήματος από την κάθε καλλιέργεια του βακίλου, σε κωνικές φιάλες των 400 ml. Οι καλλιέργειες επωάστηκαν σε περιστροφικό θάλαμο ανάπτυξης (Orbit) για τέσσερις ημέρες στους 28°C.

2.5 Πειραματικό σχέδιο

Οι οκτώ επεμβάσεις: Υγιή, Μολυσμένος μάρτυρας, Βάκιλλοι, Κόμποστ C1, Κόμποστ C2, Κόμποστ C3, Κόμποστ C4 και Κόμποστ C5 εφαρμόστηκαν σε τυχαιοποιημένες σειρές (plots) των 7 φυτών μέσα στις 4 ομάδες (blocks) – επαναλήψεις του πειράματος όπως απεικονίζεται παρακάτω (Σχεδιάγραμμα 1, Εικόνα 2.1).



Σχεδιάγραμμα 1: Παρουσίαση της διάταξης του πειραματικού σχεδίου στο θερμοκήπιο.



Εικόνα 2.1 : Εμφάνιση του πειραματικού στο θερμοκήπιο

Στην επέμβαση με τους βακίλους όλα τα φυτάρια εμβαπτίστηκαν σε υγρή καλλιέργεια μείγματος βακίλων για 30 λεπτά (Εικόνα 2.2), στην συνέχεια τα φυτάρια αυτά αλλά και όλων των υπολοίπων επεμβάσεων μεταφυτεύτηκαν στις 8/3/2012, στο στάδιο των 3-4 φύλλων, σε γλάστρες χωρητικότητας 3,5 λίτρων. Η αναλογία μαύρης τύρφης και κομπόστ ήταν 8:2. Χρησιμοποιήθηκε Υπόστρωμα Μαύρης τύρφης HUMIN SUBSTRAT N3, NEWHOUSE, Klasmann-Dailmann GMBH-49744 GEESTE, Germany.



Εικόνα 2.2 : Βακτηριοποίηση ριζών σπορόφυτων τομάτας

Η τεχνητή μόλυνση έγινε μια εβδομάδα μετά τη μεταφύτευση (14/3/2012), με ριζοπότισμα 25ml / φυτό πυκνού βακτηριακού αιωρήματος μείγματος των στελεχών που αναφέρονται παραπάνω(Πίνακας 1), συγκέντρωσης 5×10^8 / ml.

Σε όλη την διάρκεια του πειράματος πραγματοποιούνταν όλες οι καλλιεργητικές φροντίδες που απαιτούσε η καλλιέργεια όπως πότισμα, κλάδεμα , εφαρμογή βασικής λίπανσης με 20-20-20 καθώς και ψεκασμοί για την πρόληψη ασθενειών και την καταπολέμηση εχθρών, ιδιαίτερη μέριμνα λαμβανόταν ώστε να αποφευχθούν οι πιθανές επιμολύνσεις

2.6 Εκτίμηση της ασθένειας στο θερμοκήπιο

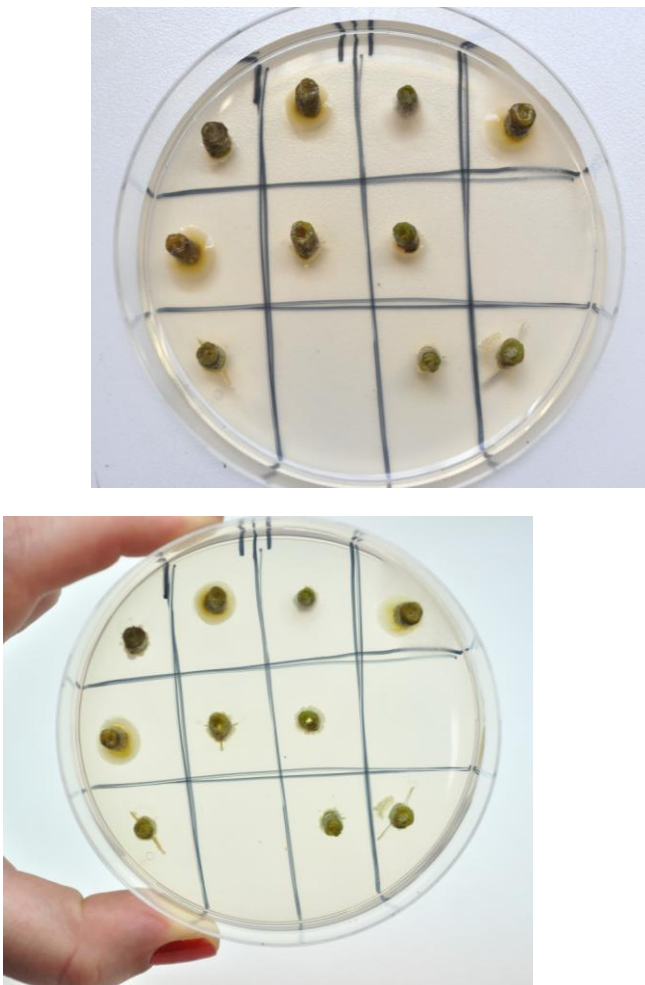
Έγιναν συνολικά τρεις εκτιμήσεις των συμπτωμάτων της ασθένειας στις: 25/4/2012, 2/5/2012 και 9/5/2012, δηλαδή 42, 49 και 56 μέρες αντίστοιχα μετά από τη τεχνητή μόλυνση. Ως θετικά, καταγράφηκαν τα φύλλα με τα εξής συμπτώματα: μαρασμός, ημιπληγία, περιφερειακή ξήρανση του ελάσματος και ολική ξήρανση του φύλλου.

2.7 Διαδικασία ανίχνευσης

Η ταυτοποίηση του *Cmm* από ιστούς που έφεραν τα παραπάνω συμπτώματα έγινε με τη μέθοδο του αποτυπώματος (Εικόνα 2.3).

Τα φυτά τομάτας μετά την απομάκρυνση του ριζικού συστήματος, απολυμάνθηκαν εξωτερικά με οινόπνευμα. Με ασηπτικές συνθήκες αφαιρέθηκε τμήμα του βλαστού περίπου 0,5 cm από την βάση του και στην συνέχεια αποκόπηκε τμήμα του (ροδέλα) όπου τοποθετήθηκε με την βάση προς τα κάτω το ημικλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα m-SMS

Ένα δεύτερο τμήμα του στελέχους σε συνέχεια από το προηγούμενο και αντιστοίχου μεγέθους, αφαιρέθηκε από τα φυτά τομάτας και τοποθετήθηκε σε σωλήνες erpendorf που περιείχαν 1ml ρυθμιστικού διαλύματος PBS 0.01 M με σκοπό την ανίχνευση του βακτηρίου στο εσωτερικό των ιστών των φυτών με τη μέθοδο του ανοσοθορισμού.



Εικόνα 2.3: Τυπικά ανάπτυξη του *Cmm* περιφερειακά του ιστού τομάτας

2.8 Μέθοδος Ανοσοφθορισμού

Σε αντικειμενοφόρο πλάκα 10 θέσεων τοποθετήθηκε σε κάθε θέση ποσότητα 15 μl φυτικού εκχυλίσματος και αφέθηκε να στεγνώσει. Το επόμενο βήμα ήταν η τοποθέτηση σταγόνας 15 μl από τον ορό αντί anti-clav 25, σε κατάλληλη αραιώση 1/500, για 30 λεπτά σε συνθήκες υγρασίας.

Ακολούθησε ξέπλυμα των πλακών και τρία τρίλεπτα εμβάπτισης της πλάκας σε φυσιολογικό ρυθμιστικό διάλυμα νερού (pH, 7,2). Έπειτα από το προσεκτικό στέγνωμα των αντικειμενοφόρων πλακών από την κάτω πλευρά και στην πάνω έξω από τις θέσεις αντίδρασης με διηθητικό χαρτί, τοποθετήθηκε σταγόνα 15 μl του φθορίζοντος ορού Alexa fluor σε αραιώση 1/100 και παρέμεινε για 30 λεπτά σε σκοτεινό και υγρό περιβάλλον.

Ακολούθησε εμβάπτιση των για τρία λεπτά σε φυσιολογικό ρυθμιστικό διάλυμα νερού (pH 7,2). Η διαδικασία ολοκληρώθηκε με την τοποθέτηση, μεταξύ καλυπτρίδας και αντικειμενοφόρου, σταγόνας ρυθμιστικού διαλύματος γλυκερίνης (glycerin buffer, pH 7,6), με σκοπό την διατήρηση του φθορισμού.

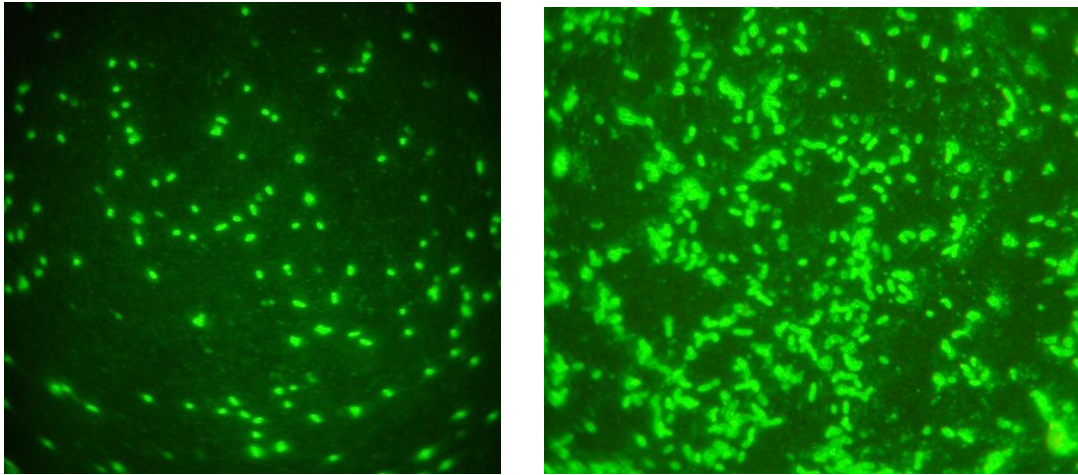
Η παρατήρηση των δειγμάτων έγινε σε μικροσκόπιο που είναι εφοδιασμένο με σύστημα επισκοπικού φθορισμού. Για την σωστή εκτίμηση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν οι εξής μάρτυρες: α) Αρνητικός μάρτυρας χωρίς τον αντιορρό του βακτηρίου προς ανίχνευση και β) Θετικός μάρτυρας με τον αντιορρο του βακτηρίου προς ανίχνευση. Προχωρήσαμε στην ανάλυση των δεδομένων της ανίχνευσης του Cmm (στα φυτικά εκχυλίσματα) ανά φυτό με τη μέθοδο του ανοσοφθορισμού για τις εξής μεταβλητές:

α) η ανίχνευση του Cmm ανά φυτό και υπολογίστηκε η % εμφάνιση του Cmm (= (αριθμός φυτών με Cmm / συνολικός αριθμός φυτών) x100) ανά πειραματική ομάδα (block) και

β) η συγκέντρωση του Cmm (cfu/g νωπού βάρους) ανά φυτό και υπολογίστηκε η μέση τιμή ανά πειραματική ομάδα (block). Ακολούθως, για την επίτευξη της κανονικότητας των κατανομών, υπολογίστηκε ο δεκαδικός λογάριθμος (Log 10 cfu/g νωπού βάρους).

Στα δεδομένα εφαρμόστηκε η Ανάλυση Διασποράς (ANOVA) και η σύγκριση των μέσων όρων των επεμβάσεων έγινε με το τεστ των ομογενών υποομάδων (homogenous

subsets) Duncan ($P \leq 0.05$). Για την ανάλυση των δεδομένων χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πακέτο SPSS version 11.0 for Windows.



Εικόνα 2.4: Εμφάνιση βακτηριακών κυττάρων κατά την εξέταση με την μέθοδο ανοσοφθορισμού.

3^ο ΚΕΦΑΛΑΙΟ

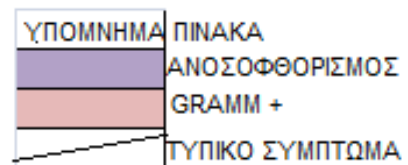
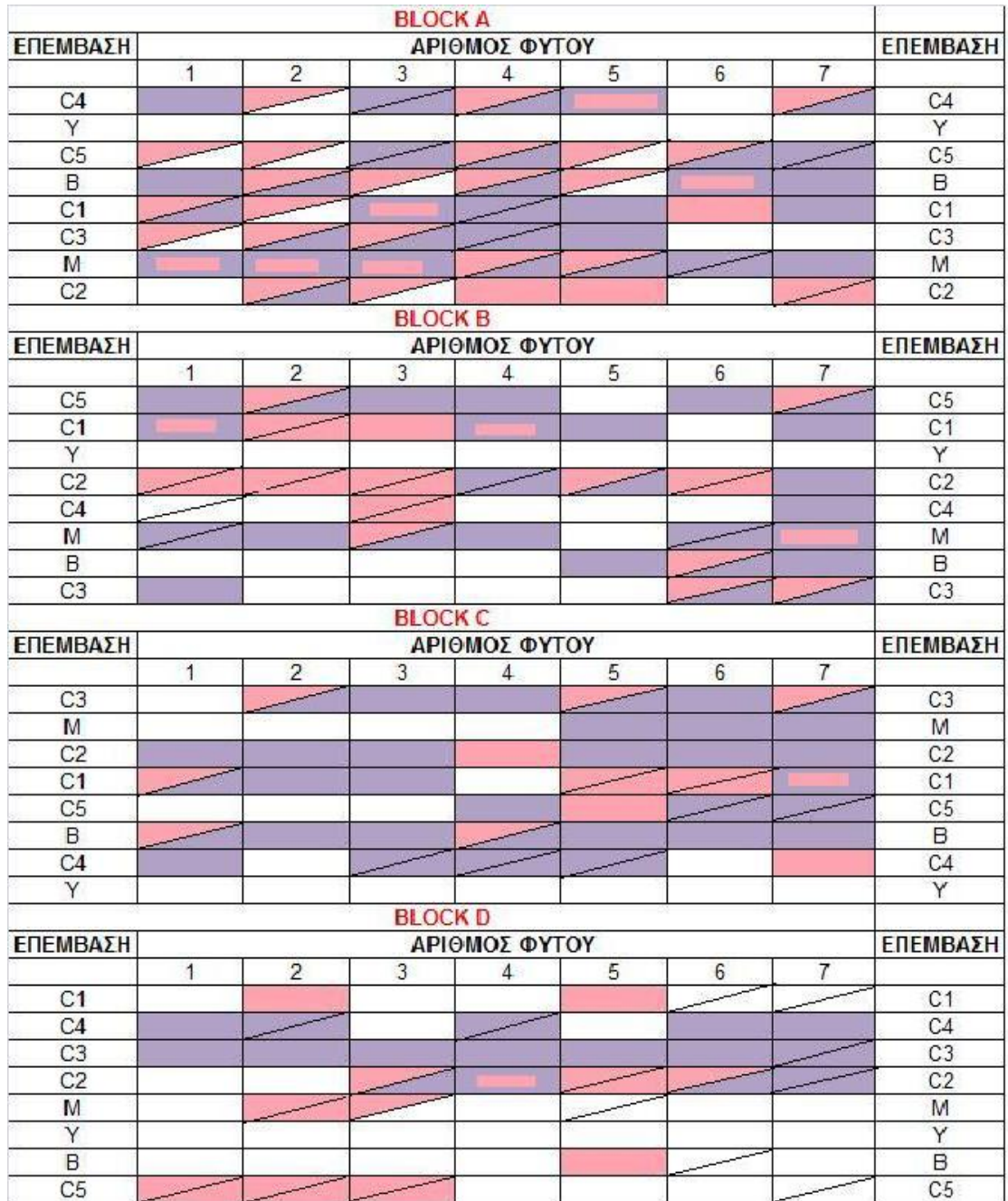
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

3.1 Αποτελέσματα επεμβάσεων

Από τον έλεγχο της παθογένειας προέκυψε ότι :

1. Όλα τα βακτηριακά στελέχη που εξετάστηκαν έδωσαν την τυπική αντίδραση υπερευαισθησίας, σε φύλλα φυτών δειλινού (νυχτολούλουδου *Miriabilis jalapa*), σε διάστημα 24-48 ωρών.
2. Επίσης πραγματοποιήθηκε έλεγχος παθογένειας όλων των βακτηριακών στελεχών με δυο διαφορετικούς τρόπους, με τη μέθοδο μολύνσεως με οδοντογλυφίδα και με ριζοπότισμα με βακτηριακό αιώρημα. Ανεξάρτητα από τη μέθοδο που χρησιμοποιήθηκε όλα τα μολύνθέντα φυτά εκδήλωσαν τα τυπικά συμπτώματα της ασθένειας του βακτηριακού έλκους της τομάτας, σε διάστημα 5-30 ημερών.

Η παρούσα μελέτη, διεξήχθη σε πειραματικό πλαστικό θερμοκήπιο στο ΤΕΙ Κρήτης την άνοιξη του 2012 μεταξύ 8/3 και 9/5. Το συγκεκριμένο θερμοκήπιο δεν διέθετε αυτόματο σύστημα άρδευσης, επομένως τόσο η άρδευση όσο και η λίπανση των φυτών κατά τη διάρκεια του πειράματος γίνονταν με το χέρι. Το γεγονός αυτό πιθανότατα συνέβαλε σημαντικά στην ανομοιόμορφη ανάπτυξη των φυτών, ανεξαρτήτως επέμβασης, που παρατηρήθηκε. Σε συνδυασμό και με τις ακραίες καιρικές συνθήκες που επεκράτησαν όπως θερμοκρασίες, ξηρός καιρός και χαμηλή σχετική υγρασία υπήρξε μεγάλη ανομοιογένεια στην εμφάνιση των συμπτωμάτων και προσβεβλημένα φυτά που παρέμειναν ασυμπτωματικά και τα δεδομένα των 3 εκτιμήσεων των συμπτωμάτων δεν ήταν δυνατό να αναλυθούν.



Σχεδιάγραμμα 2: Απεικόνιση των μολυσμένων φυτών με το τυπικό σύμπτωμα της ασθένειας στο θερμοκήπιο και φυτών στα οποία ανιχνεύτηκε με IF το Cmm.

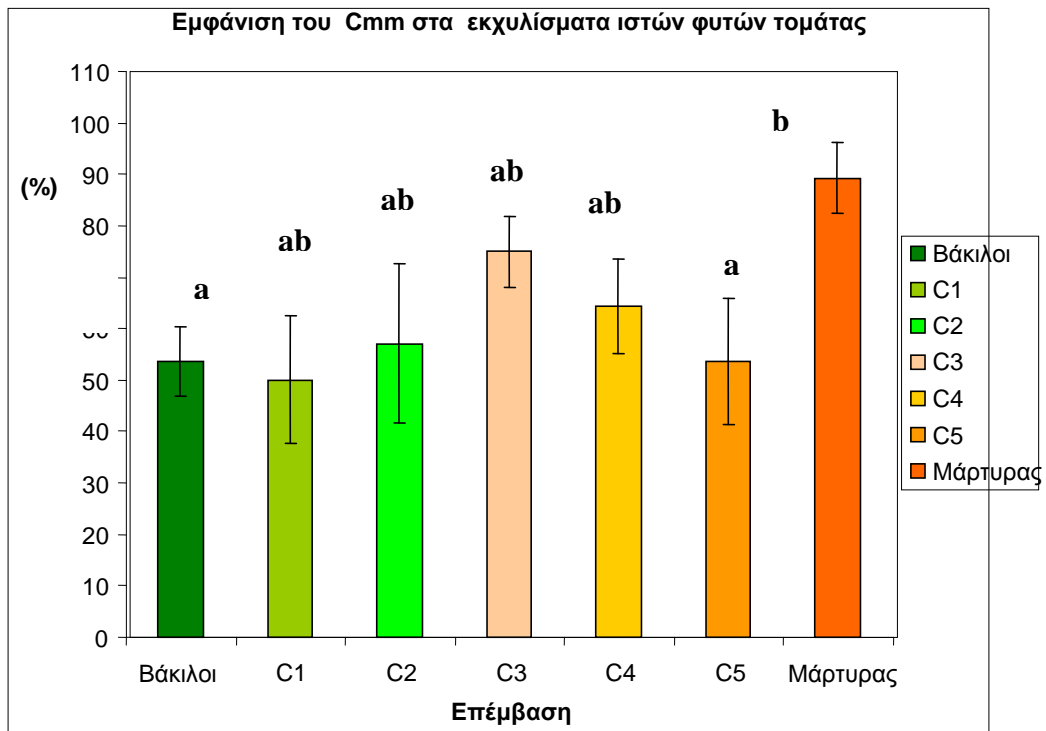
Επίσης πάλι λόγω μεγάλης ανομοιομορφίας εντός της κάθε επέμβασης δεν αναλύθηκαν τ' αποτελέσματα της μεθόδου του αποτυπώματος. Σε αυτή τη περίπτωση ίσως το πρόβλημα να προήλθε από το γεγονός ότι η διαδικασία πραγματοποιήθηκε αργά δηλαδή πάνω από 56 μέρες μετά τη τεχνητή μόλυνση, δηλαδή με το τέλος των υπολοίπων προγραμματισμένων μετρήσεων και όχι 1-6 μέρες μετά όπως συστήνουν οι Gitaitis et al. (1991).

Επομένως, πιθανότατα λόγω της καθυστέρησης αλλά και της μη ιδανικής ανάπτυξης κάποιων φυτών, μπορεί τα βακτηριακά κύτταρα να ήταν σε κατάσταση 'ζωντανή αλλά μη καλλιεργήσιμη' (Viable But Not Culturable-VBNC), που 'επάγεται από ξηρή ατμόσφαιρα, απουσία θρεπτικών στοιχείων, διάφορες χημικές επεμβάσεις κ.α που χρειάζονται μελέτη' όπως αναφέρεται απ' τους de Leon et al. (2011).

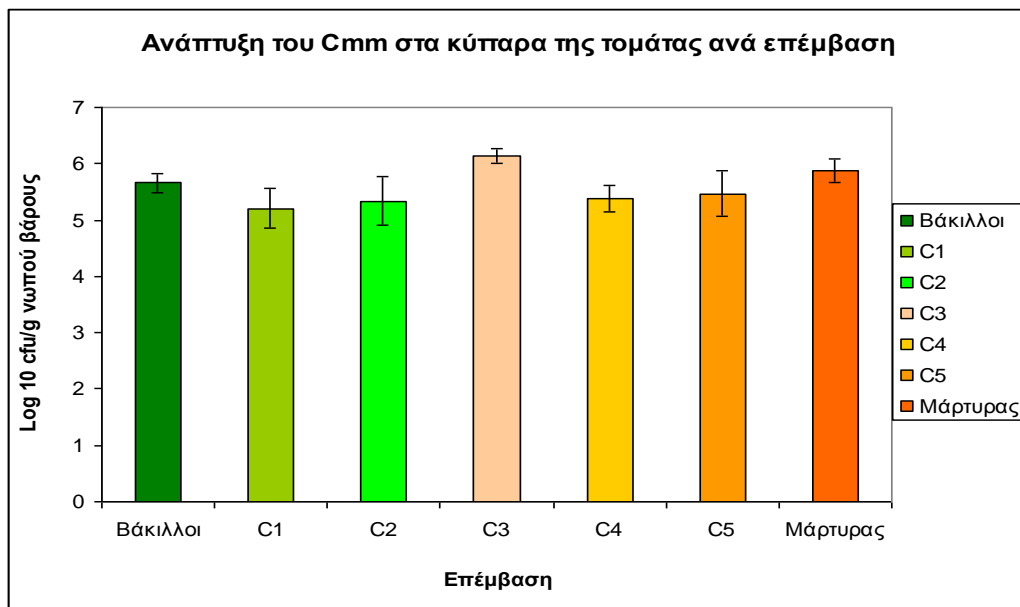
Παρά τις παραπάνω δυσκολίες κατέστη δυνατό να καταγραφεί η % εμφάνιση (% incidence) της ασθένειας με τη μέθοδο του ανοσοφθορισμού. Σύμφωνα με τ' αποτελέσματα του αμόλυντου μάρτυρα (0% εμφάνιση του Cmm-δεν παρουσιάζονται) δεν υπήρξαν επιμολύνσεις ή δευτερογενείς διασυστηματικές προσβολές μετά τη τεχνητή μόλυνση και ως το τέλος του πειράματος (σύνολο 56 ημερών).

Αντίθετα, η % εμφάνιση Cmm στο μολυσμένο μάρτυρα έφτασε το 90% επιβεβαιώνοντας ότι η τεχνητή μόλυνση ήταν επιτυχής. Στα φυτά του μη μολυσμένου μάρτυρα δεν ανιχνεύθηκε διασυστηματική προσβολή. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, οι επεμβάσεις με τα κόμποστ C1 και C5 και με τους βακίλους περιόρισαν σημαντικά κατά 39%, 35% και 35% αντίστοιχα, τη διασυστηματική εμφάνιση του Cmm ενώ τα κόμποστ C2, C3 και C4 δεν διέφεραν στατιστικά σημαντικά σε σύγκριση με τον μάρτυρα (εικόνα 1).

Όσον αφορά τη συγκέντρωση του πληθυσμού του Cmm, στους φυτικούς ιστούς καμία επέμβαση δεν διέφερε σημαντικά από τον μάρτυρα (εικόνα 2).



Εικόνα 1: Μέσες τιμές της % Εμφάνισης του *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* και τα τυπικά τους σφάλματα (S.E.) για τις διαφορετικές επεμβάσεις σε φυτά τομάτας στο θερμοκήπιο



Εικόνα 2: Μέσες τιμές της συγκέντρωσης (Log 10 cfu / g νωπού βάρους) του *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* και τα τυπικά τους σφάλματα (S.E.) για τις διαφορετικές επεμβάσεις σε φυτά τομάτας στο θερμοκήπιο

Από τις επεμβάσεις για το περιορισμό του παθογόνου, οι βάκιλλοι και τα κόμποστ C1 και C5 μείωσαν σημαντικά (μέχρι και 50%) την εμφάνιση της ασθένειας, ενώ τα υπόλοιπα κόμποστ δεν αποδείχθηκαν καλύτερα από τον μάρτυρα.

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων της συγκέντρωσης του πληθυσμού του Cmm ανά φυτό (cfu/g νωπού βάρους) δεν έδειξε σημαντικές διαφορές μεταξύ του μάρτυρα και των άλλων επεμβάσεων. Βέβαια τ' αποτελέσματα ίσως να ήταν διαφορετικά αν η συγκέντρωση καταγραφόταν από την αρχή της εμφάνισης των συμπτωμάτων και όχι στο τέλος του πειράματος όπως αναφέρεται και σε άλλες εργασίες (Gitaitis et al., 1991; Werner et al., 2002), καθώς μπορεί να υπήρχαν σημαντικές διαφορές στην αρχή της προσβολής που κατόπιν εξαλείφθηκαν.

Δεν διερευνήθηκε η δράση των επεμβάσεων κατά δευτερογενών τοπικών προσβολών του Cmm καθώς θεωρήθηκε ότι δεν υπήρξαν λόγω των δυσμενών καιρικών συνθηκών που επικράτησαν στο θερμοκήπιο κατά τη διάρκεια του πειράματος.

Η παρούσα εργασία μπορεί να προσέφερε περιορισμένα αποτελέσματα, έδειξε όμως ξεκάθαρα ότι η εφαρμογή κόμποστ και βακίλων για τον περιορισμό των διασυστηματικών προσβολών του εδαφογενούς Cmm είναι μια δυνατή μέθοδος καταπολέμησης που θα μπορούσε να συνδυαστεί και με άλλα, κυρίως προστατευτικά μέτρα κατά του βακτηριακού έλκους της τομάτας.

Στο μέλλον, θα άξιζε να επαναληφθεί το πείραμα αλλά με μερικές σημαντικές αλλαγές όπως: η εξασφάλιση της ομοιόμορφης ανάπτυξης των φυτών, ο μεγαλύτερος αριθμός φυτών ώστε να υπάρχουν πολλές δειγματοληψίες και όχι μια στη διάρκεια του πειράματος και τέλος η εφαρμογή της ανίχνευσης του Cmm όχι μόνο διασυστηματικά αλλά και επιφυτικά.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Amkraz, N., Boudyach E. H and Aoumar A. Ait Ben (2010) Screening for fluorescent pseudomonades, isolated from the rhizosphere of tomato, for antagonistic activity toward *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *World J Microbiol Biotechnol* 26, 1059–1065

Boudyach, E. H., Fatmi, M., Akhayat, O., Benizri, E. and Aoumar, Ait Ben, A. (2001) Selection of Antagonistic Bacteria of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* and Evaluation of Their Efficiency Against Bacterial Canker of Tomato. *Biocontrol Science and Technology* 11(1), 141-149

Chang, R.J., Ries, S.M., and Pataky, J.K. (1992). Effects of temperature, plant age, inoculum concentration and cultivar on incubation period and severity of bacterial canker of tomato. *Plant Disease* 76 (11), 1150-1155

Chang, R.J., Ries, S.M., and Pataky, J.K. (1992) Local sources of *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis* in the development of bacterial canker on tomatoes *Phytopathology* 82(5), 553-560.

De Leon, L., Siverio, F., Lopez, M.M. and Rodriguez, A. (2008) Comparative efficiency of chemical compounds for in vitro and in vivo activity against *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, the causal agent of tomato bacterial canker. *Crop Protection* 27, 1277-1283

De Leon, L., Siverio, F., Lopez, M.M. and Rodriguez, A. (2011) *Clavibacter michiganensis* subsp. *Michiganensis*, a seedborne tomato pathogen: Healthy seeds are still the goal. 1328-1338

De Leon, L., Siverio, F., Lopez, M.M. and Rodriguez, A. (2011) *Clavibacter michiganensis* subsp. *Michiganensis*, a seedborne tomato pathogen: Healthy seeds are still the goal, *Plant Disease* 95 (11),1330.

Gitaitis, R.D., Beaver R.W. and Voloudakis, A.E. (1991) Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in symptomless tomato transplants. *Plant Disease* 75 (8), 834-838

Gitaitis, R.D., Beaver R.W. and Voloudakis, A.E. (1995) Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomato transplants. In *Detection of Bacteria in Seed and Other Planting Material*, edited by A.W. Saettler, N.W. Schaad & D.A. Roth, St. Paul, Minnesota, APS Press.

Gleason M.L., Gitaitis , R.D. and Ricker, M.D. (1993) Recent Progress in Understanding and Controlling Bacterial Canker of Tomato in Eastern North America. *Plant Disease* 77 (11), 1069-1076

Kado C. 2010, Plant Bacteriology. APS press, St. Paul, Minnesota, USA, pp 13-135.

Kasselaki, A.M., Goumas, D. Tamm, L., Fuchs, J. Cooper, J., Leifert, C. (2011) Effect of alternative strategies for the disinfection of tomato seed infected with bacterial canker (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*). *NJAS - Wageningen Journal of Life Sciences* 58 145– 147.

Murtaza, N. (2009) Final Progress report. Available from: http://eprints.hec.gov.pk/3805/1/HEC_report-final.pdf. Accessed in July, 2012

Stackebrandl, E., Rainey, F., Ward-Rainey, N. 1997. Proposal for a new Hierarchic Classification System, Actinobacteria Classisnov. *Internatinal Journal of Systemic Bacteriology* 47(20 : 479-491.

Utkhede, R. and Koch, C., (2004) Biological treatments to control bacterial canker of greenhouse tomatoes. *BioControl* 49, 305–313

Werner, N. A., Fulbright, D. W., Podolsky, R., Bell, J. and Hausbeck, M. K. (2002) Limiting Populations and Spread of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* on Seedling Tomatoes in the Greenhouse *Plant Disease* 86 (5), 535-542

Yogev, A., Raviv, M., Kritzman, G., Hadar, Y., Cohen, R., Kirshner, B. and Katan, J. (2009) Suppression of bacterial canker of tomato by composts. *Crop Protection* 28, 97-103

Μπάγκης Ν., Γκούμας Δ.Ε., 2012. Βακτηριακό έλκος της τομάτας. Γεωργικές προειδοποιήσεις , τεχνικό Δελτίο, Δεκέμβριος 2012.(http://www.minagric.gr/images/stories/docs/nea/GEORGPPOEIDOPOIHSEIS/HRAKLEIO/arxeio_kriti2012.zip)

Παναγόπουλος, Γ.Χ.1992. Ασθένειες τομάτας. Εκδόσεις Σταμούλη, Αθήνα. σελ. 38-41