



ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ

Πτυχιακή Εργασία

**ΜΙΑ ΝΕΑ ΑΣΘΕΝΕΙΑ ΤΗΣ ΠΑΤΑΤΑΣ:
ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΠΑΘΟΓΟΝΟΥ ΑΙΤΙΟΥ**



ΣΤΑΥΡΟΥ Σ. ΔΕΣΠΟΙΝΑ
ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: Δρ. ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ ΓΚΟΥΜΑΣ
ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2011



ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ

Πτυχιακή Εργασία

ΜΙΑ ΝΕΑ ΑΣΘΕΝΕΙΑ ΤΗΣ ΠΑΤΑΤΑΣ: ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ
ΠΑΘΟΓΟΝΟΥ ΑΙΤΙΟΥ

ΣΤΑΥΡΟΥ Σ. ΔΕΣΠΟΙΝΑ
ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: Δρ. ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ ΓΚΟΥΜΑΣ
ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2011

*Αφιερωμένο στους γονείς
και τα αδέρφια μου...*

Πρόλογος

Με την ολοκλήρωση της εργασίας αυτής θα ήθελα να εκφράσω τις βαθύτατες ευχαριστίες μου στον εισηγητή μου Δρ. Δημήτρη Γκούμα, καθηγητή τόσο για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε αναθέτοντας μου τη παρούσα εργασία, όσο και για τη τεχνογνωσία που μου προσέφερε, καθώς και την ανεκτίμητη βοήθεια του στο πειραματικό μέρος όσο και στο θεωρητικό μέρος της πτυχιακής μου εργασίας.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τους φίλους μου για την ηθική τους συμπαράσταση. Τη σπουδάστρια Παγουλάτου Μαριάνθη για την άριστη συνεργασία μας.

Με εκτίμηση,
Δέσποινα Σταύρου

Περίληψη

Το νέο παθογόνο βακτήριο, με τη δόκιμη ονομασία *Dickeya solani*, φαίνεται να αποτελεί μία αναδυόμενη απειλή για την καλλιέργεια της πατάτας τα τελευταία χρόνια. Πρόκειται για συγγενικό είδος του βακτηρίου *D. dianthicola*. Το νέο πιο μολυσματικό στέλεχος του γένους *Dickeya* spp. έχει κάνει την εμφάνισή του τα τελευταία χρόνια και έχει εγκατασταθεί σε καλλιέργειες πατάτας σε διάφορες Ευρωπαϊκές χώρες αλλά και πρόσφατα το Ισραήλ. Το *Dickeya solani* είναι πολύ πιο μολυσματικό συγκριτικά με τα άλλα είδη του γένους *Dickeya* spp. (*dianthicola*, *zeae*, *dandantii*) και του *Pectobacterium atrosepticum* ή του *Pectobacterium carotovorum*. Το *Dickeya solani* είναι πιο μολυσματικό, πιθανά λόγω της ιδιαίτερης ικανότητας του να κινείται ταχύτερα στα αγγεία του φυτού. Τα συμπτώματα που προκαλεί το παθογόνο είναι παρόμοια με εκείνα της «μελάνωσης του λαιμού της πατάτας» και προσβάλλει σε υψηλότερες θερμοκρασίες. Στη διάρκεια του 2009-2011 πραγματοποιήθηκαν απομονώσεις στην Κρήτη, από φυτά πατάτας, τα οποία είχαν αναπτύξει τα τυπικά συμπτώματα της μελάνωσης του λαιμού της πατάτας. Από το βιοχημικό, φυσιολογικό, παθολογικό και μοριακό φαινότυπο των απομονωθέντων στελεχών προκύπτει ότι οι απομονώσεις του παθογόνου από την Κρήτη ταξινομούνται στη βιοποικιλία 3 του βακτηρίου *Dickeya* sp. Τα στελέχη της πατάτας βρέθηκαν να είναι βιοχημικά πανομοιότυπα με το ολλανδικό στέλεχος αναφοράς *Dickeya* sp. (IPO 2222), ενώ διαφοροποιούνται από το ελληνικό στέλεχος αναφοράς του *D. dianthicola* (BPIC 2098).

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

| | |
|--|----|
| ΕΙΣΑΓΩΓΗ..... | 1 |
| 1.1 Βακτηριολογικές ασθένειες της πατάτας..... | 2 |
| 1.2 Η νέα ασθένεια της πατάτας..... | 3 |
| 1.2.1 Συμπτώματα | 3 |
| 1.2.2 Στοιχεία επιδημιολογίας | 4 |
| 1.2.3 Σημασία της ασθένειας | 5 |
| 1.2.4 Αντιμετώπιση | 6 |
| 1.3 Βιβλιογραφική ανασκόπηση για το βακτήριο <i>Dickeya</i> sp. (σύμφωνα με Toth <i>et al.</i> , 2011) | 7 |
| 1.3.1 Το παθογόνο..... | 7 |
| 1.3.2 Συμπτωματολογία της ασθένειας μελάνωση του λαιμού της πατάτας | 10 |
| 1.4 Διάκριση από άλλες ασθένειες | 12 |
| ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ | 14 |
| 2.1 Υλικά και μέθοδοι..... | 15 |
| 2.1.1 Απομόνωση του παθογόνου | 15 |
| 2.1.2 Επιλογή στελεχών που χρησιμοποιήθηκαν στην εργασία | 15 |
| 2.2 Ταυτοποίηση του παθογόνου | 18 |
| 2.2.1 Εξέταση βιοχημικού φαινοτύπου και ταξινόμηση των απομονώσεων | 18 |
| 2.3 Δοκιμές παθογένειας | 19 |
| 2.3.1 Αντίδραση υπερευαισθησίας σε φυτά καπνού | 19 |
| 2.4 Τεχνητές μολύνσεις | 19 |
| 2.4.1 Μόλυνση σε φυτά τομάτας..... | 20 |
| 2.4.2 Μόλυνση σε κονδύλους πατάτας | 20 |
| 2.4.3 Τεχνητές μολύνσεις σε φύλλα σικορέ..... | 21 |

| | |
|--|----|
| 2.4.4 Τεχνητές μολύνσεις σε φυτά σε γλάστρες..... | 22 |
| 2.4.5 Τεχνητές μολύνσεις σε φυτό καλανχόης | 22 |
| 2.4.6 Τεχνητές μολύνσεις σε ρύζι..... | 22 |
| ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ..... | 23 |
| 3.1 Φαινοτυπική ταυτοποίηση των απομονώσεων της πατάτας ως <i>Dickeya</i> sp. | 24 |
| 3.2 Μελέτη του εύρους των ξενιστών..... | 25 |
| 3.2.1. Ανάπτυξη του παθογόνου σε διάφορες θερμοκρασίες | 27 |
| ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ | 32 |
| ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ | 34 |
| ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1..... | 38 |
| ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 2..... | 49 |

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Βακτηριολογικές ασθένειες της πατάτας

Τα σημαντικότερα βακτήρια που προσβάλλουν την πατάτα ταξινομούνται στα βακτηριακά γένη *Erwinia*, *Clavibacter*, *Ralstonia* και *Streptomyces*. Τα βακτήρια του γένους *Erwinia* spp. ευθύνονται συνήθως για ένα σύμπλοκο ασθενειών στη πατάτα γνωστές ως μελάνωση του λαιμού, σήψη στελέχους και κονδύλων και η υγρή σήψη στελέχους. Στις ασθένειες που προκαλούν, εμπλέκονται ανεξάρτητα ή συχνά σε συνδυασμό, τρία διαφορετικά είδη και υποείδη βακτηρίων, τα οποία προσβάλλουν όλα τα μέρη του φυτού, αναπτύσσονται σε διαφορετικές συνθήκες ενώ το αρχικό μόλυσμα του παθογόνου προέρχεται συνήθως από διαφορετικές πηγές μόλυνσης. Έτσι πολλές φορές είναι δύσκολο βασιζόμενοι μόνο στα συμπτώματα που προκαλούν, να διαπιστώσουμε ποιο βακτήριο εμπλέκεται στην κατά περίπτωση προσβολή. Γι αυτόν το λόγο η εργαστηριακή ταυτοποίηση του παθογόνου είναι σημαντική, αφού συχνά συνυπάρχουν δύο ή περισσότερα βακτήρια, ενώ τα συμπτώματα που προκαλούν, συνήθως, μοιάζουν με εκείνα άλλων παθογόνων της πατάτας.

Η ασθένεια που προκαλεί τη δακτυλιωτή σήψη της πατάτας ευθύνεται το βακτήριο *Clavibacter michiganensis* subsp. *Sepedonicus*. Η δακτυλιωτή σήψη της πατάτας διαπιστώθηκε το 1997 στην Κρήτη, αρχικά στην περιοχή του Οροπεδίου Λασιθίου και στη συνέχεια στις περιοχές Μαλίων και Μεσσαράς του Ν. Ηρακλείου. Η ασθένεια ενδημεί σε πολλές χώρες της Ευρώπης, της Αμερικής και της Ασίας. Το βακτήριο έχει αναφερθεί, σχεδόν, σε όλες τις χώρες που καλλιεργείται η πατάτα. Τα πιο χαρακτηριστικά συμπτώματα της ασθένειας εμφανίζονται στους κονδύλους είτε πριν είτε μετά τη συγκομιδή αλλά συνήθως κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης, όπου παρατηρείται νέκρωση και σήψη των αγγείων σε μορφή δακτυλίου. Ενώ τα συμπτώματα στο υπέργειο μέρος του φυτού παρατηρούνται σπάνια και η πιθανή εμφάνιση τους συμπίπτει συνήθως με το τέλος της καλλιέργειας, γεγονός που καθιστά δύσκολη τη διαφοροποίησή τους από τα συμπτώματα που προκαλούνται από άλλα αίτια.

Η καστανή σήψη της πατάτας προκαλείται από το βακτήριο *Ralstonia solanacearum*. Στην Ελλάδα το βακτήριο έχει αναφερθεί στη πατάτα (1957), στην τομάτα και στη μελιτζάνα (1985), στην Πελοπόννησο και στην τομάτα (1972) στην Κρήτη. Παρατηρείται μαρasmus στα κορυφαία φύλλα του φυτού στο αρχικό στάδιο της προσβολής. Σε συνθήκες υψηλών θερμοκρασιών ο μαρasmus εμφανίζεται κατά τη διάρκεια της ημέρας ενώ τη νύχτα τα φυτά αναλαμβάνουν. Γρήγορα η μάρανση γίνεται

μη αναστρέψιμη και οδηγεί στη σταδιακή, αλλά γρήγορη ξήρανση του φυτού. Τα αγγεία εμφανίζουν έντονο καστανό-μαύρο μεταχρωματισμό. Σε προχωρημένο στάδιο προσβολής, εγκάρσια τομή και ελαφριά συμπίεση στη βάση του στελέχους, μπορεί να προκαλέσει την έξοδο βακτηριακού εκκρίματος σε μορφή γλοιώδους σταγόνας. Στο κόνδυλο τα αρχικά συμπτώματα παρατηρούνται στη θέση πρόσφυσης του στολονίου. Έτσι αρχικά παρατηρείται καστανός μεταχρωματισμός των αγγείων όπου στη συνέχεια γίνεται μαύρος με αποτέλεσμα την επέκταση της μόλυνσης στους παρεγχυματικούς ιστούς του κονδύλου.

Η ασθένεια της ακτινομύκωσης προκαλείται από την παρουσία του βακτηρίου *Streptomyces scabies* και *Streptomyces acidiscabies*. Είναι μία συνηθισμένη ασθένεια των κονδύλων της πατάτας, όπου προκαλεί τρεις διαφορετικούς τύπους κηλιδώσεων στην επιδερμίδα του φλοιού της πατάτας. Συνήθως εκδηλώνονται ως ανώμαλες, υπερυψωμένες ή βυθισμένες, φελλώδεις κυκλικές, διαφόρων μεγεθών κηλιδώσεις χρώματος καφέ. Δηλαδή η ασθένεια της ακτινομύκωσης προκαλεί κυρίως την ποιοτική υποβάθμιση των παραγόμενων κονδύλων (Γκούμας κ.α., 2001).

1.2 Η νέα ασθένεια της πατάτας

1.2.1 Συμπτώματα

Τα συμπτώματα στο χωράφι είναι παρόμοια με εκείνα της μελάνωσης, που προκαλούνται από το *Pectobacterium atrosepticum*, αν και μπορεί να εμφανίζονται χρονικά, αργότερα κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας, ενώ συνήθως εκδηλώνονται όταν η θερμοκρασία έχει αυξηθεί. Συχνά, σε συνθήκες χαμηλής υγρασίας και υψηλής θερμοκρασίας, η μάρανση των φυτών είναι πολύ γρήγορη και συνοδεύεται από εκτεταμένη μαύρη, μαλακή σήψη και νέκρωση των εσωτερικών ιστών των στελεχών, ενώ η περιοχή της εντεριώνης μπορεί να εμφανίζεται κενή (κούφια).

Συμπερασματικά φαίνεται ότι η ασθένεια που προκαλείται από το *Dickeya* spp., σε ζεστές και υγρές συνθήκες, οδηγεί συνήθως σε σήψη στελέχους με συμπτώματα παρόμοια με εκείνα του *P. atrosepticum*, ενώ σε χαμηλότερα επίπεδα υγρασίας, παρατηρείται περιορισμένη σήψη, που όμως συνοδεύεται με μάρανση, με αυξημένη νέκρωση των ση φύλλων, καστανό μεταχρωματισμό του στελέχους, καθώς επίσης και από κούφιο στέλεχος. Τα συμπτώματα στους κονδύλους φαίνεται να μην διαφοροποιούνται από εκείνα του *P. atrosepticum* και μπορεί να κυμαίνονται μεταξύ

της εμφάνισης ενός ασθενούς καστανού μεταχρωματισμού του αγγειακού ιστού και της σήψης και της πλήρους αποδιοργάνωσης του. Στα όρια των σηπόμενων ιστών συχνά αναπτύσσονται καστανές μέχρι μαύρες χρωστικές, που συνήθως οριοθετούν την προσβολή.

Η αρχική προσβολή στους κονδύλους, ξεκινά από τα φακίδια, από τη θέση πρόσφυσης του στολονίου ή από πληγή ενώ η προκαλούμενη σήψη χαρακτηρίζεται ως εντονότερη, ταχύτερη και δριμύτερη σε σχέση με εκείνη που προκαλεί το *P. atrosepticum*. Τα παραπάνω συμπτώματα αλλά και ο έντονος καστανόμαυρος μεταχρωματισμός του αγγειακού ιστού ξεκινούν πάντα από το μολυσμένο μητρικό κόνδυλο, ο οποίος συνήθως σήπεται ως μη όφειλε. Στην περίπτωση που η προσβολή εκδηλωθεί πριν ή αμέσως μετά τη βλάστηση των φύτρων των κονδύλων, παρατηρείται έντονη ανομοιομορφία στο φυτόμα. Τα νεαρά στελέχη συχνά αποκτούν σκούρο πράσινο χρώμα, σταδιακά γίνονται χλωρωτικά, μαραίνονται και εμφανίζουν το σύμπτωμα της μελάνωσης στο λαιμό.

1.2.2 Στοιχεία επιδημιολογίας

Σύγχυση των συμπτωμάτων της ασθένειας στο υπέργειο τμήμα του φυτού μπορεί να γίνει με εκείνα άλλων ασθενειών (αδρομυκώσεις, αδροβακτηριώσεις) που εκδηλώνονται με μαράνσεις, ιδιαίτερα σε ξηροθερμικές συνθήκες (*Verticillium dahliae*), ενώ η προσβολή στους κονδύλους μερικές φορές μπορεί να μοιάζει με εκείνες της καστανής (*Ralstonia solanacearum*) και της δακτυλιωτής σήψης της πατάτας (*Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*).

Τα συμπτώματα μπορεί να ποικίλουν ανάλογα με την ευπάθεια ή την αντοχή της ποικιλίας, τη στράγγιση του εδάφους, τις επικρατούσες καιρικές συνθήκες (υγρασία, θερμοκρασία), την παρουσία αλλά και τη συγκέντρωση και την ταχύτητα αποικισμού και διασποράς του παθογόνου στον αγγειακό ιστό του φυτού. Για την πρόκληση μόλυνσης φαίνεται να απαιτούνται σημαντικά μικρότερες συγκεντρώσεις του βακτηρίου σε σχέση με άλλα συγγενικά παθογόνα. Την εκδήλωση της ασθένειας υποβοηθούν η πρόκληση πληγών κατά τη συγκομιδή και τις άλλες εργασίες, η υπερβολική υγρασία του εδάφους λόγω υπεράρδευσης κλπ. Μερικές φορές η μάρανση μπορεί να εκδηλωθεί χωρίς την εμφάνιση του συμπτώματος της μελάνωσης στο λαιμό των στελεχών, ενώ εκτιμάται ότι ποσοστό μεγαλύτερο του 20% των φυτών μπορεί να

εμφανίσει μάρανση σε περίπτωση που ο «πατατόσπορος» είναι μολυσμένος με το βακτήριο.

Συχνά η εκδήλωση της ασθένειας, ιδιαίτερα στις βόρειες ευρωπαϊκές χώρες, φαίνεται να συνδέεται με τη γενικότερη αλλαγή του κλίματος, την αύξηση της θερμοκρασίας και τις ηπιότερες, (πιο ξηροθερμικές), συνθήκες που επικρατούν τα τελευταία χρόνια στις περιοχές αυτές. Η θερμοκρασία αποτελεί τον πιο καθοριστικό παράγοντα αφού το *D. solani*, αναπτύσσεται σε υψηλές θερμοκρασίες μέχρι και 39°C στις οποίες εμφανίζεται πιο μολυσματικό σε σχέση το *Pectobacterium atrosepticum* και το *Dickeya dianthicola* που αποτυγχάνουν να προκαλέσουν ασθένεια σε αυτές τις συνθήκες.

Το παθογόνο αποτελεί μια νέα απειλή τόσο για τη σποροπαραγωγική, αλλά και για την καλλιέργεια πατάτας για φαγητό. Διασπείρεται σε μεγάλες αποστάσεις και ανάμεσα στα κράτη κυρίως με το μολυσμένο πολλαπλασιαστικό υλικό (κόνδυλος/πατατόσπορος με λανθάνουσες μολύνσεις), τα επιφανειακά νερά (ποτάμια, πηγάδια κλπ) και τα μηχανήματα. Το παθογόνο μεταφέρεται εξωτερικά στην επιφάνεια των κονδύλων, προστατεύεται στα φακίδια, αλλά συνήθως βρίσκεται εσωτερικά, στο αγγειακό σύστημα του κονδύλου, στο οποίο εισέρχεται διασυστηματικά δια μέσου του στολονίου από το προσβεβλημένο μητρικό φυτό ή δια μέσου των ριζών και σταδιακά αποικίζει το φυτό μέσω του αγγειακού του ιστού. Το βακτήριο δεν φαίνεται να επιβιώνει στο έδαφος για μεγάλο χρονικό διάστημα.

1.2.3 Σημασία της ασθένειας

Στο Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας-Βακτηριολογίας του ΤΕΙ Κρήτης, τα τρία τελευταία χρόνια, έχουν απομονωθεί, επανειλημμένα, βακτήρια του γένους *Dickeya* sp. από καλλιέργειες πατάτας στην πεδιάδα της Μεσσαράς και στις περιοχές Αγίας Βαρβάρας, Βενεράτου κ.α. στο νομό Ηρακλείου. Φυτά πατάτας που προσκομίσθηκαν στο εργαστήριο ή συλλέχθηκαν από προσβεβλημένες καλλιέργειες συνήθως εμφάνιζαν την παραπάνω περιγραφείσα συμπτωματολογία σε έντονη μορφή. Σύμφωνα με τους καλλιεργητές οι απώλειες ήταν μεγαλύτερες του 50% της αναμενόμενης παραγωγής σε δύο τουλάχιστον καλλιέργειες, έκτασης περίπου 20 στρεμμάτων. Όλα τα βακτηριακά στελέχη που απομονώθηκαν τα τελευταία χρόνια από ασθενή φυτά πατάτας από την Κρήτη βρέθηκαν κατά τον βιοχημικό αλλά και το μοριακό προσδιορισμό τους να είναι ταυτόσημα με τα στελέχη του παθογόνου που απομονώνονται σε άλλες ευρωπαϊκές

χώρες και ιδιαίτερα στην Ολλανδία, δηλαδή χαρακτηρίστηκαν ως μέλη του πιθανά νέου είδους *Dickeya solani*. Καλό είναι να γίνει αντιληπτό ότι, τα συμπτώματα από μόνα τους δεν αρκούν πάντα για να τον προσδιορισμό της αιτίας, που τα προκάλεσε αφού όμοια ή σχετικά παρόμοια συμπτώματα μπορεί να προκληθούν από τελείως διαφορετικά παθογόνα αίτια. Το *Dickeya solani* είναι ένα νέο παθογόνο και υπάρχουν ακόμα πολλά ερωτήματα που πρέπει να απαντηθούν σε σχέση με την επιδημιολογία και την αντιμετώπισή του.

1.2.4 Αντιμετώπιση

Η αντιμετώπιση της ασθένειας είναι πολύ δύσκολη και ουσιαστικά περιορίζεται στη χρησιμοποίηση υγιούς πολλαπλασιαστικού υλικού το οποίο πρέπει να έχει προκύψει μέσα από ένα αυστηρό σύστημα πιστοποίησης. Τα επίπεδα ανοχής στην εμφάνιση του συμπτώματος της μελάνωσης μετά από μακροσκοπικό έλεγχο, κατά τη διαδικασία παραγωγής του «πατατόσπορου», ποικίλει ανάμεσα στις ευρωπαϊκές χώρες και κυμαίνονται από 0 μέχρι και 4%, ανάλογα με το επίπεδο πιστοποίησης του. Σε κάθε περίπτωση ανεξάρτητα από την αυστηρότητα της διαδικασίας οι λανθάνουσες μολύνσεις είναι δυνατόν να διαφεύγουν της διαδικασίας αυτής. Η χρησιμοποίηση απολυμασμένων μηχανημάτων, εργαλείων και μέσων καλλιέργειας, συλλογής, αποθήκευσης και εμπορίας φαίνεται ότι αποτελεί σημαντικό παράγοντα στην αποφυγή δημιουργίας νέων εστιών μόλυνσης ή διασποράς του παθογόνου. Άλλες πηγές μόλυνσης μπορεί να παίζουν σημαντικό ρόλο για την ανάπτυξη της ασθένειας, όπως τα μολυσμένα φυτικά υπολείμματα, τα φυτά εθελοντές, οι εναλλακτικοί ξενιστές είτε πρόκειται για ζιζάνια ή για άλλα καλλιεργούμενα φυτά, το νερό άρδευσης, τα αερολύματα ή/και τα έντομα.

Αν αναλογιστούμε ότι περίπου το 80% του απαιτούμενου στη χώρα μας πατατόσπορου εισάγεται από τις χώρες, όπου τα τελευταία χρόνια το βακτήριο *Dickeya solani* δημιουργεί σημαντικά προβλήματα, σε συνδυασμό με το γεγονός ότι μεταφέρεται κυρίως με τον πατατόσπορο αλλά και το γεγονός ότι οι ξηροθερμικές κλιματολογικές συνθήκες στη χώρα μας είναι ιδανικές για το παθογόνο, η μαζική εισαγωγή μολυσμένου πολλαπλασιαστικού υλικού με λανθάνουσα ή μη μόλυνση από το βακτήριο μπορεί να οδηγήσει σε απρόβλεπτες απώλειες στην παραγωγή.

1.3 Βιβλιογραφική ανασκόπηση για το βακτήριο *Dickeya* sp.

(σύμφωνα με Toth *et al.*, 2011)

1.3.1 Το παθογόνο

Το 1917 το γένος *Erwinia* δημιουργήθηκε για να περιλάβει όλα τα μέλη των *Enterobacteriaceae* που είναι παθογόνα στα φυτά, συμπεριλαμβανομένων και των πηκτινολυτικών (π.χ. *Erwinia carotovora* και *E. chrysanthemi*) και των μη πηκτινολυτικών ειδών (*E. amylovora*). Το *Erwinia chrysanthemi* δημιουργήθηκε ως γένος από τον Burkholder *et al.* (1953) ως ένα παθογόνο του χρυσάνθεμου. Μεταγενέστερες μελέτες, κατέδειξαν ότι τα στελέχη του *E. chrysanthemi* προκαλούν ασθένειες σε μια μεγάλη ποικιλία ξενιστών, που περιλαμβάνουν 16 οικογένειες δικοτυλήδων σε 11 τάξεις και 10 μονοκοτυλήδων οικογενειών σε 5 τάξεις (Samson *et al.*, 2005., Ma *et al.*, 2007). Εξαιτίας του μεγάλου εύρους των ξενιστών του *E. chrysanthemi* οι Lelliott & Dickey. (1984), υποδιαίρεσαν τα είδη σε 6 παθοποικιλίες, δηλαδή *pvs chrysanthemi*, *dianthicola*, *dieffenbachia*, *paradisiaca*, *parthenii* και *zetae*, με βάση την εξειδίκευση του ξενιστή.

Αργότερα, οι Samson *et al.* (1987) ανέπτυξε ένα σύστημα διαφοροποίησης σε βιοποικιλίες βασισμένο σε κάποια σταθερά βιοχημικά χαρακτηριστικά. Αν και, ο Waldee (1945), πρότεινε την μεταφορά των πηκτινολυτικών *Erwiniae* σε ένα νέο γένος *Pectobacterium*, με βάση βιοχημικά τους χαρακτηριστικά, αυτό δεν πραγματοποιήθηκε μέχρι το 1998 όπου νέες ενδείξεις από την ανάλυση του 16S rDNA οδήγησαν στο να ευρέως αποδεκτό από την επιστημονική κοινότητα (Waldee 1945., Hauben *et al.*, 1998). Ενώ τα παθογόνα της πατάτας *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (syn. *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*) και *Pectobacterium atrosepticum* (syn. *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*), παρέμειναν σε αυτά τα γένη, περαιτέρω αναλύσεις του *Pectobacterium chrysanthemi*, χρησιμοποιώντας το 16S rDNA, DNA-DNA υβριδισμό και ο βιοχημικός χαρακτηρισμός, κατέδειξε ότι αποτελεί ένα ξεχωριστό κλάδο από τα *Pectobacteria*, και ένα νέο γένος, *Dickeya*, προτάθηκε (ονομασία που δόθηκε για τον διακεκριμένο μικροβιολόγο Robert S. Dickey). Το γένος *Dickeya* σήμερα, έχει διαχωριστεί σε 6 είδη που αντιστοιχούν μέχρι ενός σημείου στην ταξινόμηση σε επίπεδο παθοποικιλίας και βιοποικιλίας (Πίνακας 1) (Samson *et al.*, 2005). Εντούτοις, μέχρι αυτή τη μελέτη, νέα στελέχη του *Dickeya* που έχουν

απομονωθεί, δεν εμπίπτουν σε αυτά τα νέα 6 είδη και μπορεί περαιτέρω να αντιπροσωπεύουν νέα είδη του *Dickeya*.

Μια νέα ασθένεια της πατάτας: χαρακτηρισμός του παθογόνου αιτίου

Πίνακας 1. Νέα, παλιά ονοματολογία, και εύρος ξενιστών βακτηρίων που ανήκουν στο γένος *Dickeya* spp. προσαρμοσμένο από: Samson *et al.* (2005)

| Νέα ονοματολογία | Συνώνυμα (συμπεριλαμβανομένων και των βιοποικιλιών) | Ξενιστές |
|---|---|---|
| <i>Dickeya dianthicola</i> | <i>Erwinia chrysanthemi</i> βιοποικιλίες 1,7 & 9 <i>Erwinia chrysanthemi</i> pv. <i>dianthicola</i> <i>Pectobacterium chrysanthemi</i> pv. <i>dianthicola</i> | Γαρόφαλλο, πατάτα, τομάτα, chicory, αγκινάρα, ντάλια, καλαγχόη |
| <i>Dickeya dadantii</i> | <i>E. chrysanthemi</i> βιοποικιλία 3 (κάποια στελέχη) <i>P. chrysanthemi</i> βιοποικιλία 3 (κάποια στελέχη) | Πελαργόνιο, ανανάς, πατάτα, γαρόφαλλο, <i>Euphorbia</i> , γλυκοπατάτα, μπανάνα, καλαμπόκι, <i>Philodendron</i> , <i>Saintpaulia</i> |
| <i>Dickeya zeae</i> | <i>E. chrysanthemi</i> βιοποικιλία 8 και άλλα στελέχη της βιοποικιλίας 3 <i>P. chrysanthemi</i> βιοποικιλία 8 και άλλα στελέχη της βιοποικιλίας 3 | Καλαμπόκι, πατάτα, ανανάς, μπανάνα, καπνός, ρύζι, <i>Brachiaria</i> , χρυσάνθεμο |
| <i>Dickeya chrysanthemi</i> bv. <i>chrysanthemi</i> | <i>E. chrysanthemi</i> βιοποικιλία 5 <i>E. chrysanthemi</i> pv. <i>chrysanthemi</i> <i>P. chrysanthemi</i> pv. <i>chrysanthemi</i> | Χρυσάνθεμο, πατάτα, chicory, τομάτα, ηλιάνθος |
| <i>Dickeya chrysanthemi</i> bv. <i>parthenii</i> | <i>E. chrysanthemi</i> βιοποικιλία 6 <i>E. chrysanthemi</i> pv. <i>parthenii</i> <i>P. chrysanthemi</i> pv. <i>parthenii</i> | <i>Parthenium</i> , αγκινάρα, <i>Philodendron</i> |
| <i>Dickeya paradisiaca</i> | <i>E. chrysanthemi</i> βιοποικιλία 4 <i>E. chrysanthemi</i> pv. <i>paradisiaca</i> <i>E. paradisiaca</i> <i>Brenneria paradisiaca</i> | Μπανάνα, καλαμπόκι, πατάτα |
| <i>Dickeya dieffenbachiae</i> | <i>E. chrysanthemi</i> βιοποικιλία 2 <i>E. chrysanthemi</i> pv. <i>dieffenbachiae</i> <i>P. chrysanthemi</i> pv. <i>dieffenbachiae</i> | <i>Dieffenbachia</i> , τομάτα, μπανάνα |

1.3.2 Συμπτωματολογία της ασθένειας μελάνωση του λαιμού της πατάτας

Πριν τη νέα ταξινόμηση του βακτηρίου *Erwinia chrysanthemi* σε είδη εντός του γένους *Dickeya* ήταν ασαφές κατά πόσο τα συμπτώματα που προκαλούνται από το *Dickeya* sp. στην πατάτα ήταν παρόμοια με αυτά του *Pectobacterium atrosepticum* ή ήταν αρκετά διαφορετικά ώστε να επιτρέπουν την διάγνωση της ασθένειας. Πρόσφατη εργασία έδειξε ότι υπάρχουν τουλάχιστον δύο είδη του γένους *Dickeya* που προκαλούν αυτή την ασθένεια στην Ευρώπη (*D. dianthicola* και '*D. solani*'), με απομονώσεις από το καθένα που φαινομενικά δείχνουν μεγάλες διακυμάνσεις στην παθογένεια και στο άριστο της θερμοκρασίας ανάπτυξης (Laurila *et al.*, 2008., I. Toth, unpublished data). Παρατηρήσεις στην Ολλανδία δείχνουν ότι τα ίδια συμπτώματα μπορούν να προκληθούν από το *D. dianthicola*, το '*D. solani*' ή το *P. atrosepticum* (van der Wolf, & de Haan, NAK), όπως π.χ. τα τυπικά συμπτώματα της μελάνωσης. Εντούτοις, παρατηρήσεις από πειράματα στο χωράφι στην Φιλανδία, δείχνουν ότι τα συμπτώματα που προκαλούνται από το *Dickeya* sp., διαφέρουν από αυτά της μελάνωσης που προκαλούνται από το *P. atrosepticum* (Laurila *et al.*, 2010). Είναι λοιπόν πολύ πιθανόν ότι δεν υπάρχει μια απλή σχέση ανάμεσα στην συμπτωματολογία που εκδηλώνεται από τις απομονώσεις του *P. atrosepticum* και του *Dickeya* spp., αλλά ότι πιθανά υπάρχει ένα εύρος συμπτωμάτων που εξαρτάται από τα είδη, την απομόνωση, τις συνθήκες περιβάλλοντος, ακόμη και την ποικιλία που εμπλέκεται.

Συμπερασματικά προκύπτει ότι η ασθένεια που προκαλείται από το *Dickeya* sp., σε ζεστές και υγρές συνθήκες, οδηγεί συνήθως σε σήψη στελέχους με συμπτώματα παρόμοια με εκείνα του *P. atrosepticum*, ενώ σε χαμηλότερα επίπεδα υγρασίας, παρατηρήθηκε περιορισμένη σήψη που όμως συνοδεύεται με μάρανση, με αυξημένη νέκρωση των ση φύλλων, καστανό μεταχρωματισμό του στελέχους (browning), καθώς επίσης και από κούφιο στέλεχος (Lumb *et al.*, 1986., De Vries, 1990., Palacio-Bielsa *et al.*, 2006., Tsoar *et al.*, 2009).

Τα συμπτώματα της μαλακής σήψης στους κονδύλους της πατάτας όπως περιγράφονται από τους Powelson & Franc (2001), φαίνεται να είναι παρόμοια, είτε προκαλούνται από το *Dickeya* είτε από το *Pectobacterium* spp. Η μαλακή σήψη των κονδύλων μπορεί να κυμαίνεται από ελαφρύ αποχρωματισμό του αγγειακού ιστού έως και την πλήρη αποσύνθεση. Οι μολυσμένοι ιστοί του κονδύλου εμφανίζουν κρεμ προς καστανό/μαύρο χρώμα και είναι μαλακοί και κοκκώδεις. Καφέ προς μαύρες χρωστικές συχνά αναπτύσσονται στα περιθώρια του αποσυντιθέμενου ιστού. Οι προσβολές πρώτα

αναπτύσσονται στα φακίδια, στη θέση πρόσφυσης του στολονίου ή στις πληγές. Πρόσφατη εργασία έδειξε ότι το *Dickeya* sp. ειδικά σε υψηλότερες θερμοκρασίες (27⁰C) προκαλεί εντονότερη σήψη από το *P. atrosepticum* και είναι πιο πιθανόν να παράγει μια κρεμώδη και τυρώδη σήψη.

Τα συμπτώματα του φυλλώματος που συνήθως στην Ευρώπη και το Ισραήλ συνδέονται με το *D. dianthicola*, εκδηλώνονται σε ξηροθερμικές συνθήκες ανάπτυξης (Lumb *et al.*, 1986., Tsgor *et al.*, 2009). Το πρώτο σύμπτωμα είναι η μάρανση στα ανώτερα φύλλα που συνοδεύεται από ξήρανση των άκρων και τελικά ολόκληρων των φύλλων. Τα συμπτώματα αυτά σταδιακά γίνονται ορατά στα κατώτερα φύλλα και σε ακραίες περιπτώσεις ολόκληρο το φυτό ή το στέλεχος νεκρώνεται. Συχνά μόνο ένα στέλεχος ανά φυτό προσβάλλεται. Η ανάπτυξη των συμπτωμάτων συνήθως σχετίζεται με την μαλακή σήψη του μητρικού κονδύλου, χωρίς όμως να επεκτείνονται πάντα μέχρι το στολόνιο ή το στέλεχος εξωτερικά ή εσωτερικά όπως έχει παρατηρείται στην περίπτωση της μελάνωσης που προκαλείται από το *P. atrosepticum*. Οι αγγειακοί ιστοί μεταχρωματίζονται καστανοί από την βάση του στελέχους προς τα πάνω και συχνά νεκρώνονται ενώ το στέλεχος γίνεται κούφιο. Εξωτερικά, τα στελέχη του φυτού συνήθως παραμένουν πράσινα μέχρι να ολοκληρωθεί η ξήρανση των φύλλων. Σε ζεστές και ξηρές συνθήκες, συνήθως τα συμπτώματα πρωτοεμφανίζονται όταν η θερμοκρασία του αέρα υπερβαίνει τους 25⁰C (Lumb *et al.*, 1986).

Άλλα είδη του *Dickeya* sp. (*D. dadantii* and *D. zaeae*), που γενικά απομονώνονται από πατάτα σε θερμότερες και υγρές τροπικές και υποτροπικές περιοχές, προκαλούν συμπτώματα που είναι δυσδιάκριτα από αυτά των ασθενειών της μελάνωσης που προκαλούνται από το *P. atrosepticum* σε ψυχρότερα κλίματα (Cothier, 1980., DeLindo&French, 1981). Τα φυτά που προσβάλλονται από αυτά τα βακτήρια εμφανίζουν μάρανση, νανισμό και χλώρωση και καστανή προς μαύρη μαλακή σήψη στη βάση του στελέχους, που επεκτείνεται προς τα πάνω από τον σηπόμενο μητρικό κόνδυλο, και με ενδεχόμενη πλήρη κατάρρευση του φυτού. Αν η ασθένεια υπεισέλθει πριν ή αμέσως μετά το φύτεμα τότε εκδηλώνεται με ως αποτυχία φυτρώματος. Σε περιοχές με χαμηλές θερμοκρασίες, η μόλυνση συχνά ξεκινάει με σκούρο χρωματισμό στα ανώτερα φύλλα που ακολουθείται με χλώρωση και μάρανση. Όσο η ασθένεια προχωράει, το στέλεχος μαραίνεται ή εμφανίζονται τα συμπτώματα της μελάνωσης. Η μόλυνση του φυλλώματος και συχνά η καταστροφή της καλλιέργειας προκαλείται μετά από έντονη βροχόπτωση, χαλάζι, έντομα ή ανθρώπινες δραστηριότητες που μπορεί να

έχουν σαν αποτέλεσμα τις σήψεις των στελεχών και του φυλλώματος στο υπέργειο τμήμα του φυτού του στελέχους (van der Wolf & De Boer, 2007). Αντί για μαλακή σήψη εκτεινόμενη από την βάση του στελέχους, εξωτερικά συμπτώματα συχνά εμφανίζονται ψηλότερα στο φυτό. Αυτά τα φυτά, αναπτύσσουν ραγδαία εκτεταμένη σήψη στελέχους από την βάση τους, αλλά εξωτερικά η βάση του στελέχους εμφανίζεται υγιής. Το *Dickeya solani*, συνήθως προκαλεί σήψη των αναπτυσσόμενων θυγατρικών κονδύλων (progeny tubers) στο χωράφι, ειδικά κάτω από θερμές συνθήκες ανάπτυξης.

1.4 Διάκριση από άλλες ασθένειες

Ενώ οι ασθένειες μελάνωσης και μαλακής σήψης που προκαλούνται από το *Pectobacterium* spp. στη τυπική τους συμπτωματολογία είναι εύκολα διακριτές από άλλες ασθένειες της πατάτας, τα συμπτώματα που προκαλούνται από τα βακτήρια *D. dianthicola* ή το *D. solani*, κάτω από ξηροθερμικές συνθήκες, μπορεί να συγχέονται με εκείνα άλλων ασθενειών που προκαλούν μαράνσεις. Στο Ισραήλ, τα συμπτώματα που προκαλούνται από το *Dickeya* sp. ήταν δυσδιάκριτα από την μάρανση που προκαλείται από το *Verticillium dahliae* ή από εκείνα που προκαλούνται από φυσική γήρανση των φυτών (Lumb *et al.*, 1986). Τα συμπτώματα στους κονδύλους που προκαλούνται από το *Dickeya* sp. μπορεί επίσης να συγχέονται με αυτά άλλων βακτηριολογικών ασθενειών της πατάτας, όπως της καστανής σήψης, που προκαλείται από το *Ralstonia solanacearum* και της δακτυλιωτής σήψης που προκαλείται από το *Clavibacter michiganensis* subsp. *Sepedonicus*. Σε μερικές περιπτώσεις το *D. solani*, φαίνεται να προκαλεί μεταχρωματισμό και/ή σήψη του αγγειακού δακτυλίου στους θυγατρικούς κονδύλους προσβεβλημένων φυτών.

Σκοπός της μελέτης

Σκοπός της εργασίας αυτής, είναι η μελέτη μιας πρωτοεμφανιζόμενης ασθένειας της πατάτας στην Ελλάδα, με την απομόνωση και την ταυτοποίηση του παθογόνου αιτίου και την εκπλήρωση των αρχών του Koch, στα στελέχη του παθογόνου που απομονώθηκαν από δείγματα προερχόμενα από διάφορες περιοχές καλλιέργειας του φυτού στην Κρήτη.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1 Υλικά και μέθοδοι

2.1.1 Απομόνωση του παθογόνου

Τη διάρκεια 2009-2011 πραγματοποιήθηκαν απομονώσεις από φυτά πατάτας που είχαν αναπτύξει τα τυπικά συμπτώματα της ασθένειας μελάνωση του λαιμού. Τα φυτά προσκομίστηκαν στο εργαστήριο Φυτοπαθολογίας του Τ.Ε.Ι. Κρήτης από διάφορες περιοχές του Νομού Ηρακλείου (Μεσσαρά, Βενεράτο, Αγία Βαρβάρα). Τμήματα των προσβεβλημένων ιστών της πατάτας (στελέχη και κόνδυλοι) αφαιρέθηκαν ασηπτικά και τεμαχίστηκαν σε 2ml απεσταγμένου και αποστειρωμένου νερού.

Ποσότητα 20μl από το αιώρημα που δημιουργήθηκε, απλώθηκε σε τριβλία που περιείχαν θρεπτικό υπόστρωμα NAG με τη μέθοδο της διασποράς και επώαστηκε στους 27°C για 24 - 48 ώρες. Οι επικρατέστερες αποικίες που παρατηρήθηκαν από τις απομονώσεις και εμφάνιζαν το χαρακτηριστικό φαινότυπο του «τηγανητού αυγού» (Εικόνα 37), υποκαλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα NAG μέχρι να δημιουργηθεί καθαρή καλλιέργεια. Οι απομονώσεις που επιλέχθηκαν διατηρήθηκαν σε υλικό συλλογής στους 4°C σε όλη τη διάρκεια της εργασίας ή/ και σε -80°C σε υδατικό διάλυμα γλυκερίνης 30% (v/v).

2.1.2 Επιλογή στελεχών που χρησιμοποιήθηκαν στην εργασία

Προκαταρκτικά τα στελέχη που απομονώθηκαν εξετάστηκαν ως προς την αντίδραση υπερευαισθησίας στον καπνό, τη πηκτινόλυση, τη δοκιμή αναεροβίωσης, την παραγωγή φωσφατάσης και ινδόλης. Με βάση τις δοκιμές αυτές ταυτοποιήθηκαν ως μέλη του γένους *Dickeya* sp. (συν. *Erwinia chrysanthemi*, *Pectobacterium chrysanthemi*). Δέκα εννέα (19) βακτηριακά στελέχη από τις παραπάνω απομονώσεις συμπεριλήφθηκαν στην εργασία αυτή. Συγκριτικά σε όλες τις δοκιμές χρησιμοποιήθηκαν τα στελέχη *Dickeya solani* IPO 2222 (Van der Wolf, 2007) και το BPIC 2098 *Erwinia chrysanthemi* pv. *dianthicola* (από καλλιέργεια πατάτας Νομός Δράμας, Α. Αλιβιζάτος, 1994).

Επίσης στην εργασία χρησιμοποιήθηκαν συγκριτικά βακτηριακές απομονώσεις οι οποίες προκαταρκτικά είχαν ταυτοποιηθεί ως μέλη των γενών *Dickeya* (*Erwinia*) spp. και *Pectobacterium carotovorum* και *Pectobacterium atrosepticum*, από τη συλλογή του εργαστηρίου Φυτοπαθολογίας του Τ.Ε.Ι. Κρήτης, από διάφορα φυτά (πατάτα,

τομάτα, πιπεριά, αγκινάρα, κουνουπίδι, μπανάνα, καλαμπόκι, ποινσέτια, υάκινθου και Ουασικτόνια). Τα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν αναφέρονται αναλυτικά στον Πίνακα 2.

Πίνακας 2. Βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη

| ΒΑΚΤΗΡΙΟ | ΚΩΔΙΚΟΣ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ | ΞΕΝΙΣΤΗΣ |
|--|-------------------|-------------|
| <i>Dickeya solani</i> | IP0 2222* | Πατάτα |
| <i>Dickeya dianthicola</i> | BPIC 2098** | Πατάτα |
| <i>Pectobacterium</i> sp. | TEIC 3357 | Τομάτα |
| | TEIC 3366 | Τομάτα |
| | TEIC 3370 | Τομάτα |
| | TEIC 3371 | Τομάτα |
| | TEIC 3372 | Τομάτα |
| | TEIC 3373 | Ουασικτόνια |
| | TEIC 3374 | Ουασικτόνια |
| | TEIC 3375 | Ουασικτόνια |
| | TEIC 3376 | Ουασικτόνια |
| | TEIC 3377 | Ουασικτόνια |
| | TEIC 624 | Πυπεριά |
| | TEIC 626 | Πυπεριά |
| | TEIC 627 | Πυπεριά |
| | TEIC 3738 | Υάκινθος |
| Απομονώσεις από πατάτα | Ds 3378 | Πατάτα |
| | Ds 3383 | Πατάτα |
| | Ds 3385 | Πατάτα |
| | Ds 3386 | Πατάτα |
| | Ds 3387 | Πατάτα |
| | Ds 3388 | Πατάτα |
| | Ds 3389 | Πατάτα |
| | Ds 3390 | Πατάτα |
| | Ds 3391 | Πατάτα |
| | Ds 3392 | Πατάτα |
| | Ds 3393 | Πατάτα |
| | Ds 3394 | Πατάτα |
| | Ds 3395 | Πατάτα |
| | Ds 3396 | Πατάτα |
| | Ds 3397 | Πατάτα |
| | Ds 3398 | Πατάτα |
| | Ds 3399 | Πατάτα |
| | Ds 3400 | Πατάτα |
| | Ds 3401 | Πατάτα |
| Επαναπομονώσεις από τεχνητές μολύνσεις | TEIC 3402 | Καλαμπόκι |
| | TEIC 3403 | Γαρύφαλλο |
| | TEIC 3404 | Ποινσέτια |
| | TEIC 3405 | Ποινσέτια |
| <i>Pectobacterium carotovorum</i> | TEIC 3036 | Μπανάνα |
| | TEIC 3048 | Τομάτα |
| | TEIC 3080 | Αγκινάρα |
| | TEIC 3733 | Κουνουπίδι |
| | TEIC 3735 | Πατάτα |
| | TEIC 3736 | Πατάτα |
| | TEIC 3737 | Ζάμια |
| <i>Pectobacterium atrosepticum</i> | TEIC 3201 | Πατάτα |
| | TEIC 3205 | Πατάτα |
| | TEIC 3211 | Πατάτα |
| | TEIC 3217 | Πατάτα |
| | TEIC 3221 | Πατάτα |

* International Plant Research, ** Benaki Phytopathological Institute Collection

2.2 Ταυτοποίηση του παθογόνου

2.2.1 Εξέταση βιοχημικού φαινοτύπου και ταξινόμηση των απομονώσεων

Η αναλυτική ταυτοποίηση επιλεγμένων απομονώσεων του βακτηρίου πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με την τυποποιημένη μεθοδολογία που ακολουθείται στο εργαστήριο Βακτηριολογίας του ΤΕΙ Κρήτης και περιγράφεται από τους Schaad *et al.* (2001) και Goumas, 1987. Επιπλέον δοκιμές πραγματοποιήθηκαν για την ταυτοποίηση των απομονώσεων σε επίπεδο είδους, υποείδους και παθοποικιλίας σύμφωνα με την παρακάτω μεθοδολογία:

Χρησιμοποιήθηκαν οι ακόλουθες δοκιμές, παραγωγή ινδόλης από τρυπτοφάνη (Εικόνα 32 και 33), παραγωγή φωσφατάσης (Εικόνα 35), ευαισθησία στην ερυθρομυκίνη σε 15μl/δισκίο και υδρόλυση λεκιθίνης (Εικόνα 34). Οι απομονώσεις εξετάστηκαν χρησιμοποιώντας τη δοκιμή σε πλάκες μικροτιτλοδότησης όπως περιγράφεται στο Palacio-Bieca *et al.* (2006) στις παρακάτω δοκιμές ανάπτυξη στους 37⁰C, 39⁰C, 41⁰C και 25⁰C (μάρτυρας) σε Nutrient broth, αναερόβια διάσπαση αργινίνης, χρησιμοποίηση ινούλινης. Επίσης δέκα έξι (16) πηγές άνθρακος δοκιμάστηκαν για την αλκαλίωση ή την οξίνιση σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα Ayers (Ayers *et al.*, 1919) με bromothymol blue, σε τελική συγκέντρωση 0,3% : methyl α-β glycoside, D(+) melibiose, L(+) tartate, inoulin, malonate, D- tartate, meso tartate, D(-) arabinose, D(+) trehalose, manitol, D + raffinose, lactose, D- sorbitol, myo-inositol. Τα διαφορετικά βασικά θρεπτικά υποστρώματα (150μl) διανεμήθηκαν στις κυψελίδες αποστειρωμένης πλάκας μικροτιτλοδότησης (Costar, EIA/RIA Plate, 96 Well) και εμβολιάστηκαν με 15μl βακτηριακού αιωρήματος συγκέντρωσης 10⁸ βακτηριακά κύτταρα/ml από κάθε στέλεχος προς ανάλυση τοποθετήθηκε ανά κυψελίδα (Εικόνα 36). Οι κυψελίδες που περιέχουν αργινίνη και γλυκόζης καλύφθηκαν από μία στρώση 100 μl αποστειρωμένης παραφίνης για τη δημιουργία αναερόβιων συνθηκών. Οι πλάκες μικροτιτλοδότησης αφού τοποθετήθηκε το κάλυμμα τοποθετήθηκαν σε σακούλες πολυαιθυλενίου και επώαστηκαν στους 26⁰C για 5 μέρες. Παρατηρήσεις λαμβανόταν κάθε 24h. Οι δοκιμές επαναλήφθηκαν τρεις φορές σε διαφορετικές πλάκες μικροτιτλοδότησης. Το σύνολο των δοκιμών αναφέρεται στο Πίνακα 3.

2.3 Δοκιμές παθογένειας

2.3.1 Αντίδραση υπερευαισθησίας σε φυτά καπνού

Η αντίδραση υπερευαισθησίας πραγματοποιήθηκε σε φυτά καπνού ποικιλίας Xanthi με σκοπό την προκαταρκτική διαπίστωση της παθογένειας των απομονώσεων. Από τις απομονώσεις σχηματίστηκαν αιωρήματα, συγκέντρωσης 10^8 c.f.u./ml [colony forming units] σε απεσταγμένο και αποστειρωμένο νερό με τη βοήθεια αποστειρωμένης οδοντογλυφίδας. Έπειτα με τη χρήση σύριγγας εμβολιάστηκαν φύλλα καπνού με το παραπάνω αιώρημα. Αφού το φυτό καπνού ψεκάστηκε με νερό κλείστηκε σε πλαστική σακούλα, ώστε να δημιουργηθούν οι κατάλληλες συνθήκες υγρασίας για την εκδήλωση της αντίδρασης, η οποία εκτιμήθηκε σε διάστημα 24-48 ωρών σε θερμοκρασία 22-27°C. Παρατηρήθηκε μόλυνση στο σημείο εισόδου του βακτηριακού αιωρήματος ή η εξέλιξή της, σε διασυστηματική μόλυνση του καπνού και όχι η εκδήλωση τυπικής αντίδρασης υπερευαισθησίας.

2.4 Τεχνητές μολύνσεις

Πραγματοποιήθηκαν τεχνητές μολύνσεις σε φυτά τομάτας (*Lycopersicon esculentum*), καπνού (*Nicotiana tabacum*), καλαμποκιού (*Zea mays*), χρυσάνθεμου (*Chrysanthemum sp.*), γαρυφαλλιάς (*Dianthus caryophyllus*), πελαργόνιου (*Pelargonium sp.*), διφεμπάχιας (*Dieffenbachia sp.*), αλεξανδρινού (*Euphorbia pulcherrima*), πιπεριάς (*Capsicum annum*), μελιτζάνας (*Solanum melanogena*), κατιφέ (*Tagetes erecta*), καλανχόης (*Kalanchoe daigremontiana*) και μπανάνας (*Musa canvendich*). Η μόλυνση έγινε με την εισαγωγή μολύσματος από καλλιέργεια του αντίστοιχου βακτηρίου με αποστειρωμένη οδοντογλυφίδα ή/και με 15μl βακτηριακού αιωρήματος συγκέντρωση περίπου 10^7 cfu/ml. Στη συνέχεια οι θέσεις εμβολιασμού καλύφθηκαν με parafilm. Επιπλέον μολύνθηκαν καρποί τομάτας (*Lycopersicon esculentum*), κόνδυλοι και ροδέλες, πατάτας (*Solanum tuberosum*) και ροδέλες γλυκοπατάτας (*Ipomoea batatas*) καθώς και φύλλα σικορέ (*Cichoroum intybus*) με την εισαγωγή του βακτηρίου με αποστειρωμένη οδοντογλυφίδα. Η επώαση πραγματοποιήθηκε σε διάφανα δοχεία και παρατηρήσεις λαμβάνονταν για επτά ημέρες. Επίσης μολύνθηκε πατατόσπορος με τη βοήθεια σύριγγας με βακτηριακό αιώρημα.

2.4.1 Μόλυνση σε φυτά τομάτας

Η μόλυνση πραγματοποιήθηκε σε φυτά (*Lycopersicon esculentum*) και σε καρπούς τομάτας με σκοπό τη διαπίστωση της παθογένειας των απομονώσεων. Η μόλυνση στα φυτά τομάτας έγινε με αποστειρωμένη οδοντογλυφίδα. Μικροποσότητα του παθογόνου από καλλιέργεια των αντίστοιχων απομονώσεων εισήχθη στο στέλεχος φυτών τομάτας, ευρισκόμενα στο στάδιο ανάπτυξης των 3-4 πραγματικών φύλλων. Η θέση της μόλυνσης καλύφθηκε με parafilm και τα φυτά τοποθετήθηκαν σε θάλαμο ανάπτυξης με κατάλληλες συνθήκες υγρασίας (85% RH) και θερμοκρασίας (26⁰C) για την εκδήλωση της μόλυνσης (σήψη), η οποία εκτιμήθηκε σε διάστημα μίας εβδομάδας. Στους καρπούς της τομάτας η μόλυνση έγινε με αποστειρωμένη οδοντογλυφίδα σε μη ώριμους καρπούς, οι οποίοι μετά τη μόλυνση τοποθετήθηκαν σε διάφανα δοχεία σε κατάλληλες συνθήκες υγρασίας (85% RH) και θερμοκρασίας (26⁰C) για την εκδήλωση της μόλυνσης (σήψη), η οποία εκτιμήθηκε για διάστημα μίας εβδομάδας.

2.4.2 Μόλυνση σε κόνδύλους πατάτας

Οι τεχνητές μολύνσεις πατάτας (*Solanum tuberosum*) πραγματοποιήθηκαν με διάφορες μεθοδολογίες:

1) Ροδέλες πατάτας, η μόλυνση πραγματοποιήθηκε σε ροδέλες πατάτας και γλυκοπατάτας (*Ipomoea batatas*) με σκοπό την προκαταρκτική διαπίστωση της παθογένειας των απομονώσεων. Αφού έγινε πλύσιμο με σαπούνι και εξωτερική απολύμανση των κόνδύλων της πατάτας με οινόπνευμα και αφαίρεση του φλοιού ασηπτικά, οι κόνδυλοι τεμαχίστηκαν σε ροδέλες και τοποθετήθηκαν σε τριβλία Petri, στα οποία είχε τοποθετηθεί αποστειρωμένο απορροφητικό χαρτί εμποτισμένο σε αποστειρωμένο και απεσταγμένο νερό.

Σε κάθε ροδέλα πατάτας με τη βοήθεια αποστειρωμένης οδοντογλυφίδας τοποθετήθηκε μικρή ποσότητα καλλιέργειας βακτηρίου από τα διάφορα στελέχη, προκαλώντας ταυτόχρονα μικρές πληγές στην επιφάνεια της ροδέλας της πατάτας. Αφού προσθέσαμε αποστειρωμένο νερό κλείσαμε τα τριβλία σε πλαστικές σακούλες και ακολούθησε επώαση σε θερμοκρασία 37⁰C. Η εκδήλωση της μόλυνσης (σήψη), εκτιμήθηκε σε διάστημα 48 h.

2) Σε κονδύλους πατάτας, οι μολύνσεις σε κονδύλους πατάτας πραγματοποιήθηκαν σε πλυμένους και απολυμασμένους εξωτερικά κονδύλους όπως προηγούμενα. Με τη βοήθεια αποστειρωμένης οδοντογλυφίδας τοποθετήθηκε ποσότητα βακτηρίου από τα διάφορα στελέχη στη περιοχή του στολονίου ενώ η οδοντογλυφίδα παρέμεινε στη θέση μόλυνσης. Η προσβολή εκτιμήθηκε σε διάστημα τριών ημερών.

3) Σε πατατόσπορο, οι μολύνσεις πραγματοποιήθηκαν σε πατατόσπορο, ο οποίος στη συνέχεια φυτεύτηκε σε γλάστρες. Σχηματίστηκαν αιωρήματα, συγκέντρωσης 10^6 c.f.u./ml σε απεσταγμένο και αποστειρωμένο νερό. Έπειτα με τη χρήση σύριγγας εμβολιάστηκαν 15μl αιωρήματος από κάθε βακτήριο στη περιοχή του φύτρου προβλαστημένου κονδύλου. Η μόλυνση έγινε με τις απομονώσεις της πατάτας, στελέχη του *Pectobacterium carotovorum*, και του *Pectobacterium atrosepticum*, ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε η επέμβαση με νερό. Η φύτευση έγινε σε γλάστρες σε κατάλληλο εδαφικό υπόστρωμα. Οι γλάστρες τοποθετήθηκαν σε θερμοκήπιο (15-30 °C). Παρατηρήσεις λήφθηκαν για 15 ημέρες.

Με σκοπό τη διερεύνηση της ικανότητας των απομονώσεων της πατάτας να προκαλούν σήψη σε διάφορες θερμοκρασίες πραγματοποιήθηκαν μολύνσεις σε ροδέλες πατάτας. Στο κέντρο κάθε ροδέλας μετά τη δημιουργία πληγής τοποθετήθηκαν 15μl από το αντίστοιχο βακτηριακό στέλεχος. Στη συνέχεια οι εμβολιασμένες ροδέλες πατάτας τοποθετήθηκαν σε διάφανα δοχεία με υγρασία και επώαστηκαν στους 15 °C, 20 °C, 25 °C, 30 °C και 35°C σε θαλάμους επώασης. Παρατηρήσεις λήφθηκαν για 72h.

2.4.3 Τεχνητές μολύνσεις σε φύλλα σικορέ

Σε φύλλα σικορέ (*Cichorium intybus*) πραγματοποιήθηκαν τεχνητές μολύνσεις με εναπόθεση καλλιέργειας με τη βοήθεια αποστειρωμένης οδοντογλυφίδας στην εσωτερική επιφάνεια μεμονομένων φύλλων. Τα φύλλα τοποθετήθηκαν σε κλειστά διάφανα δοχεία και επώαστηκαν σε θερμοκρασία 26°C και σε συνθήκες υψηλής σχετικής υγρασίας > 85% RH). Η προσβολή εκτιμήθηκε για διάστημα 72h.

2.4.4 Τεχνητές μολύνσεις σε φυτά σε γλάστρες

Πραγματοποιήθηκαν τεχνητές μολύνσεις σε φυτά με τη μεθοδολογία της μόλυνσης με οδοντογλυφίδα όπως προηγούμενα. Εμβολιασμοί πραγματοποιήθηκαν σε νεαρά φυτά σε στάδιο ανάπτυξης των 3-4 πραγματικών φύλλων: καπνού (*Nicotiana tabacum* της cv. Xanthi), καλαμποκιού (*Zea mays*), χρυσάνθεμου (*Chrysanthemum sp.*), γαρυφαλλιάς (*Dianthus caryophyllus*), πελαργόνιου (*Pelargonium sp.*), διφεμπάχιας (*Dieffenbachia sp.*), ποινσέτιας (*Euphorbia pulcherrima*), πιπεριάς (*Capsicum annum*), κατιφέ (*Tagetes erecta*), μελιτζάνας (*Solanum melanogena*) και μπανάνας (*Musa canvendich*). Το σημείο της μόλυνσης καλύφθηκε με parafilm. Τα φυτά τοποθετήθηκαν τα φυτά σε δοχείο σε θερμοκρασία 26⁰C και σε συνθήκες υψηλής σχετικής υγρασίας > 85%. Η προσβολή εκτιμήθηκε σε διάστημα 72h.

2.4.5 Τεχνητές μολύνσεις σε φυτό καλανχόης

Από τις απομονώσεις σχηματίστηκαν αιωρήματα, συγκέντρωσης 10⁶ c.f.u./ml σε απεσταγμένο και αποστειρωμένο νερό. Έπειτα με τη χρήση σύριγγας εμβολιάστηκαν φύλλα καλανχόης (*Kalanchoe daigremontiana*) με 15μl από το παραπάνω αιώρημα. Αφού το φυτό ψεκάστηκε με νερό το καλύφθηκε σε πλαστική σακούλα, ώστε να δημιουργηθούν οι κατάλληλες συνθήκες υγρασίας για την ανάπτυξη των συμπτωμάτων. Η προσβολή εκτιμήθηκε μετά από διάστημα 24 - 48 ωρών.

2.4.6 Τεχνητές μολύνσεις σε ρύζι

Πραγματοποιήθηκαν μολύνσεις σε σπορόφυτα και σπόρους ρυζιού (*Oryza sativa*). Για τη μόλυνση στα φυτά ρυζιού, σχηματίστηκαν αιωρήματα, συγκέντρωσης 10⁶ c.f.u./ml σε απεσταγμένο και αποστειρωμένο νερό. Η μόλυνση των σπόρων του ρυζιού έγινε με ριζοπότισμα. Η προσβολή εκτιμήθηκε σε διάστημα ενός μήνα. Επίσης είκοσι (20) σπόροι ρυζιού μολύνθηκαν με εμβάπτιση για 30 λεπτά σε βακτηριακό αιώρημα συγκέντρωσης 10⁶ c.f.u./ml με το αντίστοιχο στέλεχος. Στην συνέχεια φυτευτήκαν και η εκδήλωση της ασθένειας εκτιμήθηκε για διάστημα ενός μήνα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Φαινοτυπική ταυτοποίηση των απομονώσεων της πατάτας ως *Dickeya* sp.

Αποικίες από τα τριβλία με θρεπτικό υπόστρωμα CVP και NAG που είχαν επωαστεί στους 27⁰C με το τυπικό αντίστοιχο φαινότυπο της πηκτινολυσης ή του «τηγανιτού αυγού» επιλέχθηκαν και καθαρίστηκαν μετά από επαναλαμβανόμενη επανακαλλιέργεια σε NAG. Δέκα εννιά (19) απομονώσεις από ασθενή φυτά πατάτας που προέρχονται από τέσσερις (4) διαφορετικές καλλιέργειες στο Νομό Ηρακλείου επιλέχθηκαν για τη συνέχεια της μελέτης. Όλες οι απομονώσεις εμφάνισαν όμοιο βιοχημικό και φυσιολογικό φαινότυπο ο οποίος ήταν όμοιος με το στέλεχος αναφοράς *Dickeya solani* (IPO 2222) που χρησιμοποιήθηκε συγκριτικά. Οι απομονώσεις από τα φυτά της πατάτας παρουσίαζαν αργή ανάπτυξη στους 39 ⁰C αλλά δεν αναπτύχθηκαν στους 41 ⁰C, παράγουν οξέα από ραφινόζη, μελιβιόζη, μανιτόλη, D(-) αραβινόζη αλλά δεν παράγουν από D(-) τρυγικό, 5- κετο γλουκονικό και L(+) τρυγικό οξύ. Δεν προκάλεσαν αναερόβια την υδρόλυση της αργινίνης ούτε χρησιμοποίησαν την ινουλίνη. Οι απομονώσεις της πατάτας διαφοροποιούνται από το στέλεχος BPIC 2098 του *Erwinia chrysanthemi* pv. *dianthicola*, το οποίο είχε απομονωθεί παλαιότερα από καλλιέργεια πατάτας από την περιοχή της Δράμας, ως προς τη χρησιμοποίηση της D(+) melibiose, D(-) arabinose και τη χρησιμοποίηση του D(-) tartate και της ινουλίνης. Επίσης οι απομονώσεις της πατάτας διαφοροποιούνται από τα ταυτοποιημένα στελέχη της συλλογής του εργαστηρίου Φυτοπαθολογίας-Βακτηριολογίας του ΤΕΙ Κρήτης που ανήκουν στα είδη *Pectobacterium carotovorum* (6 στελέχη) και *Pectobacterium atrosepticum* (2 στελέχη), των οποίων ο βιοχημικός και φυσιολογικός φαινότυπος ταυτίζεται με τον αντίστοιχο του κάθε είδους.

Με βάση τα προηγούμενα δεδομένα οι απομονώσεις της πατάτας ταυτοποιήθηκαν ως μέλη της βιοποικιλίας 3 του *Erwinia chrysanthemi* pv. *dianthicola* . Επίσης οι απομονώσεις αυτές μοιάζουν με τα Ολλανδικά στελέχη του *Dickeya* τα οποία πιστεύεται ότι αποτελούν ένα νέο είδος μέσα στο γένος *Dickeya* και για το οποίο έχει προταθεί το όνομα *Dickeya solani*.

3.2 Μελέτη του εύρους των ξενιστών

Στον Πίνακα 4 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των τεχνητών μολύνσεων με βακτηριακά στελέχη από τα απομονωθέντα βακτήρια της πατάτας σε είκοσι (20) διαφορετικά είδη φυτών, που αναπτύσσονταν είτε σε γλάστρες είτε ως μοσχεύματα ή αποκομμένοι καρποί ή φύλλα. Επίσης, εμφανίζονται τα αποτελέσματα των μολύνσεων με στελέχη του *Pectobacterium carotovorum*, *Pectobacterium atrosepticum*, *Dickeya solani* (IPO 2222), *D. dianthicola* (BRIC 2098), *Pectobacterium* sp. (624) που δοκιμάστηκαν συγκριτικά.

Σε τεχνητές μολύνσεις τα τυπικά συμπτώματα της ασθένειας αναπαράχθηκαν σε φυτά πατάτας 2-10 ημέρες μετά τη μόλυνση. Τα συμπτώματα ήταν όμοια με εκείνα που παρατηρήθηκαν στις φυσικές μολύνσεις, δηλαδή μελάνωση του λαιμού, σήψη εντεριώνης, μάρανση και νέκρωση του στελέχους. Τα αρχικά συμπτώματα ξεκινούν από τη θέση μόλυνσης στη βάση του στελέχους του φυτού. Ακολουθούν η μάρανση των φύλλων, χλώρωση, μειωμένη ανάπτυξη, κιτρίνισμα του κορυφαίου μεριστώματος, και τελικά ξήρανση και νέκρωση, που συνοδεύεται από εσωτερικό κούφιασμα των ιστών της εντεριώνης (Εικόνα 7 και 8). Στη περίπτωση του τεχνητά μολυνθέντος πατατόσπορου με βακτηριακό αιώρημα παρατηρήθηκε είτε προφυτρωτική σήψη των φύτρων των κονδύλων ή και ολόκληρων των κονδύλων είτε μεταφυτρωτική σήψη των στελεχών της πατάτας με συμπτώματα παρόμοια εκείνων των φυσικών μολύνσεων (Εικόνα 9 και 10).

Οι απομονώσεις της πατάτας μόλυναν τα φυτά: διφεμπάγια, αλεξανδρινό (Εικόνα 31), καλανχόη (Εικόνα 30), μελιτζάνα (Εικόνα 26), καλαμπόκι (Εικόνα 17), καπνού (Εικόνα 16), γαριφαλιά (Εικόνα 22 και 23), μπανάνα, πιπεριά (Εικόνα 24 και 25) και τομάτα (Εικόνα 1 και 2). Σε όλες τις περιπτώσεις η μόλυνση εκδηλώνεται, αρχικά με την ανάπτυξη υδαρούς κηλίδας στην αρχική θέση εμβολιασμού, η οποία σε διάστημα 2 έως 10 ημερών, ανάλογα με το φυτό καταλήγει σε σήψη ή/και πλήρη αποδιοργάνωση των ιστών. Ανάμεσα στα διαφορετικά φυτά υπήρξε διαφοροποίηση ως προς την μολυσματικότητα των απομονώσεων της πατάτας. Έτσι, στα μοσχεύματα πελαργονίου (Εικόνα 28), τα φυτάρια μπανάνας και διφεμπάγιας (Εικόνα 27), η μόλυνση περιορίστηκε στο σημείο της εναπόθεσης του μολύσματος και σε απόσταση λίγων εκατοστών, με εμφάνιση μόνο καστανού μεταχρωματισμού των ιστών, χωρίς όμως να προκληθεί σήψη τους ή η εμφάνιση άλλου συμπτώματος (μάρανση, νέκρωση κ.α.) στο φυτό για τουλάχιστον 15 ημέρες. Έτσι, στην προηγούμενη περίπτωση πολύ

πιθανά τα φυτά δεν μολύνθηκαν αφού δεν εκδηλώθηκε τα κύρια συμπτώματα των αντίστοιχων ασθενειών. Επιπλέον, απομονώσεις της πατάτας δεν μόλυναν τους σπόρους και τα φυτά ρυζιού (Εικόνα 29), αφού στους εμβολιασμένους με το βακτήριο σπόρους δεν παρατηρήθηκε μείωση της βλαστικότητας τους, η οποία παρόμοια με εκείνη του μάρτυρα και κυμάνθηκε από 96-98% σε όλες τις επεμβάσεις, ενώ τα φυτά από τους μολυσμένους και υγιείς σπόρους, αναπτύχθηκαν κανονικά χωρίς συμπτώματα για τουλάχιστον ένα μήνα. Τέλος, τα φυτά ρυζιού που είχαν μολυνθεί με ριζοπότισμα με αιώρημα βακτηρίων, ένα μήνα μετά τη μόλυνση δεν ανέπτυξαν κανένα σύμπτωμα όπως και τα φυτά του μάρτυρα.

Στους κονδύλους πατάτας (Εικόνα 6), στις μη ώριμες τομάτες, και στα φύλλα σικορέ, η τυπική μαλακή σήψη αναπτύχθηκε σε διάστημα 24-48 h από τη μόλυνση. Η σήψη ήταν γρήγορη και εκτεταμένη, στους κονδύλους και στις ροδέλες πατάτας καθώς και γλυκοπατάτας, η δε μαλακή σήψη συνήθως οριοθετείται από καστανό περιθώριο. Στις μη ώριμες τομάτες αναπτύχθηκε χαρακτηριστική υδαρής κηλίδα, με ανέπαφη την επιδερμίδα (Εικόνα 3 και 4).

Όλες οι απομονώσεις της πατάτας και το στέλεχος IPO 2222 βρέθηκαν παθογόνες στο καλαμπόκι αν και παρατηρήθηκε διαφοροποίηση στην ένταση των συμπτωμάτων ανάμεσα στα στελέχη, ενώ το *Pectobacterium atrosepticum* δεν προκάλεσε μόλυνση. Οι απομονώσεις της πατάτας εμφανίστηκαν έντονα μολυσματικές με γρήγορη διασυστηματική διασπορά του παθογόνου στο εσωτερικό του φυτού προκαλώντας μαλακή σήψη στο κορυφαίο μερίστωμα, όπως και σε άλλους εσωτερικούς ιστούς του φυτού που γινόταν εμφανής μετά από επιμήκεις τομείς των στελεχών του φυτού. Η μόλυνση στα φύλλα σικορέ αρχίζει με υδαρή κηλίδα στο εσωτερικό του ελάσματος που σταδιακά γίνεται παπυρώδης, σήπεται και νεκρώνεται (Εικόνα 21). Τα φυτά καλαμποκιού παρουσίασαν μάρανση, κατέρρευσαν ολοκληρωτικά σε διάστημα 5 ημερών. Τα λιγότερο μολυσματικά στελέχη προκάλεσαν περιορισμένη σήψη των ιστών, και μάρανση ή νέκρωση των φύλλων ή/και του κορυφαίου μεριστώματος.

Δεν παρατηρήθηκε διαφοροποίηση ως προς το εύρος των ξενιστών αλλά και την μολυσματικότητα μεταξύ των απομονώσεων της πατάτας και του στελέχους IPO 2222 του *Dickeya solani*. Κατά γενικό κανόνα σε κοινούς ξενιστές η μολυσματικότητα που εμφάνισαν τα στελέχη του *Pectobacterium carotovorum* και του *Pectobacterium atrosepticum* ήταν όμοια ή χαμηλότερη από εκείνα των απομονώσεων της πατάτας. Το

Pectobacterium carotovorum δεν μόλυνε τη γαρυφαλλιά και το *Pectobacterium atrosepticum* δεν μόλυνε τη γαρυφαλλιά και το αλεξανδρινό. Τέλος το ελληνικό στέλεχος του *Dickeya dianthicola* (BPIC 2098) από πατάτα προκάλεσε μαλακή σήψη σε ροδέλες πατάτας, καρπούς τομάτας καθώς και σήψη και νέκρωση της εντεριώνης και μάρανση στο χρυσάνθεμο (Εικόνα 18, 19 και 20), τη πιπεριά, τη μπανάνα (μόνο μεταχρωματισμό) και την μελιτζάνα.

Από τη γενικότερη θεώρηση των δοκιμών παθογένειας έγιναν εμφανείς, αν και δεν εκτιμήθηκε αναλυτικά, οι διαφορές στην ένταση της εκδήλωσης των συμπτωμάτων που προκάλεσαν οι απομονώσεις της πατάτας. Η παραπάνω ένδειξη/διαπίστωση έγινε ιδιαίτερα αντιληπτή όταν στη δοκιμή πηκτινόλυσης σε ροδέλες πατάτας και σε επίπεδα θερμοκρασίας (15, 20, 25, 30, 35 °C). Οι απομονώσεις της πατάτας ήταν περισσότερο μολυσματικές σε υψηλότερες θερμοκρασίες επώασης (Εικόνα 11, 12, 13, 14 και 15) σε σχέση με τα υπόλοιπα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν συγκριτικά (Γκούμας, 2010).

Σε όλες τις περιπτώσεις, από τα τεχνητά μολυνθέντα φυτά, επαναπομονώθηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα NAG, πηκτινολυτικά βακτήρια (με βάση τη δοκιμή σε πατάτα) με φαινότυπο αποικίας «τηγανιτού αυγού» (Εικόνα 37), οι οποίες όταν αναλύθηκαν με μία δοκιμή PCR παρήγαγαν το αναμενόμενο προϊόν amplification με εξειδικευμένους εκκινητές του *Dickeya* sp. (Παγουλάτου, 2011). Σε αντίθεση, οι μάρτυρες παρέμειναν υγιείς μέχρι το τέλος των εκτιμήσεων.

3.2.1. Ανάπτυξη του παθογόνου σε διάφορες θερμοκρασίες

Στο γράφημα 1 και 2 εμφανίζονται τα αποτελέσματα της επίδρασης της θερμοκρασίας στην πρόκληση σήψης σε ροδέλες κονδύλων πατάτας. Στη μελέτη εκτιμήθηκε η διάμετρος της σήψης που προκλήθηκε σε ροδέλες πατάτας από τα βακτηριακά απομονωθέντα στελέχη του *Dickeya* spp. Παρατηρείται ότι η ανάπτυξη στους 15°C *Dickeya* spp. όπως και στα βακτηριακά στελέχη των *Pectobacterium carotovorum* και *Pectobacterium atrosepticum*. Όμως τα βακτηριακά στελέχη του *Dickeya* sp. παρουσίασαν αύξηση της διαμέτρου της σήψης από τους 30 °C με μέγιστη τους 35°C, η οποία έφτασε περίπου στη διάμετρο των 4 cm. Στα στελέχη του *Pectobacterium carotovorum* παρατηρήθηκε αύξηση της διαμέτρου στους 25°C με μέγιστη τους 35°C, όπου έφτασε περίπου τη διάμετρο των 3,5 cm. Στη περίπτωση των βακτηριακών στελεχών του *Pectobacterium atrosepticum* παρατηρήθηκε αύξηση της διαμέτρου στους 25°C, όπως το *Pectobacterium carotovorum* με μέγιστη όμως στους

30°C. Τα βακτηριακά στελέχη του *Pectobacterium atrosepticum* παρουσίασαν μικρότερη διάμετρο σήψης στους 35°C συγκριτικά με τα στελέχη του *Dickeya* sp. και του *Pectobacterium carotovorum*.

Μια νέα ασθένεια της πατάτας: χαρακτηρισμός του παθογόνου αιτίου

ΠΙΝΑΚΑΣ 3. Ταυτοποίηση απομονώσεων από φυτά πατάτας με συμπτώματα «μελάνωσης»

| ΔΟΚΙΜΕΣ | Απομονώσεις από πατάτα | <i>Dickeya solani</i> | <i>Dickeya dianthicola</i> | <i>Pectobacterium</i> | | | Απομόνωση από υάκινθο |
|-------------------------------------|------------------------|-----------------------|----------------------------|-----------------------|---------------------|---------------|-----------------------|
| | | | | <i>carotovorum</i> | <i>atrosepticum</i> | sp. | |
| Αριθμός στελεχών | 19* | IPO 2222 | BPIC 2098 | 6** | 3201 & 3211 | 12*** | 3738 |
| Αντίδραση υπερευαισθησίας | + | + | + | + | + | + | + |
| Ανάπτυξη σε CVP | + | + | + | + | + | + | + |
| Δοκιμή αναερόβιωσης | F | F | F | F | F | F | F |
| Ανάπτυξη σε NB | + | NT | NT | + | + | + | + |
| Ανάπτυξη σε 39 ⁰ C σε NB | -/(+) | NT | NT | -(3036&3736+) | - | +(3357&3377) | NT |
| Ανάπτυξη σε 2% NaCl | + | + | + | - | - | - | NT |
| Ανάπτυξη σε 5% NaCl | - | - | - | + | + | + | + |
| Παραγωγή Φωσφατάσης | + | + | + | - | - | - | - |
| Ευαισθησία Erythromycin (15μg) | + | + | + | - | - | -(3374&3376+) | - |
| Παραγωγή Ινδόλης | + | + | + | - | - | - | NT |
| Υδρόλυση Λεκιθίνης | +(3387&3378 -) | + | + | -(3737+) | - | -(626&627-) | + |
| Υδρόλυση Αργινίνης | - | - | - | - | - | - | - |
| methyl- α -d-glycoside | - | - | - | - | + | - | - |
| D(+) Melibiose | + | + | - | - (3080+) | + | - | - |
| L(+) Tartate | + | + | + | - (3737+) | - | - | + |
| Inoulin | - | - | + | - | - | - | - |
| Malonate | + | + | + | - | - | - | - |
| D- Tartate | - | - | (+) | - | - | - | - |
| Meso Tartate | + | + | + | - | - | - | - |
| D(-) Arabinose | + | + | - | - | - | - | - |
| D(+) Trehalose | - | - | - | - | - | - | - |
| Manitol | + | + | + | + | + | - | + |
| D (+)Raffinose | + | + | + | + | + | + | + |
| Lactose | - | - | - | + | + | + | + |
| D- Sorbitol | - | - | - | + | + | + | + |
| myo-Inositol | + | + | + | - | - | - | - |

*Απομονώσεις από πατάτα: 3378,3383,3385,3386,3387,3388,3389,3390,3391,3392,3393, 3394,3396,3397,3398,3399,3400,3401, 3402.** *Pectobacterium carotovorum*: 3036, 3048, 3080, 3733, 3736, 3737.** **Erwinia* sp: 3357,3365,3366,3370,3371, 3372, 3374,3375,3376,624,626,627.+ : θετική αντίδραση, - : αρνητική αντίδραση (+): ασθενής αντίδραση, NT : δε δοκιμάστηκε

Μια νέα ασθένεια της πατάτας: χαρακτηρισμός του παθογόνου αιτίου

Πίνακας 4. Τεχνητές μολύνσεις σε διάφορα φυτά ή φυτικά μέρη με βακτηριακά στελέχη από πατάτα και με στελέχη αναφοράς

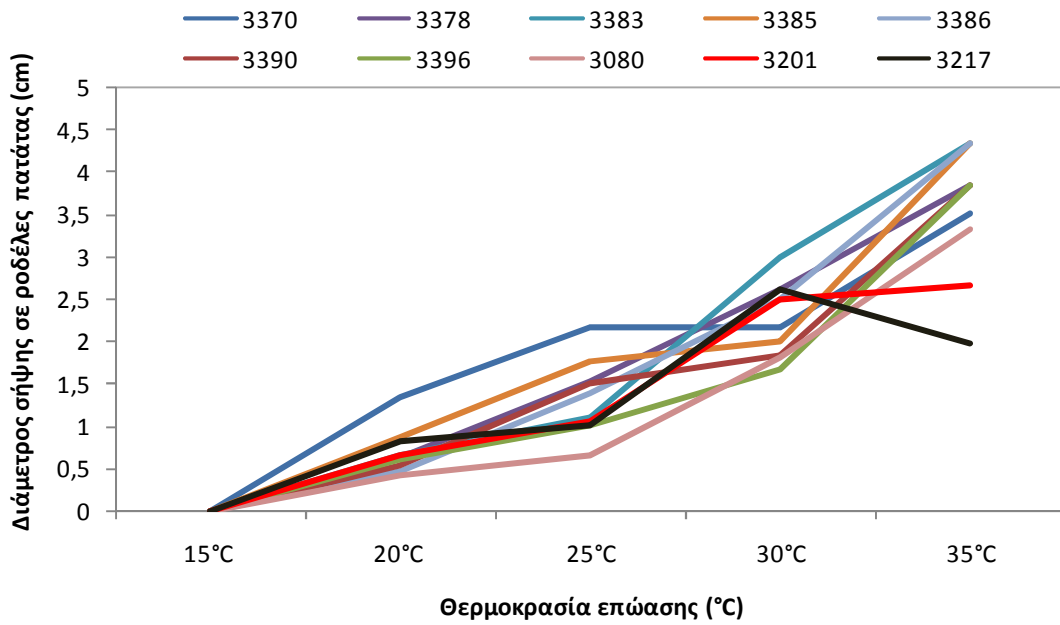
| Μολύνσεις σε: | Απομονώσεις Πατάτας (3386 3378) | <i>Dickeya solani</i> (IPO 2222) | <i>Dickeya dianthicola</i> (BPIC 2098) | <i>Pectobacterium</i> sp. (624) | <i>Pectobacterium carotovorum</i> (3733) | <i>Pectobacterium atrosepticum</i> (3201) |
|--|---------------------------------|----------------------------------|--|---------------------------------|--|---|
| Κονδύλους πατάτας (<i>Solanum tuberosum</i>) | + | + | NT | + | + | + |
| Ροδέλες πατάτας (<i>Solanum tuberosum</i>) | + | + | + | + | + | + |
| Ροδέλες γλυκοπατάτας (<i>Ipomoea batatas</i>) | + | + | NT | + | + | + |
| Καρποί τομάτας (<i>Solanum lycopersicum</i>) | + | + | + | + | + | + |
| Φύλλα σικορέ (<i>Cichorium intybus</i>) | + | NT | NT | NT | NT | NT |
| Μοσχεύματα πελαργόνιου (<i>Pelargonium</i> sp.) | (+) | (+) | NT | - | (+) | - |
| Χρυσανθέμο (<i>Chrysanthemum</i> sp.) | + | + | + | (+) | + | + |
| Τομάτα (<i>Solanum lycopersicum</i>) | + | NT | NT | + | + | + |
| Πιπεριά (<i>Capsicum annum</i>) | + | + | + | + | + | NT |
| Μπανάνα (<i>Musa corvendich</i>) | + | - | NT | - | + | NT |
| Γαρυφαλλιά (<i>Dianthus caryophyllus</i>) | + | + | + | (+) | - | (+) |
| Καπνού (<i>Nicotiana tabacum</i>) | + | + | NT | (+) | NT | NT |
| Καλαμποκιού (<i>Zea mays</i>) | + | + | NT | NT | NT | + |
| Μελιτζάνα (<i>Solanum melanogena</i>) | + | + | + | + | NT | NT |
| Κατιφέ (<i>Tagetes erecta</i>) | - | - | NT | - | NT | NT |
| Καλανχόη (<i>Kalanchoe daigremontiana</i>) | + | + | NT | + | NT | NT |
| Αλεξανδρινό (<i>Euphorbia pulcherrima</i>) | + | + | NT | - | + | - |
| Διφεμπάγια (<i>Dieffenbachia</i> sp.) | + | - | NT | + | + | + |
| Ρυζιού (<i>Oryza sativa</i>) | - | - | NT | NT | NT | NT |
| Σπόροι ρυζιού (<i>Oryza sativa</i>) | - | - | NT | NT | - | NT |

+:αντιστοιχεί σε μόλυνση

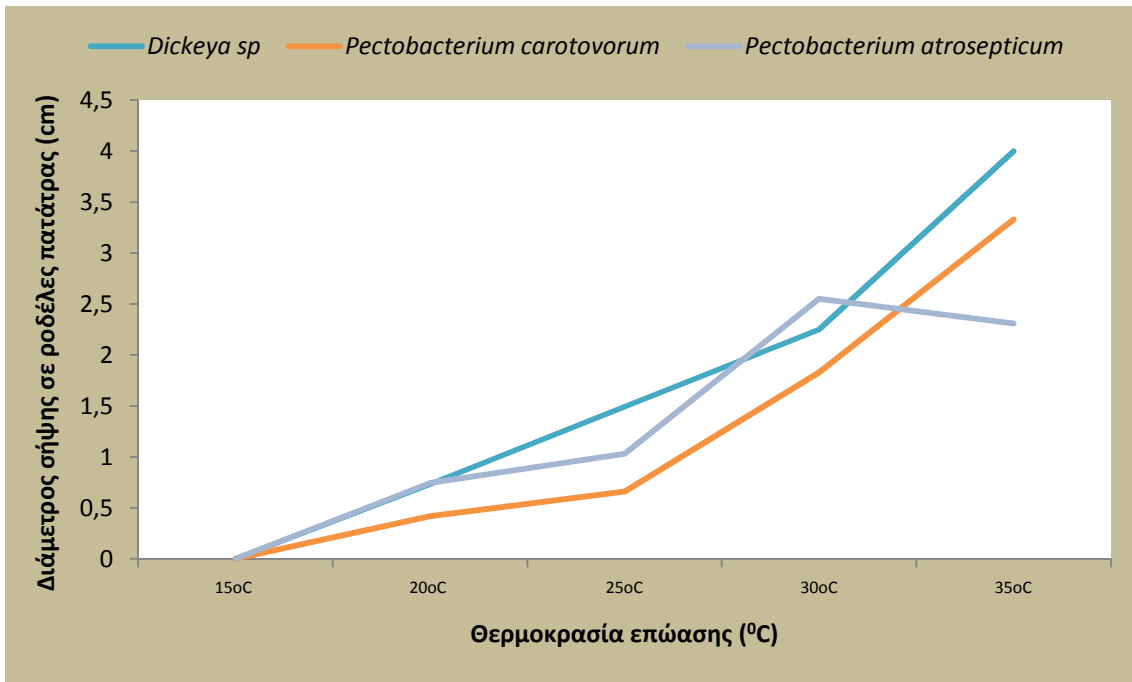
- : αντιστοιχεί σε απουσία μόλυνσης

(+): χαμηλή μολυσματικότητα

NT: δεν δοκιμάστηκε



Γράφημα 1. Συμπεριφορά βακτηριακών στελεχών σε διαφορετικές θερμοκρασίες



Γράφημα 2. Συμπεριφορά βακτηριακών στελεχών σε διαφορετικές θερμοκρασίες

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Την άνοιξη του 2009 και του 2010 παρατηρήθηκαν σημαντικές βακτηριολογικές προσβολές σε καλλιέργειες πατάτας *Solanum tuberosum* L. (cv. Sprunta), στην πεδιάδα της Μεσσαράς στην Κρήτη. Τα ασθενή φυτά παρουσίαζαν συμπτώματα μελάνωσης και σήψης στη βάση των στελεχών, καστανού μεταχρωματισμού των αγγείων, μάρανσης και μαλακή σήψη των μητρικών και των θυγατρικών κονδύλων της πατάτας. Το ποσοστό της προσβολής κυμαινόταν από 5 – 20%, ενώ σε δύο καλλιέργειες, συνολικής έκτασης 20 στρεμμάτων, ήταν μεγαλύτερο του 50%. Σκοπός της εργασίας ήταν ο χαρακτηρισμός του παθογόνου αιτίου της ασθένειας της μελάνωσης του στελέχους της πατάτας (Γκούμας, 2011).

Από την εργασία αυτή προκύπτει ότι το παθογόνο αίτιο της μελάνωσης της πατάτας ταξινομείται στη βιοποικιλία 3 του βακτηρίου *Dickeya* sp. Τα στελέχη της πατάτας βρέθηκαν να είναι βιοχημικά πανομοιότυπα με το ολλανδικό στέλεχος αναφοράς *Dickeya* sp. (IPO 2222), ενώ διαφοροποιούνται από το ελληνικό στέλεχος αναφοράς του *D. dianthicola* (BRIC 2098).

Οι απομονώσεις της πατάτας από την Κρήτη βρέθηκαν βιοχημικά ταυτόσημες με το Ολλανδικό στέλεχος *Dickeya* sp. (IPO 2222) από πατάτα ενώ διαφοροποιείται από το Ελληνικό στέλεχος *D. dianthicola* (BRIC 2098) που είχε απομονωθεί παλαιότερα από καλλιέργεια πατάτας στη Δράμα. Οι απομονώσεις από τα φυτά της πατάτας παρουσίαζαν αργή ανάπτυξη στους 39⁰C αλλά δεν αναπτύχθηκαν στους 41⁰C, παράγουν οξέα από ραφινόζη, μελιβιόζη, μανιτόλη, D(-) αραβινόζη αλλά δεν παράγουν από D(-)τρυγικό, 5 κετο γλουκονικό οξύ και L(+) τρυγικό οξύ. Δεν υδρόλυσαν αναερόβια την αργινίνη ούτε χρησιμοποίησαν την ινουλίνη. Βασιζόμενοι σε αυτά τα αποτελέσματα οι απομονώσεις αυτές ταξινομήθηκαν ως βιοποικιλία 3. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώθηκαν με την εφαρμογή των μοριακών δεικτών BOX και ERIC (Παγουλάτου, 2011). Η εργασία αυτή αποτελεί την πρώτη αναφορά του βακτηρίου (*Dickeya* sp., biovar 3) ως παθογόνου αιτίου της μελάνωσης του στελέχους της πατάτας στην Ελλάδα, υποδεικνύοντας τη διάδοση παθογόνου με το πολλαπλασιαστικό υλικό από την Ολλανδία, όπου αρχικά διαπιστώθηκε το 2004 (Toth, 2001). Η περαιτέρω διασπορά του παθογόνου θα μπορούσε να είχε απρόβλεπτες οικονομικές συνέπειες στην παραγωγή πατάτας στην Ελλάδα, αφού περιλαμβάνει για ιδιαίτερα μολυσματικά στελέχη, που αναπτύσσονται σε σχετικά υψηλές θερμοκρασίες.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Βιβλιογραφία

Ξενόγλωσση Βιβλιογραφία

- Ayers, S. H., Rupp, P., Johnson, W. T., 1919. A study of the alkali -forming bacteria in milk. U. S. Dept. of Agric. Bull, 782.
- Burkholder, W. D., Mc Fadden, L.A., Dimock, A.W., 1953. A bacterial blight of chrysanthemums. *Phytopathology*, 43, 522–526.
- Cother, E. J., 1980. Bacterial seed tuber decay in irrigated sandy soils of New South Wales. *Potato Research*, 23, 75–84.
- De Boer, S. H., Kelman A., 2001. *Erwinia* Soft Rot Group, in Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria, Third Edition 2001, N. W. Schaad, J. B. Jones and W. Chun, 56-72.
- DeLindo, L., French, E. R., 1981. *Erwinia* species attacking potato in the humid tropics of Peru. *Fitopatologia*, 16, 69–74.
- De Vries, P. M., 1990. Stengelnatrot symptomen in aardappelplanten. *Aardappelwereld* 4, 15–8.
- Goumas, D. E., 1987. Possibilites de detection d' *Erwinia chrysanthemi* pv *dianthicola* (Hellmers) Dickey 1979 agent de la bacteriose du *Dahlia* sp. Evaluation des methodes immunoenzymatiques pour le controle sanitaire du materiel de propagation. (Studies of detection methods of *Erwinia chrysanthemi* pv. *dianthicola*, the causal agent of the bacterial disease of *Dahlia*. Utilization of immunoenzymatic methods in the sanitary diagnosis of the propagative materials). These Doctorat d Universite de Paris VI (Nouveau regime), Specialite: Sciences de la Vie et de la Sante (Phytopathologie) pp 174, ref 112.
- Hauben, L., Moore, E. R. B., Vauterin, L., 1998. Phylogenetic position of phytopathogens within the Enterobacteriaceae. *Systematic and Applied Microbiology*, 21, 384–397.
- Laurila, J., Ahola, V., Lehtinen, A., Joutsjoki, T., Hannukkala, A., Rahkonen, A., Pirhonen, M., 2008. Characterization of *Dickeya* strains isolated from potato and river water samples in Finland. *European Journal of Plant Pathology*, 122(2), 213-225.
- Laurila, J., Hannukkala, A., Nykyri, J., Pasanen, M., Hélias, V., Garland, L., Pirhonen, M., 2010. Symptoms and yield reduction caused by *Dickeya* spp. strains isolated

- from potato and river water in Finland. *European Journal of Plant Pathology*, 126(2), 249-262.
- Lelliott, R. A., Dickey, R. S., 1984. Genus VII. *Erwinia* Winslow, Broadhurst, Buchanan, Krumwiede, Rogers and Smith 1920, 209AL. In: Krieg NR, Holt JG, eds. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 1. Gram-negative Bacteria of General, Medical, or Industrial Importance. Baltimore, MD, USA: Williams & Wilkins, 469–476.
- Lumb, V. M., Pe'rombelonMCM, Zutra, D., 1986. Studies of a wilt disease of the potato plant in Israel caused by *Erwinia chrysanthemi*. *Plant Pathology*, 35, 196–202.
- Ma, B., Hibbing, M. E., Kim, S. H., Reedy, R. M., Yedidia, I., Breuer, J., Breuer, J., Glasner, J. D., Perna, N. T., Kelman, A., Charkowski, A. O., 2007. Host range and molecular phylogenies of the soft rot enterobacterial genera *Pectobacterium* and *Dickeya*. *Phytopathology*, 97, 1150–63.
- Palacio, Bielsa, A., Cambra, M. A., Lopez, M. M., 2006. Characterisation of potato isolates of *Dickeya chrysanthemi* in Spain by a microtitre system for biovar determination. *Annals of Applied Biology*, 148, 157–64.
- Powelson, M. L., Franc, G.D., 2001. Blackleg, aerial stem rot and tuber soft rot. In: Stevenson, W. R., Loria, R., Franc, G. D., Weingartner, D. P., eds. Compendium of Potato Diseases, 2nd edn. St Paul, MN, USA: APS Press, 10–1.
- Samson, R., Legendre, J. B., Christen, R., Le Saux, M. F., Achouak, W., Gardan, L., 2005. Transfer of *Pectobacterium chrysanthemi* (Burkholder *et al.* 1953) Brenner *et al.* 1973 and *Brenneria paradisiaca* to the genus *Dickeya* gen. nov. as *Dickeya chrysanthemi* comb. nov. and *Dickeya paradisiaca* comb. nov. and delineation of four novel species, *Dickeya dadantii* sp. nov., *Dickeya dianthicola* sp. nov., *Dickeya dieffenbachiae* sp. nov. and *Dickeya zae* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(4), 1415-1427.
- Samson, R., Poutier, F., Saily, M., Jouan, B., 1987. Caracté'risation des *Erwinia chrysanthemi* isolé'es de *Solanum tuberosum* et d'autres plantes-ho^tes selon les biovars et se'rogroupes. EPPO Bulletin, 17(1), 11–16.
- Schaad, N. W., Jones, J. B., Chun, W., 2001. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. Third edition APS USA.
- Toth, I. K., Avrova, A. O., Hyman, L. J., 2001. Rapid Identification and Differentiation of the Soft Rot *Erwinias* by 16S-23S Intergenic Transcribed Spacer-PCR and

Restriction Fragment Length Polymorphism Analyses. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(9), 4070-4076.

Tsrur, L., Erlich, O., Lebiush, S., Hazanovsky, M., Zig, U., Slawiak, M., Grade, G., van der Wolf, J. M., van der Haar. J. J., 2009. Assessment of recent outbreaks of *Dickeya* sp. (syn. *Erwinia chrysanthemi*) slow wilt in potato crops in Israel. *European Journal of Plant Pathology*, 123(3), 311-320.

Van der Wolf, J. M., De Boer, S. H., 2007. Bacterial pathogens of potato. In: Vreugdenhil D, ed. *Potato Biology and Biotechnology: Advances and Perspectives*. Oxford, UK: Elsevier, 595–617.

Waldee, E. L., 1945. Comparative studies of some peritrichous phytopathogenic bacteria. *Iowa State Journal of Science*, 19, 435–84.

Ελληνική Βιβλιογραφία

Γκούμας, 2010. *Dickeya solani*. Μια νέα απειλή για την καλλιέργεια της πατάτας; Εφημερίδα, ΑΠΟΨΗ ΤΟΥ ΝΟΤΟΥ Αγροτικό ένθετο., Ηράκλειο 2010. Σελ. 5-6.

Γκούμας, Δ., Αυγελής, Α., Τζωρτζακάκης, Ε., Μαλαθράκης, Ν., Ροδιτάκης, Ν., 2001. “Τεχνικός οδηγός ασθενειών και εχθρών της πατάτας”. Εκδ. Περιφέρεια Κρήτης., Ηράκλειο 2001. Σελ. 56 (9-17).

Παγουλάτου, Γ. Μ., 2011 Μοριακή ταυτοποίηση απομονώσεων του βακτηρίου *Dickeya* spp. από πατάτα. Πτυχιακή εργασία. Ηράκλειο 2011, Σελ. 76.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1
ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ



First report of potato blackleg caused by biovar 3 *Dickeya* sp. (*Pectobacterium chrysanthemi*) in Greece

P.F. Sarris, E. Trantas, M. Pagoulatou, D. Stavrou, F. Ververidis and D.E. Goumas*

Department of Plant Sciences, School of Agricultural Technology, Technological Educational Institute of Crete, P.O. Box 1939, Heraklion, GR 71004, Greece

*E-mail: dgoumas@staff.teicrete.gr

Received: 20 Jun 2011. Published: 11 Nov 2011. Keywords: *Dickeya solani*, bacterial potato disease

In spring 2009 and 2010 significant bacterial disease symptoms were observed in potato (*Solanum tuberosum* cv. Spunta) crops in the Messara plain of Crete in Greece. Affected plants had blackleg and rotting symptoms on stem base, brown discolouration of vascular tissues, wilting symptoms on the foliage and soft rot in daughter tubers (Fig. 1). Incidence varied from 5%-50%. Isolations were made from soft-rotted tubers and plants with typical blackleg symptoms on crystal violet pectate (CVP) and nutrient agar glucose (NAG) media. Single bacterial colonies having characteristic pectinolytic activity (CVP) and/or "fried egg" colonies (NAG) (Fig. 2) were subcultured, purified and used for further characterisation. Twenty isolates were initially characterised as *Dickeya* sp. (syn: *Erwinia chrysanthemi*, *Pectobacterium chrysanthemi*). They were Gram-negative rods, facultative anaerobes, oxidase negative, sensitive to erythromycin (15 g/disk), positive for phosphatase and indole production; grew at 37°C, negative for acid production from -methylglucoside and trehalose; and caused soft rot in potato tuber slices (S awiak *et al.*, 2009). Six isolates were selected for further analysis and characterised as *Dickeya* sp. biovar 3. They grew on arabinose, melibiose, raffinose, mannitol and inulin but did not utilise tartrate or hydrolyse arginine under anaerobic conditions, and grew poorly at 39°C (Laurila *et al.*, 2010). These strains were biochemically identical to the reference strain *Dickeya* sp. IPO2222 (kindly provided by Dr. van der Wolf) while biochemically distinct from the reference strain *Dickeya dianthicola* BPIC2098.

Molecular characterisation was performed on four isolates (Ds3386, Ds3378, Ds3400, Ds3405) using BOX- and ERIC-PCR fingerprinting (Fig. 3), as well as *dnaX* gene sequencing (S awiak *et al.*, 2009). The obtained *dnaX* sequences have been deposited in GenBank (Accession Nos. JN663794 to JN663803). Results from BOX-ERIC profiling and *dnaX* sequencing revealed identical profiles for the isolated strains and the reference strain *Dickeya* sp. IPO2222; while they were clearly distinct from the related species *D. dianthicola* BPIC2098, *P. carotovorum* TEIC3036, *P. atrosepticum* TEIC3211 and other *Erwinia* spp. (Fig. 3).

Pathogenicity assays were performed on potato (cv. Spunta) either by injecting 20 l bacterial suspension (10⁷ cfu/ml) into the stem or by

stabbing a tuber at the stolon end with a toothpick charged with bacterial growth. Typical disease symptoms were observed within 10 days (Fig. 2). Re-isolated strains had an identical profile with the inoculated strains and the reference strain *Dickeya* sp. IPO2222. This is the first report of potato blackleg caused by *Dickeya* sp. biovar 3 in Greece. In the last five years, *Dickeya* sp. has caused economic losses of up to 30M annually to the production of potato propagation material in the Netherlands (Toth *et al.*, 2011). Further spread of the pathogen in potato production in Greece is expected to have a high economic impact.

References

- Laurila J, Hannukkala A, Nykyri J, Pasanen M, Helias V, Garland L, Pirhonen M, 2010. Symptoms and yield reduction caused by *Dickeya* spp. strains isolated from potato and river water in Finland. *European Journal of Plant Pathology* **126**, 249-62. [doi:10.1007/s10658-009-9537-9]
- S awiak M, van Beckhoven JRCM, Speksnijder AGCL, Czajkowski R, Grabe G, van der Wolf JM, 2009. Biochemical and genetical analysis reveal a new clade of biovar 3 *Dickeya* spp. strains isolated from potato in Europe. *European Journal of Plant Pathology* **125**, 245-261. [doi:10.1007/s10658-009-9479-2]
- Toth KI, van der Wolf MJ, Saddler G, Lojowska E, Helias V, Pirhonen M, Tsrer L (Lahkim), Elphinstone GJ, 2011. *Dickeya* species: an emerging problem for potato production in Europe. *Plant Pathology*, 385-399. [doi:10.1111/j.1365-3059.2011.02427.x]

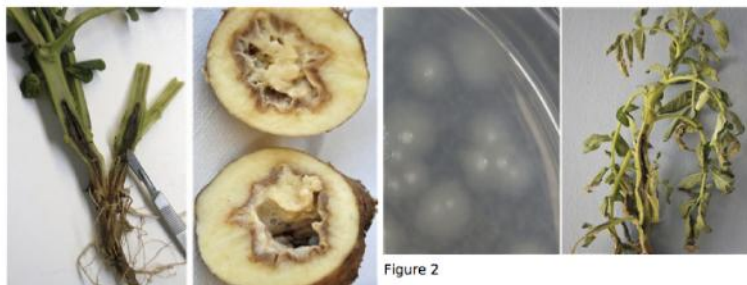


Figure 1

Figure 2

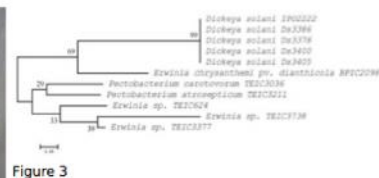


Figure 3

To cite this report: Sarris PF, Trantas E, Pagoulatou M, Stavrou D, Ververidis F, Goumas DE, 2011. First report of potato blackleg caused by biovar 3 *Dickeya* sp. (*Pectobacterium chrysanthemi*) in Greece. *New Disease Reports* **24**, 21. [doi:10.5197/j.2044-0588.2011.024.021]
©2011 The Authors
This report was published on-line at www.ndrs.org.uk where high quality versions of the figures can be found.

ΑΦΙΕΡΩΜΑ: Η καλλιέργεια της πατάτας

Βακτήριο *Dickeya solani*

Dickeya solani: Μια αναδυόμενη απειλή για την καλλιέργεια της πατάτας

Δέσποινα Σταύρου, Μαριάνθη Παγουλάτου, Παναγιώτης Σαρρής, Εμμανουήλ Τραντάς, Φίλιππος Βερβερίδης & Δημήτρης Γκούμας

Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα Κρήτης, Σχολή Τεχνολογίας Γεωπονίας, Τμήμα Φυτικής Παραγωγής, Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας – Βακτηριολογίας Email: dgoumas@staff.teicrete.gr

- Τα τελευταία έξι χρόνια, εμφανίστηκε ένα νέο παθογόνο βακτήριο (*Dickeya solani*) το οποίο φαίνεται να αποτελεί μια αναδυόμενη απειλή για την καλλιέργεια της πατάτας, μετά τη διασπορά του με το πολλαπλασιαστικό υλικό σε πολλές χώρες της Ευρώπης. Το νέο παθογόνο προκαλεί συμπτώματα παρόμοια με εκείνα της ασθένειας «μελάνωση του λαιμού της πατάτας», όπως μαύρισμα στη βάση του στελέχους του φυτού, που έρχεται σε επαφή με το έδαφος και λίγο ψηλότερα, μαράνσεις και νεκρώσεις φύλλων, στελεχών ή/και ολόκληρων φυτών σπανιότερα, αλλά και μαλακή σήψη των κονδύλων της πατάτας. Σε αντίθεση με τα άλλα γνωστά παθογόνα της ασθένειας «μελάνωση του λαιμού της πατάτας» τα οποία ευνοούνται από σχετικά χαμηλές θερμοκρασίες (15°C), το νέο παθογόνο έχει προσαρμοστεί σε περιοχές που επικρατούν υψηλότερες θερμοκρασίες (> 25°C) και στις οποίες επιπλέον εμφανίζεται να είναι πιο μολυσματικό, πιθανά λόγω της ιδιαίτερης ικανότητάς του να κινείται ταχύτερα στα αγγεία του φυτού.

Για το νέο παθογόνο βακτήριο έχει προταθεί η δόκιμη ονομασία *Dickeya solani*. Πρόκειται για συγγενικό είδος του βακτηρίου *Dickeya dianthicola*, μέχρι πρόσφατα γνωστού ως *Erwinia chrysanthemi* pv. *dianthicola*, το οποίο από τη δεκαετία του 1970, σποραδικά προκαλεί προβλήματα στην καλλιέργεια της πατάτας σε διάφορες χώρες της Ευρώπης. Στην Ελλάδα το *Dickeya dianthicola* έχει απομονωθεί από τα εργαστήρια Βακτηριολογίας του Μπενάκειου Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου και της Σχολής Τεχνολογίας Γεωπονίας του ΤΕΙ Κρήτης από πατάτα, τομάτα και διάφορα ανθοκομικά φυτά (γαρυφαλλιά, ντάλια, κ.α.). Όμως, τα τελευταία χρόνια ένα νέο πιο μολυσματικό είδος/στέλεχος του γένους *Dickeya* spp. έχει εγκατασταθεί σε καλλιέργειες πατάτας σε διάφορες ευρωπαϊκές χώρες όπως το Βέλγιο, τη Φιλανδία, τη Γαλλία, την Ολλανδία, την Ισπανία, την Αγγλία, την Πολωνία αλλά και πρόσφατα το Ισραήλ. Πρόκειται για ένα πολύ πιο μολυσματικό βακτήριο σε σχέση με τα άλλα είδη του γένους *Dickeya* spp. (*dianthicola*, *zeae*, *dadantii*) και του *Pectobacterium atrosepticum* (συν., *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*) ή του *Pectobacterium carotovorum* (συν., *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*) που εμπλέκονται ως παθογόνα αίτια, στην ασθένεια «μελάνωση της πατάτας» ή παρεμφορούς συμπτωματολογίας ασθενειών του φυτού. Το βακτήριο *Pectobacterium atrosepticum* αποτελεί το πιο συνηθισμένο παθογόνο αίτιο της ασθένειας «μελάνωση του λαιμού της πατάτας», η οποία εκδηλώνεται συνήθως σε συνθήκες υψηλής υγρασίας και σχετικά χαμηλών θερμοκρασιών (15°C) κυρίως στις βόρειες χώρες της Ευρώπης. Αντίθετα, το νέο παθογόνο (*Dickeya solani*) έχει προσαρμοστεί σε περιοχές που επικρατούν υψηλότερες

θερμοκρασίες (> 25°C) και στις οποίες επιπλέον εμφανίζεται να είναι πιο μολυσματικό, πιθανά λόγω της ιδιαίτερης ικανότητάς του να κινείται ταχύτερα στα αγγεία του φυτού. Η εμπειρία μέχρι σήμερα δείχνει ότι, όταν το παθογόνο αυτό εγκατασταθεί σε μια περιοχή γρήγορα εκτοπίζει τα άλλα συγγενικά του είδη και είναι αυτό που επικρατεί ως το κύριο παθογόνο στις ασθένειες των οποίων η συμπτωματολογία συνδέεται με τη μελάνωση του λαιμού αλλά και γενικότερα με μαράνσεις και με νεκρώσεις φυτών σε καλλιέργειες πατάτας. Η διασπορά του παθογόνου με το πολλαπλασιαστικό υλικό έχει κατά πολύ αυξήσει το ποσοστό 25%, που αναλογούσε μέχρι πρόσφατα σε βακτήρια του γένους *Dickeya* spp. σε σχέση με το σύμπτωμα της μελάνωσης του λαιμού.

Οι άμεσες απώλειες στην παραγωγή πατατόσπορου στην Ολλανδία το 2008 έφτασαν στο ποσό των 30 εκατ. €, από πέντε εκατ. € το 2002, λόγω της υποβάθμισης ή/και της απόρριψης, ποσοστού μεγαλύτερου του 20% της παραγωγής, κατά τη διαδικασία πιστοποίησης, λόγω της ασθένειας της μελάνωσης. Στο Ισραήλ το ποσοστό μάρανσης των φυτών σε καλλιέργειες πατάτας εκτιμήθηκε να κυμαίνεται από 2-30% των φυτών, ενώ η εκδήλωση μαλακής σήψης στους νέους θυγατρικούς κονδύλους μετά από φύτευση μολυσμένου πολλαπλασιαστικού υλικού εκτιμήθηκε μέχρι 30%. Επίσης, στο Ισραήλ, σημειώθηκε μείωση της παραγωγής κατά 20-25% σε καλλιέργειες πατάτας όταν το ποσοστό εμφάνισης της ασθένειας ήταν μεγαλύτερο του 15%. Στη Δανία οι απώλειες εκτιμήθηκαν σε 10 τόνους ανά εκτάριο (10 στρέμματα) στη διάρκεια μιας καλλιεργητικής περιόδου. Αν και για την Ελλάδα δεν υπάρχουν μετρήσιμες

ΑΦΙΕΡΩΜΑ: Η καλλιέργεια της πατάτας

Βακτήριο *Dickeya solani*



Εκδήλωση της ασθένειας στο χωράφι ↓

Φυτό πατάτας με έντονα συμπτώματα προσβολής ↓



Γεωργία - Κτηνοτροφία, τεύχος 6/2011

99

ΑΦΙΕΡΩΜΑ: Η καλλιέργεια της πατάτας

Βακτήριο *Dickeya solani*



Συμπτώματα μερικής (ημιπληγία) ή καθολικής μάρανσης - ξήρανσης των φύλλων εξαιτίας προσβολής από το βακτήριο.



εκτιμήσεις για πιθανές απώλειες στην παραγωγή, από μελέτη που βρίσκεται σε εξέλιξη τα δεδομένα πιστοποιούν την εμφάνιση του παθογόνου σε καλλιέργειες πατάτας τουλάχιστον στην Κρήτη.

Τα συμπτώματα στο χωράφι είναι παρόμοια με εκείνα της μελάνωσης, που προκαλούνται από το *Pectobacterium atrosepticum*, αν και μπορεί να εμφανίζονται χρονικά, αργότερα κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας, ενώ συνήθως εκδηλώνονται όταν η θερμοκρασία έχει αυξηθεί. Συχνά, σε συνθήκες χαμηλής υγρασίας και υψηλής θερμοκρασίας, η μάρανση των φυτών είναι πολύ γρήγορη και συνοδεύεται από εκτεταμένη μαύριση, μαλακή σήψη και νέκρωση των εσωτερικών ιστών των στελεχών, ενώ η περιοχή της εντερίνης μπορεί να εμφανίζεται κενή (κούφια). Συμπερασματικά φαίνεται ότι η ασθένεια που προκαλείται από το *Dickeya* spp., σε ζεστές και υγρές συνθήκες, οδηγεί συνήθως σε σήψη στελέχους με συμπτώματα παρόμοια με εκείνα του

P. atrosepticum, ενώ σε χαμηλότερα επίπεδα υγρασίας, παρατηρείται περιορισμένη σήψη, που όμως συνοδεύεται με μάρανση, με αυξημένη νέκρωση των φύλλων, καστανό μεταχρωματισμό του στελέχους, καθώς επίσης και από κούφιο στέλεχος. Τα συμπτώματα στους κονδύλους φαίνεται να μην διαφοροποιούνται από εκείνα του *P. atrosepticum* και μπορεί να κυμαίνονται μεταξύ της εμφάνισης ενός ασθενούς καστανού μεταχρωματισμού του αγγειακού ιστού και της σήψης και της πλήρους αποδιοργάνωσης του. Στα όρια των σηπόμενων ιστών συχνά αναπτύσσονται καστανές μέχρι μαύρες χρωστικές, που συνήθως οριοθετούν την προσβολή. Η αρχική προσβολή στους κονδύλους, ξεκινά από τα φακίδια, από τη θέση πρόσφυσης του στολόνιου ή από πληγή ενώ η προκαλούμενη σήψη χαρακτηρίζεται ως εντονότερη, ταχύτερη και δριμύτερη σε σχέση με εκείνη που προκαλεί το *P. atrosepticum*. Τα παραπάνω συμπτώματα αλλά και ο έντονος καστανόμαυρος μεταχρωματισμός του αγγειακού ιστού ξεκινούν πάντα από το μολυσμένο μητρικό κόνδυλο, ο οποίος συνήθως σήπεται ως μη όφειλε. Στην περίπτωση που η προσβολή εκδηλωθεί πριν ή αμέσως μετά τη βλάστηση των φύτευτων των κονδύλων, παρατηρείται έντονη ανομοιομορφία στο φύτευμα. Τα νεαρά στελέχη συχνά αποκτούν σκούρο πράσινο χρώμα, σταδιακά γίνονται χλωρωτικά, μαραίνονται και εμφανίζουν το σύμπτωμα της μελάνωσης στο λαιμό.

Σύγχυση των συμπτωμάτων της ασθένειας στο υπέργειο τμήμα του φυτού μπορεί να γίνει με εκείνα άλλων ασθενειών (αδρoμυκώσεις, αδρoβακτηριώσεις) που εκδηλώνονται με μαράνσεις, ιδιαίτερα σε ξηροθερμικές συνθήκες (*Verticillium dahliae*), ενώ η προσβολή στους κονδύλους μερικές φορές μπορεί να μοιάζει με εκείνες της καστανής (*Ralstonia solanacearum*) και της δακτυλιωτής σήψης της πατά-



ΑΦΙΕΡΩΜΑ: Η καλλιέργεια της πατάτας (*Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*). Τα συμπτώματα μπορεί να ποικίλουν ανάλογα με την ευπάθεια ή την αντοχή της ποικιλίας, τη στράγγιση του εδάφους, τις επικρατούσες καιρικές συνθήκες (υγρασία, θερμοκρασία), την παρουσία αλλά και τη συγκέντρωση και την ταχύτητα αποικισμού και διασποράς του παθογόνου στον αγγειακό ιστό του φυτού. Για την πρόκληση μόλυνσης φαίνεται να απαιτούνται σημαντικά μικρότερες συγκεντρώσεις του βακτηρίου σε σχέση με άλλα συγγενικά παθογόνα. Την εκ-

Συμπτώματα μεταχρωματισμού αγγείων και νέκρωσης εντεριώνης, αρχικό στάδιο και προχωρημένα στάδια



ΑΦΙΕΡΩΜΑ: Η καλλιέργεια της πατάτας

Βακτήριο *Dickeya solani*



Το σύμπτωμα της μελάνωσης του λαιμού

δήλωση της ασθένειας υποβοηθούν η πρόκληση πληγών κατά τη συγκομιδή και τις άλλες εργασίες, η υπερβολική υγρασία του εδάφους λόγω υπεράρδευσης κλπ. Μερικές φορές η μάρανση μπορεί να εκδηλωθεί χωρίς την εμφάνιση του συμπτώματος της μελάνωσης στο λαιμό των στελεχών, ενώ εκτιμάται ότι ποσοστό μεγαλύτερο του 20% των φυτών μπορεί να εμφανίσει μάρανση σε περίπτωση που ο «πατατόσπορος» είναι μολυσμένος με το βακτήριο. Συχνά η εκδήλωση της ασθένειας, ιδιαίτερα στις βόρειες ευρωπαϊκές χώρες, φαίνεται να συνδέεται με τη γενικότερη αλλαγή του κλίματος, την αύξηση της θερμοκρασίας και τις ηπιότερες, (πιο ξηροθερμικές), συνθήκες που επικρατούν τα τελευταία χρόνια στις περιοχές αυτές. Η θερμοκρασία αποτελεί τον πιο καθοριστικό παράγοντα αφού το *D. solani*, αναπτύσσεται σε υψηλές θερμοκρασίες μέχρι και 39°C στις οποίες εμφανίζεται πιο μολυσματικό σε σχέση το *Pectobacterium atrosepticum* και το *Dickeya dianthicola* που αποτυγχάνουν να προκαλέσουν ασθένεια σε αυτές τις συνθήκες. Το παθογόνο αποτελεί μια νέα απειλή τόσο για τη σποροπαραγωγική, αλλά και για την καλλιέργεια πατάτας για φαγητό. Διασπείρεται σε μεγάλες αποστάσεις και ανάμεσα στα κράτη κυρίως με το μολυσμένο πολλαπλα-

σιαστικό υλικό (κόνδυλος/πατατόσπορος με λανθάνουσες μολύνσεις), τα επιφανειακά νερά (ποτάμια, πηγάδια κλπ) και τα μηχανήματα. Το παθογόνο μεταφέρεται εξωτερικά στην επιφάνεια των κονδύλων, προστατεύεται στα φακίδια, αλλά συνήθως βρίσκεται εσωτερικά, στο αγγειακό σύστημα του κονδύλου, στο οποίο εισέρχεται διασυστηματικά δια μέσου του στολονίου από το προσβεβλημένο μητρικό φυτό ή δια μέσου των ριζών και σταδιακά αποικίζει το φυτό μέσω του αγγειακού του ιστού. Το βακτήριο δεν φαίνεται να επιβιώνει στο έδαφος για μεγάλο χρονικό διάστημα.

Η αντιμετώπιση της ασθένειας είναι πολύ δύσκολη και ουσιαστικά περιορίζεται στη χρησιμοποίηση υγιούς πολλαπλασιαστικού υλικού το οποίο να έχει προκύψει μέσα από ένα αυστηρό σύστημα πιστοποίησης. Τα επίπεδα ανο-



ΑΦΙΕΡΩΜΑ: Η καλλιέργεια της πατάτας

Σήψη μητρικού κονδύλου, μεταφυτρωτική σήψη των φύτεων και σήψη και αποδιοργάνωση των θυγατρικών κονδύλων, εξαιτίας προσβολής από το βακτήριο



Βακτήριο *Dickeya solani*

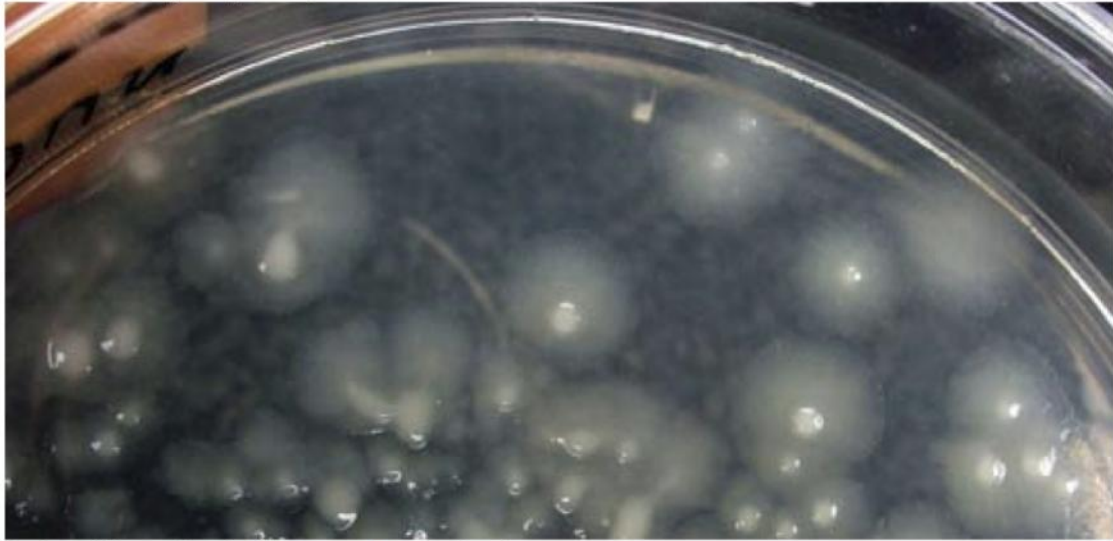


χής στην εμφάνιση του συμπτώματος της μελάνωσης μετά από μακροσκοπικό έλεγχο, κατά τη διαδικασία παραγωγής του «πατατόσπορου», ποικίλουν ανάμεσα στις ευρωπαϊκές χώρες και κυμαίνονται από 0 μέχρι και 4%, ανάλογα με το επίπεδο πιστοποίησής του (Πίνακας 1). Σε κάθε περίπτωση ανεξάρτητα από την αυστηρότητα της διαδικασίας οι λανθάνουσες μολύνσεις είναι δυνατόν να διαφεύγουν της διαδικασίας αυτής. Η χρησιμοποίηση απολυμασμένων μηχανημάτων, εργαλείων και μέσων καλλιέργειας, συλλογής, αποθήκευσης και εμπορίας φαίνεται ότι αποτελεί σημαντικό παράγοντα στην αποφυγή δημιουργίας νέων εστιών μόλυνσης ή διασποράς του παθογόνου. Άλλες πηγές μόλυνσης μπορεί να παίζουν σημαντικό ρόλο για την

ανάπτυξη της ασθένειας, όπως τα μολυσμένα φυτικά υπολείμματα, τα φυτά εθελοντές, οι εναλλακτικοί ξενιστές είτε πρόκειται για ζιζάνια είτε για άλλα καλλιεργούμενα φυτά, το νερό άρδευσης, τα αερολύματα ή/και τα έντομα.

Αν αναλογιστούμε ότι περίπου το 80% του απαιτούμενου στη χώρα μας πατατόσπορου εισάγεται από τις χώρες, όπου τα τελευταία χρόνια το βακτήριο *Dickeya solani* δημιουργεί σημαντικά προβλήματα, σε συνδυασμό με το γεγονός ότι μεταφέρεται κυρίως με τον πατατόσπορο αλλά και το γεγονός ότι οι ξηροθερμικές κλιματολογικές συνθήκες στη χώρα μας είναι ιδανικές για το παθογόνο, η μαζική εισαγωγή μολυσμένου πολλαπλασιαστικού υλικού με λανθάνουσα ή μη μόλυνση από το βακτήριο μπορεί να

ΑΦΙΕΡΩΜΑ: Η καλλιέργεια της πατάτας



Αποικίες, σε καλλιέργεια του βακτηρίου *Dickeya* sp., με εμφάνιση τηγανητού αυγού.

Πίνακας 1: Επίπεδα ανοχής, κατά τις επισκοπήσεις (μακροσκοπικός έλεγχος), στην ασθένεια μελάνωση της πατάτας (από *P. atrosepticum*, *P. carotovorum* ή *Dickeya* spp.) κατά τη διαδικασία παραγωγής «πατατόσπορου» σε χώρες της Ευρώπης (προσαρμογή από βιβλιογραφική πηγή 3)

| Χώρα | Προβασικός | Βασικός | Πιστοποιημένος |
|--------------------------------------|------------|----------|----------------|
| Βέλγιο | 0 | 0 | 0,3-0,6 |
| Φιλανδία | 0 | 0-0,5 | 1,0-2,0 |
| Γαλλία | 0 | 0-0,5 | 1,0 |
| Γερμανία | 0 | 0,2-0,5 | 1,2 |
| Ολλανδία | 0 | 0 | 0,03-0,1 |
| Πολωνία | 0-1,0 | 1,0-2,0 | 3,0-4,0 |
| Αγγλία & Ουαλία | 0 | 0,25-1,0 | 2,0 |
| Σκωτία (<i>Pectobacterium</i> spp.) | 0 | 0,25-1,0 | Δεν φυτεύεται |
| UK (Σκωτία) <i>Dickeya</i> spp. | 0 | 0 | Δεν φυτεύεται |

οδηγήσει σε απρόβλεπτες απώλειες στην παραγωγή.

Στο Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας-Βακτηριολογίας του ΤΕΙ Κρήτης, τα τρία τελευταία χρόνια, έχουν απομονωθεί, επανειλημμένα, βακτήρια του γένους *Dickeya* spp. από καλλιέργειες πατάτας στην πεδιάδα της Μεσσαράς και στις περιοχές Αγίας Βαρβάρας, Βενεράτου κ.α. στο νομό Ηρακλείου. Φυτά πατάτας που προσκομίσθηκαν στο εργαστήριο ή συλλέχθηκαν από προσβεβλημένες καλλιέργειες συνήθως εμφάνιζαν την παραπάνω περιγραφείσα συμπτωματολογία σε έντονη μορφή. Σύμφωνα με τους καλλιεργητές οι απώλειες ήταν μεγαλύτερες του 50% της αναμενόμενης παραγωγής σε δύο τουλάχιστον καλλιέργειες, έκτασης περίπου 20 στρεμμάτων. Σε σχετική μελέτη που βρίσκεται σε εξέλιξη, στα δυο εμπλεκόμενα εργαστήρια του τμήματος Φυτικής Παραγωγής (εργ. Φυτοπαθολογίας, και εργ. Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας Φυτών), όλα τα βακτηριακά στελέχη που απομονώθηκαν τα τελευταία χρόνια από ασθενή φυτά πατάτας από την Κρήτη βρέθηκαν κατά τον βιοχημικό αλλά και το μοριακό προσδιορισμό τους να είναι ταυτόσημα με τα στελέχη του παθογόνου που απομονώνονται σε άλλες ευρωπαϊκές χώρες και ιδιαίτερα στην Ολλανδία, δηλαδή χαρακτηρίστηκαν ως μέλη του πιθανά νέου είδους

Dickeya solani. Στις περιπτώσεις όπου παρατηρούνται από καλλιεργητές παρόμοια συμπτώματα σε καλλιέργειες πατάτας θα πρέπει να έρχονται άμεσα σε επαφή με το εργαστήριο Φυτοπαθολογίας για τη διερεύνηση της κάθε περίπτωσης. Καλό είναι να γίνει αντιληπτό ότι, τα συμπτώματα από μόνα τους δεν αρκούν πάντα για να τον προσδιορισμό της αιτίας, που τα προκάλεσε αφού όμοια ή σχετικά παρόμοια συμπτώματα μπορεί να προκληθούν από τελείως διαφορετικά παθογόνα αίτια. Το *Dickeya solani* είναι ένα νέο παθογόνο και υπάρχουν ακόμα πολλά ερωτήματα που πρέπει να απαντηθούν σε σχέση με την επιδημιολογία και την αντιμετώπισή του.

Επιλεγμένη βιβλιογραφία

1. Γκούμας Δ., Αυγελής Α., Τζωρτζακάκης Ε., Μαλαθράκης Ν. & Ροδιτάκης Ν. 2001. Τεχνικός Οδηγός Ασθενειών και Εχθρών της Πατάτας. Επιμέλεια έκδοσης: Δ. Γκούμας, ΠΕΠ-Κρήτης, Ηράκλειο, Κρήτης, σελ. 56 (ISBN: 960-87112-0-7).
2. Laurila J, Hannukkala A, Nykyri J *et al.*, 2010. Symptoms and yield reduction caused by *Dickeya* spp. strains isolated from potato and river water in Finland. *European Journal of Plant Pathology* 126, 249–62.
3. Toth I. K., van der Wolf J. M., Saddler G., Lojkowska E., Helias V., Pirhonen M., Tsrör (Lahkim) L. and Elphinstone J. G., 2011. *Dickeya* species: an emerging problem for potato production in Europe. *Plant Pathology* 60, 385–399.

PP-142

ΠΡΩΤΗ ΑΝΑΦΟΡΑ ΤΟΥ *Dickeya* sp. ΒΙΟΝΑΡ 3 ΩΣ ΠΑΘΟΓΟΝΟΥ ΤΗΣ ΜΕΛΑΝΩΣΗΣ ΤΗΣ ΠΑΤΑΤΑΣ ΣΤΗΝ ΕΛΛΑΔΑ

Π. Σαρρής, Ε. Τραντάς, Μ. Παγουλάτου, Δ. Σταύρου, Φ. Βερβερίδης & Δ. Γκούμας

Σχολή Τεχνολογίας Γεωπονίας, Τμήμα Φυτικής Παραγωγής, ΤΕΙ Κρήτης, 71004 Ηράκλειο

Την άνοιξη του 2009 και του 2010 παρατηρήθηκαν σημαντικές βακτηριολογικές προσβολές σε καλλιέργειες πατάτας *Solanum tuberosum* L. (ποικ. 'Sprunta'), στην πεδιάδα της Μεσσαράς στην Κρήτη. Τα ασθενή φυτά παρουσίαζαν συμπτώματα μελάνωσης και σήψης στη βάση των στελεχών, καστανού μεταχρωματισμού των αγγείων, μάρανσης και μαλακή σήψη των μητρικών και των θυγατρικών κονδύλων της πατάτας. Το ποσοστό της προσβολής κυμαινόταν από 5-20%, ενώ σε δύο καλλιέργειες, συνολικής έκτασης 20 στρεμμάτων, ήταν μεγαλύτερο του 50%. Σκοπός της εργασίας ήταν ο χαρακτηρισμός του παθογόνου αιτίου της ασθένειας της μελάνωσης του στελέχους της πατάτας. Απομονώσεις πραγματοποιήθηκαν σε θρεπτικά υποστρώματα CVP (Crystal Violet Pectate) και NAG (Nutrient Agar Glucose), από αντιπροσωπευτικά δείγματα φυτών πατάτας με συμπτώματα μελάνωσης του στελέχους και από κονδύλους πατάτας με μαλακή σήψη. Αποικίες με το χαρακτηριστικό φαινότυπο πηκτινόλυσης (CVP) ή/και «τηγναίτου αυγού» (NAG) μεταφυτεύθηκαν και ελέγχθηκε η καθαρότητά τους. Είκοσι απομονώσεις, προκαταρκτικά, ταυτοποιήθηκαν ως *Dickeya* spp. (συν. *Erwinia chrysanthemi*, *Pectobacterium chrysanthemi*). Οι απομονώσεις, ήταν κατά Gram αρνητικές, προαιρετικά αναερόβιες, αρνητικές στην παραγωγή αξειδάσης, αναπτύσσονταν στους 37°C, ήταν ευαίσθητες στην ερυθρομυκίνη (15 µg), παρήγαγαν φωσφατάση και υδρόλη, δεν παρήγαγαν οξύ από α-μεθυλ-γλυκοζίδιο ή τρεχαλόζη, ενώ προκάλεσαν μαλακή σήψη σε ροδέλες κονδύλων πατάτας. Έξι από τα απομονωθέντα στελέχη του παθογόνου εξετάστηκαν αναλυτικότερα και ταυτοποιήθηκαν ως βιοποικιλία 3 του *Dickeya* spp. Επιπλέον, τα στελέχη αυτά βιοχημικά βρέθηκαν να είναι πανομοιότυπα με το ολλανδικό στέλεχος αναφοράς *Dickeya* sp. (IPO 2222), ενώ διαφοροποιούνται από το ελληνικό στέλεχος αναφοράς του *Dickeya dianthicola* (BPIIC 2098). Η εφαρμογή των μοριακών δεικτών BOX και ERIC, για τη μοριακή ταυτοποίηση στελεχών του παθογόνου βακτηρίου, έδειξε την πλήρη ταύτισή τους με το στέλεχος αναφοράς (IPO 2222), καθώς εμφάνισαν πανομοιότυπο πρότυπο ζώνωσης (μοριακό αποτύπωμα), ενώ τα διαφοροποιεί σαφώς από τα συγγενικά βακτηριακά στελέχη των *Dickeya dianthicola* (BPIIC 2098), *Pectobacterium carotovorum* (TEIC 3936), *Pectobacterium atrosepticum* (TEIC 3311), που εξετάστηκαν συγκριτικά. Η παθογένεια των στελεχών ελέγχθηκε με τεχνητές μολύνσεις σε φυτά και κονδύλους πατάτας. Σε διάστημα 2-5 ημερών εκδηλώθηκαν τα τυπικά συμπτώματα της ασθένειας. Τα στελέχη που επαναπομονώθηκαν από τα τεχνητά μολυσμένα φυτά εμφάνισαν όμοιο βιοχημικό προφίλ και μοριακό αποτύπωμα με τα βακτηριακά στελέχη των τεχνητών μολύνσεων. Η εργασία αυτή αποτελεί την πρώτη αναφορά του βακτηρίου (*Dickeya* sp., βιονάρ 3) ως παθογόνου αιτίου της μελάνωσης του στελέχους της πατάτας στην Ελλάδα, υποδεικνύοντας τη διάδοση του παθογόνου με το πολλαπλασιαστικό υλικό από την Ολλανδία, όπου αρχικά διαπιστώθηκε το 2004. Η περαιτέρω διασπορά του παθογόνου θα μπορούσε να είχε απρόβλεπτες οικονομικές συνέπειες στην παραγωγή πατάτας στην Ελλάδα, αφού περιλαμβάνει ιδιαίτερα μολυσματικά στελέχη, που αναπτύσσονται σε σχετικά υψηλές θερμοκρασίες.



**Ανώτατο Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα Κρήτης
Σχολή Τεχνολογίας Γεωπονίας, Τμήμα Φυτικής Παραγωγής
Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας – Βακτηριολογίας
Τ.Θ. 1939, 71004 Ηράκλειο Κρήτης
email: dgoumas@staff.teicrete.gr**

25ο Συνέδριο της Ελληνικής Εταιρείας
της Επιστήμης των Οπωροκηπευτικών
Λεμεσός, 1 - 4 Νοεμβρίου 2011



ΠΡΩΤΗ ΑΝΑΦΟΡΑ ΤΟΥ DICKEYA SP. BIVONAR 3 ΩΣ ΠΑΘΟΓΟΝΟΥ ΤΗΣ ΜΕΛΑΝΩΣΗΣ ΤΗΣ ΠΑΤΑΤΑΣ ΣΤΗΝ ΕΛΛΑΔΑ

Δέσποινα Σταύρου, Μαριάνθη Παγουλάτου, Παναγιώτης Σαρρής, Εμμανουήλ Τραντάς, Φίλιππος Βερβερίδης & Δημήτρης Γκούμας

*** Η ΑΣΘΕΝΕΙΑ:** Την άνοιξη του 2009 & 2010 παρατηρήθηκαν σημαντικές βακτηριολογικές προσβολές σε καλλιέργειες πατάτας (*Solanum tuberosum* L., cv. 'Sprunta'), στην πεδιάδα της Μεσσαράς στην Κρήτη. Τα ασθενή φυτά παρουσίαζαν μελάγχωση & σήψη στη βάση των στελέχων, καστανό μέχρι μύρο μεταχρωματισμό των αγγείων & της εντερικής, μαλακή σήψη των μητρικών και των θυγατρικών κονδύλων & τελικά μείραση και νέκρωση (Εικόνα 1). Το ποσοστό της προσβολής κομμιόταν από 5-20%, ενώ σε δύο καλλιέργειες, συνολικής έκτασης 20 στρεμμάτων, ήταν μεγαλύτερο του 50%. **Σκοπός της εργασίας:** Ο χαρακτηρισμός του παθογόνου αιτίου της ασθένειας της μελάγχωσης του στελέχους της πατάτας στην Κρήτη.

*** ΠΑΘΟΓΟΝΟ: Απομόνωση & Ταυτοποίηση.** Πραγματοποιήθηκαν απομονώσεις σε θρεπτικά υποστρώματα CVP (Crystal Violet Peclate) και NAG (Nutrient Agar Glucose), από αντιπροσωπευτικά δείγματα πατάτας με συμπτώματα μελάγχωσης του στελέχους και από κονδύλους πατάτας με μαλακή σήψη. Αποικίες με τον χαρακτηριστικό φαινόμενο πηκτινώσεως (CVP) ή/και «πτηναιτού αυγού» (NAG) μεταετέθηκαν και ελέγχθηκε η καθαρότητά τους. Είκοσι απομονώσεις, προκαταρκτικά, ταυτοποιήθηκαν ως *Dickeya* spp. (συν. *Erwinia chrysanthemi*, *Pectobacterium chrysanthemi*). Οι απομονώσεις, ήταν κατά Gram αρνητικές, προαιρετικά αναερόβιες, αρνητικές στην παραγωγή οξειδάσης, αναπτύσσονταν στους 37°C, ήταν αναισθητές στην ερυθρομικίνη (15μg), παρήγαγαν φωσφοράση και ντόλη, δεν παρήγαγαν οξύ από α-μεθυλ-γλυκοζίδιο ή τρεχαλόζη, ενώ προκαλούσαν μαλακή σήψη σε ροδέλες κονδύλων πατάτας. Έξι από τα απομονωθέντα στελέχη του παθογόνου εξετάστηκαν αναλυτικότερα και ταυτοποιήθηκαν ως βιοποικιλία 3 του *Dickeya* spp. (Πίνακας 1 & Εικόνα 2). Επιπλέον, τα στελέχη αυτά βιοχημικά βρέθηκαν να είναι πανομοιότυπα με το ολλανδικό στέλεχος αναφοράς *Dickeya* sp. (IPO 2222), ενώ διαφοροποιούνται από το ελληνικό στέλεχος αναφοράς του *Dickeya dianthicola* (BPIC 2098) από πατάτα. Η εφαρμογή των μοριακών δεικτών BOX και ERIC, για τη μοριακή ταυτοποίηση στελέχων του παθογόνου βακτηρίου, έδειξε την πλήρη ταύτισή τους με το στέλεχος αναφοράς (IPO 2222), καθώς εμφανίσαν πανομοιότυπο πρότυπο ζώνωσης (μοριακό αποτύπωμα), ενώ τα διαφοροποιεί σαφώς από τα συγγενικά βακτηριακά στελέχη των *Dickeya dianthicola* (BPIC 2098), *Pectobacterium carotovorum* (TEIC 3936), *Pectobacterium atrosepticum* (TEIC 3311), που εξετάστηκαν συγκριτικά (Εικόνα 3).

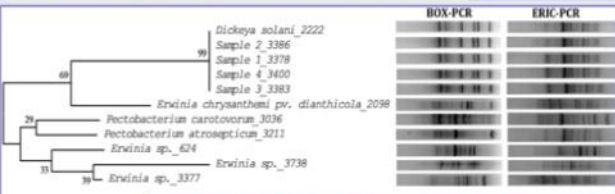
ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΟΛΟΓΙΑ (ΕΙΚΟΝΑ)



ΠΙΝΑΚΑΣ 1. Ταυτοποίηση απομονώσεων από φυτά πατάτας με συμπτώματα μελάγχωσης

| ΜΟΡΦΗ | Απομόνωση και κωδικός | Dickeya solani | Dickeya dianthicola | Pectobacterium carotovorum | Pectobacterium atrosepticum | Απομόνωση από κόνδυλο |
|----------------------|-----------------------|----------------|---------------------|----------------------------|-----------------------------|-----------------------|
| Ασθενή φυτά | IP2 | PP222 | BPIC 2098 | 4** | 300 & 303 | 32** |
| Δοκιμασία απομόνωσης | | + | + | + | + | + |
| Απομόνωση CVP | | + | + | + | + | + |
| Απομόνωση NAG | | + | + | + | + | + |
| Απομόνωση 1% NaCl | | + | + | + | + | + |
| Απομόνωση 5% NaCl | | + | + | + | + | + |
| Απομόνωση 10% NaCl | | + | + | + | + | + |
| Απομόνωση 20% NaCl | | + | + | + | + | + |
| Απομόνωση 30% NaCl | | + | + | + | + | + |
| Απομόνωση 40% NaCl | | + | + | + | + | + |
| Απομόνωση 50% NaCl | | + | + | + | + | + |
| Απομόνωση 60% NaCl | | + | + | + | + | + |
| Απομόνωση 70% NaCl | | + | + | + | + | + |
| Απομόνωση 80% NaCl | | + | + | + | + | + |
| Απομόνωση 90% NaCl | | + | + | + | + | + |
| Απομόνωση 100% NaCl | | + | + | + | + | + |
| Απομόνωση 110% NaCl | | + | + | + | + | + |
| Απομόνωση 120% NaCl | | + | + | + | + | + |
| Απομόνωση 130% NaCl | | + | + | + | + | + |
| Απομόνωση 140% NaCl | | + | + | + | + | + |
| Απομόνωση 150% NaCl | | + | + | + | + | + |
| Απομόνωση 160% NaCl | | + | + | + | + | + |
| Απομόνωση 170% NaCl | | + | + | + | + | + |
| Απομόνωση 180% NaCl | | + | + | + | + | + |
| Απομόνωση 190% NaCl | | + | + | + | + | + |
| Απομόνωση 200% NaCl | | + | + | + | + | + |
| Απομόνωση 210% NaCl | | + | + | + | + | + |
| Απομόνωση 220% NaCl | | + | + | + | + | + |
| Απομόνωση 230% NaCl | | + | + | + | + | + |
| Απομόνωση 240% NaCl | | + | + | + | + | + |
| Απομόνωση 250% NaCl | | + | + | + | + | + |
| Απομόνωση 260% NaCl | | + | + | + | + | + |
| Απομόνωση 270% NaCl | | + | + | + | + | + |
| Απομόνωση 280% NaCl | | + | + | + | + | + |
| Απομόνωση 290% NaCl | | + | + | + | + | + |
| Απομόνωση 300% NaCl | | + | + | + | + | + |
| Απομόνωση 310% NaCl | | + | + | + | + | + |
| Απομόνωση 320% NaCl | | + | + | + | + | + |
| Απομόνωση 330% NaCl | | + | + | + | + | + |
| Απομόνωση 340% NaCl | | + | + | + | + | + |
| Απομόνωση 350% NaCl | | + | + | + | + | + |
| Απομόνωση 360% NaCl | | + | + | + | + | + |
| Απομόνωση 370% NaCl | | + | + | + | + | + |
| Απομόνωση 380% NaCl | | + | + | + | + | + |
| Απομόνωση 390% NaCl | | + | + | + | + | + |
| Απομόνωση 400% NaCl | | + | + | + | + | + |
| Απομόνωση 410% NaCl | | + | + | + | + | + |
| Απομόνωση 420% NaCl | | + | + | + | + | + |
| Απομόνωση 430% NaCl | | + | + | + | + | + |
| Απομόνωση 440% NaCl | | + | + | + | + | + |
| Απομόνωση 450% NaCl | | + | + | + | + | + |
| Απομόνωση 460% NaCl | | + | + | + | + | + |
| Απομόνωση 470% NaCl | | + | + | + | + | + |
| Απομόνωση 480% NaCl | | + | + | + | + | + |
| Απομόνωση 490% NaCl | | + | + | + | + | + |
| Απομόνωση 500% NaCl | | + | + | + | + | + |

ΕΙΚΟΝΑ 2. Δοκιμές ταυτοποίησης απομονώσεων από ασθενή φυτά πατάτας.



ΕΙΚΟΝΑ 3. Δενδρογράμμο που δημιουργήθηκε από το συνδυασμό των BOX- and ERIC-PCR μοριακών αποτυπωμάτων.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ: Με βάση τη μορφολογική, βιοχημική, φυσιολογική και μοριακή φαινότητα αλλά και την παθογένεια των βακτηριακών στελεχών που απομονώθηκαν από τους προσβεβλημένους ιστούς της πατάτας, προκύπτει ότι το βακτήριο *Dickeya* sp., bionar 3 αποτελεί το παθογόνο αίτιο της ασθένειας. Η εργασία αυτή αποτελεί την πρώτη αναφορά του βακτηρίου (*Dickeya* sp., bionar 3) ως παθογόνου αιτίου της μελάγχωσης του στελέχους της πατάτας στην Ελλάδα, υποδεικνύοντας τη διάδοση του παθογόνου με το πολλαπλασιαστικό υλικό από την Ολλανδία, όπου αρχικά διαπιστώθηκε το 2004. Η περαιτέρω διασπορά του παθογόνου θα μπορούσε να είχε απρόβλεπτες οικονομικές συνέπειες στην παραγωγή πατάτας στην Ελλάδα, αφού περιλαμβάνει ιδιαίτερα μολυσματικά στελέχη, που αναπτύσσονται σε σχετικά υψηλές θερμοκρασίες. Τα τελευταία πέντε χρόνια το βακτήριο προκάλεσε ετήσιες απώλειες €30M στην παραγωγή πολλαπλασιαστικού υλικού στην Ολλανδία (Toth et al., 2011).

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ: Σταύρου Δ., Παγουλάτου Μ., Σαρρής Π., Τραντάς Ε., Βερβερίδης Φ. & Γκούμας Δ., 2011. *Dickeya solani*: Μια αναδυόμενη απειλή για την καλλιέργεια της πατάτας. Γεωργία - Κτηνοτροφία, 6, 98-104
Γκούμας Δ., Αυγελλής Α., Τσιφλίδης Ε., Μολιδοπούλου Ν. & Ροβιάνης Ν., 2001. Τεχνικός Οδηγός Ασθενών και Εξόντων της Πατάτας. Επιμέλεια έκδοσης: Δ. Γκούμας. ΠΕΙΤ-Κρήτης, Ηράκλειο, Κρήτης, σελ. 56 (ISBN: 960-871120-7)
Laurila J., Hannukkala A., Nykyl J., Pastanen M., Hällas V., Garland L. and Pihonen M., 2010. Symptoms and yield reduction caused by *Dickeya* sp. strains isolated from potato and river water in Finland. *European Journal of Plant Pathology* 128, 249-52. doi:10.1007/s10698-009-9537-9
Stawik M., van Beckhoven J., Spreksnijder A., Czajkowski R., Grab G., van der Wolf J., 2009. Biochemical and genetic analysis reveal a new clade of biovar 3 *Dickeya* spp. strains isolated from potato in Europe. *European Journal of Plant Pathology* 125, 245-261. doi:10.1007/s10698-009-9478-2
Toth KL, van der Wolf MJ, Sadder G, Lojkowska E, Hällas V, Pihonen M, Tazor L (Lahkim), Elphinstone GJ, 2011. *Dickeya* species: an emerging problem for potato production in Europe. *Plant Pathology* 60(3), 386-396. doi:10.1111/j.1365-3059.2011.02427.x

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 2
ΦΩΤΟΓΡΑΦΙΚΟ ΥΛΙΚΟ



Εικόνα 1

Εικόνα 1. Μάρανση, σήψη και νέκρωση σε φυτά τομάτας μετά από τεχνητή μόλυνση με στελέχη του *Dickeya solani*.



Εικόνα 2

Εικόνα 2. Μάρανση, σήψη και νέκρωση σε φυτά τομάτας μετά από τεχνητή μόλυνση με στελέχη του *Dickeya solani*.



Εικόνα 3

Εικόνα 3. Τεχνητή μόλυνση με στελέχη *Dickeya solani*, *P. carotovorum*, *P. atrosepticum* σε άωρους καρπούς τομάτας.



Εικόνα 4

Εικόνα 4. Ανάπτυξη χαρακτηριστικής υδαρούς κηλίδας με ανέπαφη την επιδερμίδα σε άωρους καρπούς τομάτας.



Εικόνα 5

Εικόνα 5. Τεχνητή μόλυνση σε κονδύλους πατάτας στελεχών *Dickeya solani*, *P. carotovorum* και *P. atrosepticum* με τη βοήθεια οδοντογλυφίδας.



Εικόνα 6

Εικόνα 6. Σήψη κονδύλου πατάτας έπειτα από τεχνητή τη μόλυνση.



Εικόνα 7

Εικόνα 7. Τεχνητές μολύνσεις σε πατατόσπορο με στελέχη *Dickeya solani*, *P. carotovorum* και *P. atrosepticum*. Ανομοιόμορφη ανάπτυξη ή απουσία φυτρώματος των κονδύλων σε σχέση με τον μάρτυρα.



Εικόνα 8

Εικόνα 8. Χλώρωση του κορυφαίου μεριστώματος σε στέλεχος φυτού πατάτας, έπειτα από τεχνητή μόλυνση, του κονδύλου.



Εικόνα 9

Εικόνα 9. Μεταφυτρωτική σήψη των φύτρων έπειτα από τεχνητή μόλυνση σε κόνδυλο πατάτας.



Εικόνα 10

Εικόνα 10. Προφυτρωτική σήψη ολόκληρου του κόνδυλου στο έδαφος.



Εικόνα 11

Εικόνα 11. Τεχνητές μολύνσεις σε ροδέλες πατάτας με επώαση στους 15 °C. Απουσία μόλυνσης – σήψης.



Εικόνα 12

Εικόνα 12. Περιορισμένη σήψη στις θέσεις μόλυνσης μετά από επώαση στους 20 °C.



Εικόνα 13

Εικόνα 13. Τεχνητές μολύνσεις σε ροδέλες πατάτας με επώαση στους 25 °C, παρατηρείται σήψη στις θέσεις μόλυνσης.



Εικόνα 14

Εικόνα 14. Τεχνητές μολύνσεις σε ροδέλες πατάτας με επώαση 30 °C, εμφάνιση χαρακτηριστικής σήψης με καστανόμαυρο περιθώριο.



Εικόνα 15

Εικόνα 15. Τεχνητές μολύνσεις σε ροδέλες πατάτας με επώαση στους 35 °C, παρατηρείται εκτεταμένη σήψη στις θέσεις μόλυνσης.



Εικόνα 16

Εικόνα 16. Τεχνητή μόλυνση σε φυτό καπνού με βακτηριακό στέλεχος του *Dickeya Solani*. Μόλυνση στη θέση εμφολιασμού και κούφιασμα της εντεριώνης.



Εικόνα 17

Εικόνα 17. Τεχνητή μόλυνση σε σπορόφυτο καλαμποκιού με στέλεχος του *Dickeya solani*. Παρατηρείται ανάπτυξη υδαρούς κηλίδας στη θέση εμφολιασμού, η οποία σταδιακά επεκτείνεται. Το φυτό κατέρρευσε σε διάστημα 5 ημερών.



Εικόνα 18

Εικόνα 18. Τεχνητές μολύνσεις σε φυτά χρυσάνθεμου, με βακτηριακά στελέχη του *Dickeya solani* *P. carotovorum* και *P. atrocepticum*. Τυπικά συμπτώματα αδροβακτηριώσεως



Εικόνα 19

Εικόνα 19. Τεχνητές μολύνσεις σε φυτό χρυσάνθεμου. Μάρανση, σήψη και μεταχρωματισμό στο στέλεχος.



Εικόνα 20

Εικόνα 20. Μοσχεύματα χρυσάνθεμου έπειτα από μόλυνση με το στέλεχος *D. dianthicola*, μάρανση των φύλλων, σήψη και νέκρωση της εντεριώνης.



Εικόνα 21

Εικόνα 21. Τεχνητή μόλυνση σε φύλλα σικορέ με βακτηριακά στελέχη 3378, 3385, 3388, 3395, 3048, 3211.



Εικόνα 22

Εικόνα 22. Τεχνητές μολύνσεις με βακτηριακά στελέχη 3383, 2222, 2098, 3738, σε μοσχεύματα γαρύφαλλου. Ανάπτυξη τυπικής συμπτωματολογίας.



Εικόνα 23

Εικόνα 23. Μόλυνση με τα βακτηριακά στελέχη 2222 και 3378 σήψη εντεριώνης μεταχρωματισμός αγγείων, 3733 απουσία μόλυνσης.



Εικόνα 24

Εικόνα 24. Τεχνητή μόλυνση με *Dickeya solani* σε φυτό πιπεριάς, σήψη και μάρανση.



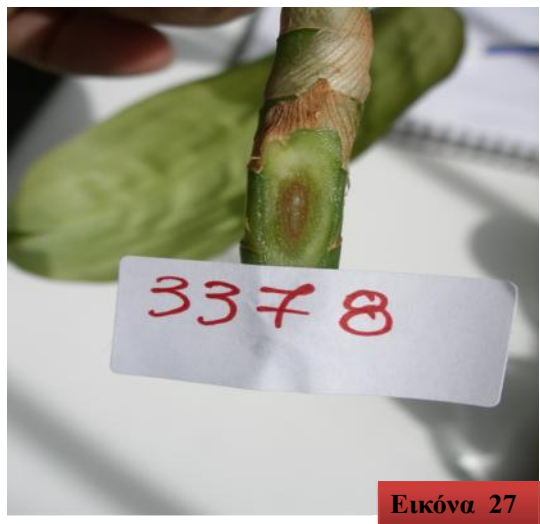
Εικόνα 25

Εικόνα 25. Τεχνητή μόλυνση με *Dickeya solani* σε φυτό πιπεριάς. Σήψη και νέκρωση εντεριώνης.



Εικόνα 26

Εικόνα 26. Τεχνητή μόλυνση με το βακτηριακό στέλεχος 624 σε φυτό μελιτζάνας, σήψη εντεριώνης η οποία επεκτείνεται πέρα από το σημείο μόλυνσης.



Εικόνα 27

Εικόνα 27. Τεχνητή μόλυνση με το βακτηριακό στέλεχος 3378 (*D. Solani*) σε φυτό διφεμπάχιας. Περιορισμός μόλυνσης στο σημείο εναπόθεσης, εμφάνιση μόνο καστανού μεταχρωματισμού.



Εικόνα 28

Εικόνα 28. Τεχνητή μόλυνση με *Dickeya solani* σε μοσχεύματα πελαργόνιου, περιορισμός μόλυνσης στο σημείο εναπόθεσης του μολύσματος και σε απόσταση λίγων εκατοστών.



Εικόνα 29

Εικόνα 29. Τεχνητή μόλυνση σε φυτά ρυζιού με *Dickeya solani*. Απουσία μόλυνσης.



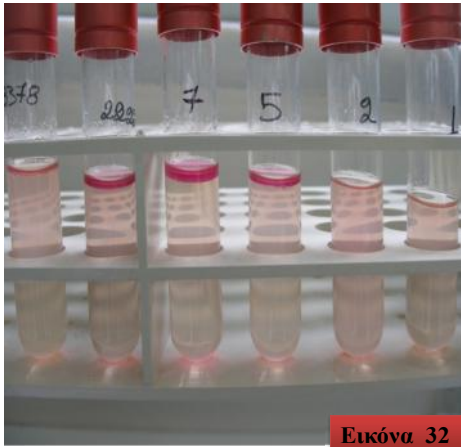
Εικόνα 30

Εικόνα 30. Τεχνητή μόλυνση με βακτηριακά στελέχη του *Dickeya solani* σε φυτό καλανχόης, παρατηρείται η ανάπτυξη υδαρούς κηλίδας στην αρχική θέση εμβολιασμού, η οποία σε διάστημα 2 έως 10 ημερών καταλήγει σε σήψη ή/και πλήρη αποδιοργάνωση των ιστών.



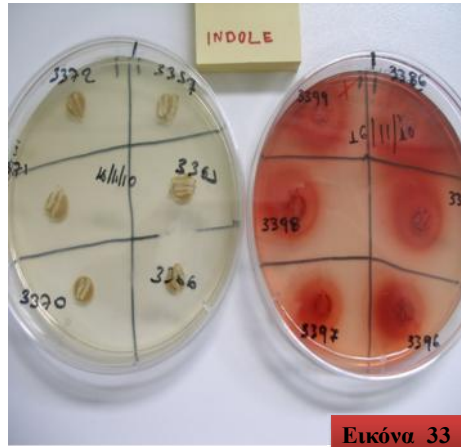
Εικόνα 31

Εικόνα 31. Τεχνητή μόλυνση σε φυτά ποινσέτίας, μάρανση φύλλων, σήψη και νέκρωση στελεχών του φυτού.



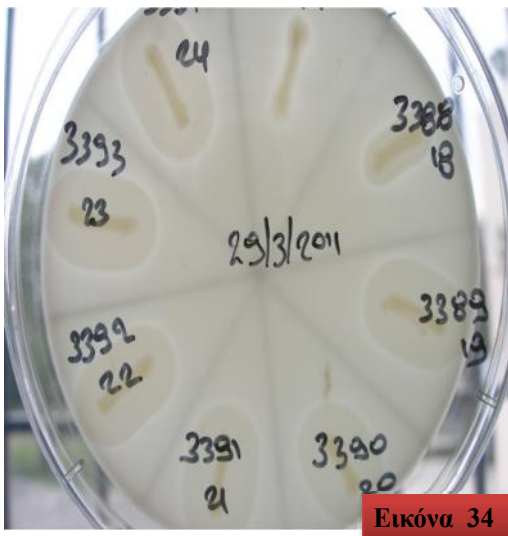
Εικόνα 32

Εικόνα 32. Δοκιμή παραγωγή ινδόλης σε υγρή καλλιέργεια από τα στελέχη 3378, 2222, 3372, 33370, 3357 και 3346.



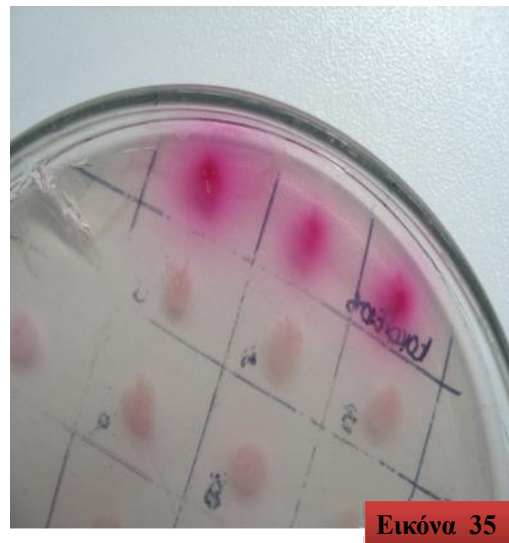
Εικόνα 33

Εικόνα 33. Δοκιμή παραγωγή ινδόλης σε στερεή καλλιέργεια.



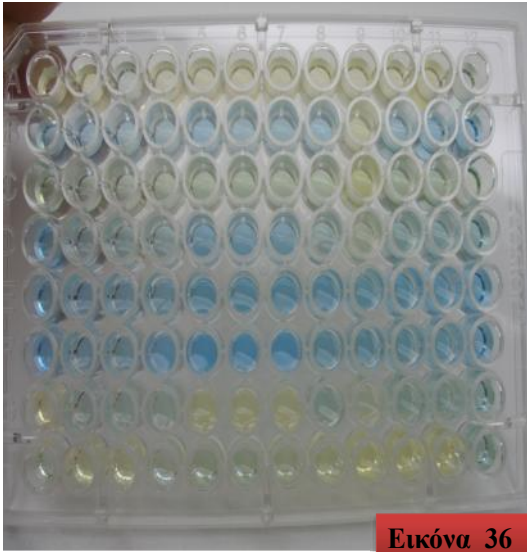
Εικόνα 34

Εικόνα 34. Δοκιμή υδρόλυσης λεκιθίνης.



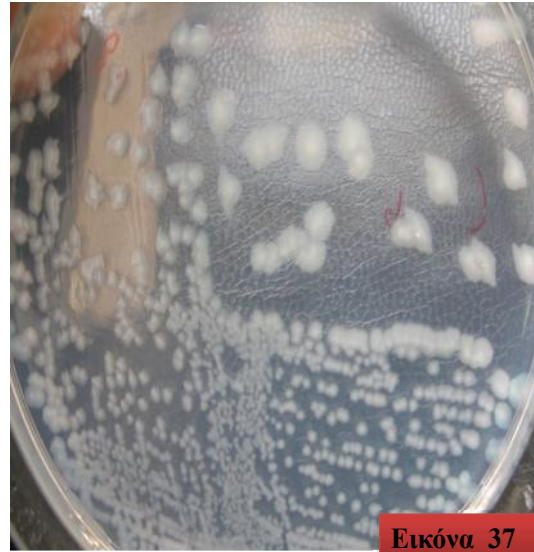
Εικόνα 35

Εικόνα 35. Δοκιμή παραγωγή φωσφατάσης σε καλλιέργεια βακτηρίων.



Εικόνα 36

Εικόνα 36. Βιοχημικές δοκιμές σε πλάκες μικροτιτλοδότησης (Costar, EIA/RIA Plate, 96 Well) με τα βακτηριακά στελέχη του *D. solani*, *P. carotovorum* και *P. atrosepticum*.



Εικόνα 37

Εικόνα 37. Αποικίες του βακτηρίου *Dickeya solani* με τη χαρακτηριστική όψη «τηγανιτού αυγού».