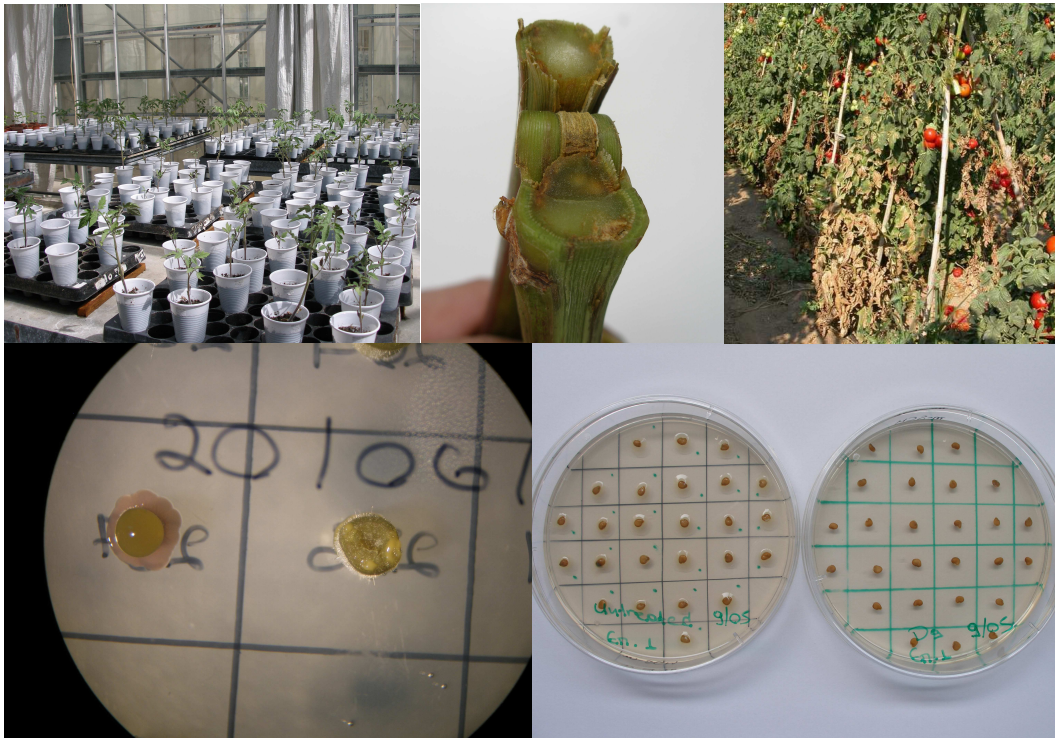


ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΘΕΡΜΟΚΗΠΙΑΚΩΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ ΚΑΙ
ΑΝΘΟΚΟΜΙΑΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Αξιολόγηση διαφόρων στελεχών του γένους *Bacillus* για
την καταπολέμηση του *Clavibacter michiganensis* subsp.
michiganensis σε σπόρο τομάτας



ΣΠΟΥΔΑΣΤΡΙΑ: ΚΛΑΡΑΚΗ ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ
ΕΙΣΗΓΗΤΡΙΑ: Δρ. ΚΑΣΕΛΑΚΗ ΑΝΝΑ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ
ΣΕΠΤΕΜΒΡΙΟΣ 2009

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΘΕΡΜΟΚΗΠΙΑΚΩΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ ΚΑΙ
ΑΝΘΟΚΟΜΙΑΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Αξιολόγηση διαφόρων στελεχών του γένους *Bacillus* για
την καταπολέμηση του *Clavibacter michiganensis* subsp.
michiganensis σε σπόρο τομάτας

ΣΠΟΥΔΑΣΤΡΙΑ: ΚΛΑΡΑΚΗ ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ
ΕΙΣΗΓΗΤΡΙΑ: Δρ. ΚΑΣΕΛΑΚΗ ANNA

ΗΡΑΚΛΕΙΟ
ΣΕΠΤΕΜΒΡΙΟΣ 2009

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ένα μεγάλο μέρος των καλλιεργούμενων φυτών προσβάλλονται από βακτήρια τα οποία προκαλούν συχνά σημαντικές ασθένειες. Η τομάτα *Lycopersicum esculentum* είναι ένα από τα πλέον ευπαθή λαχανικά με συνέπεια να προκαλούνται μεγάλες απώλειες σε υπαίθριες και θερμοκηπιακές καλλιέργειες. Η αντιμετώπιση των περισσότερων βακτηριολογικών ασθενειών και ειδικότερα των αδροβακτηριώσεων μετά την εγκατάσταση του παθογόνου στην καλλιέργεια είναι δύσκολή κυρίως λόγω της απουσίας δραστικών ουσιών αλλά και λόγω της βιολογίας των μικροοργανισμών αυτών. Έτσι σήμερα η αντιμετώπιση των ασθενειών αυτών βασίζεται στην χρησιμοποίηση προληπτικών μέτρων, το πιο βασικό ίσως από τα οποία είναι η χρησιμοποίηση υγιούς πολλαπλασιαστικού υλικού και πιο συγκεκριμένα για την τομάτα, σπόρου απαλλαγμένου από παθογόνα βακτήρια. Σκοπός της πειραματικής εργασίας μας ήταν να εξετάσουμε τη δυνατότητα αντιμετώπισης του βακτηρίου *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* που προκαλεί το βακτηριακό έλκος της τομάτας, σε σπόρους του φυτού με την εφαρμογή βιολογικών ανταγωνιστών του παθογόνου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ:

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	7
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	7
2. ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΗΜΕΙΑ ΤΗΣ ΑΣΘΕΝΕΙΑΣ	7
2.1. ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΑ ΔΙΑΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΗΣ ΠΡΟΣΒΟΛΗΣ	7
2.2. ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΑ ΔΕΥΤΕΡΟΓΕΝΩΝ ΠΑΡΕΓΧΥΜΑΤΙΚΩΝ ΠΡΟΣΒΟΛΩΝ	7
3. ΠΑΘΟΓΟΝΟ ΑΙΤΙΟ	9
ΤΑΥΤΟΤΗΤΑ	9
4. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ	10
4.1. ΕΙΣΟΔΟΣ ΠΑΘΟΓΟΝΟΥ	10
4.2. ΜΕΤΑΔΟΣΗ ΠΑΘΟΓΟΝΟΥ	10
4.3. ΕΠΙΒΙΩΣΗ ΠΑΘΟΓΟΝΟΥ	11
4.4. ΠΡΟΣΒΟΛΕΣ ΑΠΟ ΤΟΝ ΣΠΟΡΟ	11
ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΚΥΚΛΟΣ	11
ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ	142
ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ	142
6. ΚΑΤΑΠΟΛΕΜΗΣΗ	153
ΓΕΝΙΚΑ	153
6.1. ΚΑΛΛΙΕΡΓΗΤΙΚΑ ΜΕΤΡΑ:	164
6.2. ΧΡΗΣΗ ΠΙΣΤΟΠΟΙΗΜΕΝΟΥ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΤΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ	175
6.3. ΕΞΥΓΙΑΝΣΗ ΣΠΟΡΟΥ	175
6.3.1. ΕΜΒΑΠΤΙΣΗ ΣΕ ΘΕΡΜΟ ΝΕΡΟ	175

6.3.2. ΖΥΜΩΣΗ	186
6.3.3. ΧΡΗΣΗ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ	186
6.4. ΧΗΜΙΚΗ ΚΑΤΑΠΟΛΕΜΗΣΗ	186
6.5. ΕΝΑΛΛΑΚΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΤΑΠΟΛΕΜΗΣΗΣ	197
6.5.1.ΧΡΗΣΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ	197
6.5.2.ΧΡΗΣΗ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ	208
----- ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ -----	20
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	20
ΓΕΝΙΚΑ	20
1. ΔΟΚΙΜΕΣ ΒΛΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΤΟ ΣΠΟΡΟ	20
2. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΠΑΘΟΓΟΝΟΥ	22
3. ΕΛΕΓΧΟΣ ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑΣ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΤΟΥ <i>CLAVIBACTER MICHIGANENSIS</i> SUPSP. <i>MICHIGANENSIS</i> - 23 -1	
4. ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΤΕΧΝΗΤΑ ΜΟΛΥΣΜΕΝΟΥ ΣΠΟΡΟΥ	- 25 -3
5. ΕΠΕΜΒΑΣΕΙΣ ΣΤΟΥΣ ΣΠΟΡΟΥΣ	- 25 -3
ΠΕΙΡΑΜΑ 1 (IN VITRO ΜΕ ΤΕΧΝΗΤΑ ΜΟΛΥΣΜΕΝΟ ΣΠΟΡΟ)	- 26 -4
ΠΕΙΡΑΜΑ 2 (IN VIVO ΜΕ ΤΕΧΝΗΤΑ ΜΟΛΥΣΜΕΝΟ ΣΠΟΡΟ)	- 26 -4
ΠΕΙΡΑΜΑ 3 (ΦΥΣΙΚΑ ΜΟΛΥΣΜΕΝΟΣ ΣΠΟΡΟΣ)	- 27 -5
ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ	- 28 -6
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	- 29 -7
ΠΕΙΡΑΜΑ 1	- 29 -7
ΠΕΙΡΑΜΑ 2	- 29 -7
ΠΕΙΡΑΜΑ 3	- 30 -8

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ	30
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	32
ΠΗΓΕΣ ΑΠΟ INTERNET	33
ΦΩΤΟΓΡΑΦΙΚΟ ΥΛΙΚΟ	34

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το βακτηριακό έλκος που οφείλεται στο *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm), μια πολύ σοβαρή αδροβακτηρίωση, αποτελεί μια από τις σημαντικότερες ασθένειες της τομάτας, τόσο στις υπαίθριες όσο και στις υπό κάλυψη καλλιέργειες. Παρατηρήθηκε για πρώτη φορά το 1909 σε θερμοκηπιακή καλλιέργεια τομάτας (*Lycopersicon esculentum*), στην πολιτεία Michigan των Η.Π.Α, από την οποία πήρε το όνομά του το παθογόνο βακτήριο που προκαλεί την ασθένεια. Στην Ελλάδα εμφανίστηκε για πρώτη φορά το 1957 στην περιοχή της Πρέβεζας. Από τότε έχει επισημανθεί σε όλες τις περιοχές της χώρας που καλλιεργείται η τομάτα. Οι ζημιές από την ασθένεια μπορεί να φτάσουν το 80% της παραγωγής [11].

2. ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΗΜΕΙΑ ΤΗΣ ΑΣΘΕΝΕΙΑΣ

Γενικά, το Cmm προκαλεί διασυστηματική προσβολή στα φυτά της τομάτας. Το παθογόνο όμως μπορεί να προκαλέσει κηλίδες πάνω στα φύλλα και στους καρπούς ως αποτέλεσμα τοπικής μόλυνσης, συνήθως σε συνθήκες υψηλής υγρασίας σε αρδεύσεις με υψηλή καταιόνηση. Υπάρχει μια εκτεταμένη σειρά συμπτωμάτων η οποία εξαρτάται από τη τοποθεσία της καλλιέργειας και της μόλυνσης (θερμοκήπιο ή αγρός), την ηλικία του φυτού κατά την προσβολή, καλλιεργητικές τεχνικές, καλλιεργητής κ.α. Τέλος, υπάρχουν στελέχη που παράγουν λιγότερο έντονα συμπτώματα [4].

2.1. Συμπτώματα διασυστηματικής προσβολής

Οι πρωτογενείς μολύνσεις προέρχονται από μολυσμένους σπόρους ή από εισβολή του αγγειακού ιστού των νεαρών φυτών [17].

Το είδος και η έκταση των συμπτωμάτων ποικίλλουν ανάλογα με τις συνθήκες του περιβάλλοντος, την ποικιλία και την ηλικία των φυτών. Τα φυτάρια στο σπορείο παρουσιάζουν συνήθως μαρασμό και αποξηραίνονται. Αν όμως επιζήσουν

παρουσιάζουν έντονο νανισμό. Πολλές φορές τα πρώτα συμπτώματα εμφανίζονται μετά την μεταφύτευσή [11].

Στα μεγαλύτερης ηλικίας φυτά παρατηρείται το σύνδρομο του βραδέως μαρασμού. Πολλά φύλλα, ιδίως τα κατώτερα, μαραίνονται βαθμιαίως. Ο μαρασμός εκδηλώνεται με μορφή ημιπληγίας, η περιφέρεια του ελάσματος των φύλλων μαραίνεται και συστρέφεται προς τα επάνω (εικ.5, 6& 8) [11].

Το φύλλωμα της τοματιάς που έχει μολυνθεί από το παθογόνο βακτήριο του έλκους εμφανίζει ευδιάκριτες μαύρες περιφερειακές ξηράνσεις χωρίς στίγματα πάνω στο εσωτερικό μέρος των φύλλων. Μερικές φορές εμφανίζεται μια λεπτή κίτρινη ζώνη ανάμεσα στις νεκρές παρυφές των φύλλων και στον υγιή ιστό [17].

Χαρακτηριστικό σύμπτωμα της ασθένειας είναι ο κίτρινος μέχρι καστανός μεταχρωματισμός των αγγείων σε ολόκληρο το μήκος των προσβεβλημένων βλαστών και μίσχων των φύλλων . Σε εγκάρσια τομή στη βάση μίσχου φύλλου παρατηρείται καστανός μεταχρωματισμός των αγγείων ημισελινοειδούς μορφής ή πετάλου ίππου (εικ.2-3). Οι μεταχρωματισμένοι ιστοί εμφανίζουν μαλακή σήψη. Στα προχωρημένα στάδια της προσβολής καταστρέφεται ο φλοιός των βλαστών και σχίζεται η επιδερμίδα με αποτέλεσμα να σχηματίζονται επιμήκη ανοικτά έλκη στην επιφάνεια του στελέχους (εικ.4). Η παρουσία τέτοιων ελκών είναι χαρακτηριστική της ασθένειας [11].

Σε σοβαρές μολύνσεις ένα κίτρινο παχύρρευστο υγρό μπορεί να εκκριθεί αν ένας βλαστός κοπεί εγκάρσια και πιεστεί [17].

Ο καρπός μπορεί να αναπτύξει σχετικά μικρά στίγματα με κέντρα χρώματος ανοιχτού καφέ, που γενικά περιβάλλονται από έναν λιπαρό λευκό δακτύλιο (διαμέτρου 3-6 mm). Αυτά είναι γνωστά ως στίγματα «μάτι πτηνού» (εικ.7). Με τις βλάβες από το βακτηριακό έλκος, αυτός ο λευκός δακτύλιος γενικά παραμένει καθώς ο καρπός ωριμάζει, ενώ στην περίπτωση του βακτηριακού στίγματος, εξαφανίζεται με το χρόνο. Το βακτηριακό έλκος μπορεί επίσης να κάνει πιο σκούρους τους αγγειακούς ιστούς μέσα στον καρπό. Ο καρπός μπορεί να εμφανίζει μικρά μαύρα στίγματα στις αγγειακές δεσμίδες κάτω από το σημάδι αποκοπής του κάλυκα. Το βακτήριο του έλκους μπορεί να αναπτυχθεί στις αγγειακές δεσμίδες μέσα στον καρπό, μέχρι τους σπόρους. Αυτό μπορεί να προκαλέσει ορατές κίτρινες ίνες από το βλαστό στους σπόρους και εσωτερικές μολύνσεις στους σπόρους [17].

2.2. Συμπτώματα δευτερογενών παρεγχυματικών προσβολών

Εδώ το παθογόνο εισέρχεται στους ιστούς από τα στομάτια, τα φακίδια και τα τριχίδια όταν οι συνθήκες είναι υγρές και ο καιρός βροχερός και προκαλεί τοπικές μολύνσεις (κηλιδώσεις) στους παρεγχυματικούς ιστούς. Στο έλασμα των φύλλων, στους μίσχους, στα στελέχη και τους κάλυκες των ανθέων, παρατηρούνται κυκλικές υπερυψωμένες φλυκταινώδεις κηλίδες ανοιχτού καστανού χρώματος με ανώμαλη επιφάνεια και φελλώδη υφή. Στους καρπούς σχηματίζονται κηλίδες κυκλικές, χρώματος αρχικά υπόλευκου και στην συνέχεια καστανού που περιβάλλονται από μία υπόλευκη άλω. Οι κηλίδες είναι διαμέτρου 3-6 mm που συχνά σχίζονται στο κέντρο και μοιάζουν με «μάτι πτηνού» . Προσβολή του καρπού μπορεί να γίνει και μέσω των αγγείων και τέτοιοι καρποί συνήθως παραμένουν μικροί, παραμορφωμένοι και με αλλοιωμένη απόχρωση κατά θέσεις, ιδίως όταν η προσβολή γίνει στο στάδιο της έντονης ανάπτυξης [11].

3. ΠΑΘΟΓΟΝΟ ΑΙΤΙΟ

Ταυτότητα

Όνομα: *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*

Συνώνυμα: *Corynebacterium michiganense* subsp. *michiganense*,

Ταξινομική κατάταξη: βασίλειο: *Procaryotae*, Division II *Firmicutes*, Class I *Firmibacteria*. Το γένος *Clavibacter* περιλαμβάνει όλα τα φυτοπαθογόνα με βακτηριακά κύτταρα κορνοειδούς σχήματος (στα οποία η πεπτιδογλυκάνη του κυτταρικού τοιχώματος περιλαμβάνει 2,4-διαμινοβουτυρικό οξύ ως διβασικό αμινοξύ). Είναι αυστηρά αερόβιο βακτήριο, θετικό κατά Gram, δεν παράγει ενδοσπόρια, έχει άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης 25-30°C και σχετική υγρασία μεγαλύτερη από 80%. Οι μολύνσεις των περισσότερων ειδών *Clavibacter* είναι εξ αρχής διασυστηματικές ή γίνονται όταν το παθογόνο φθάσει στα αγγεία του ξύλου [4]. Το Cmm είναι βραδείας ανάπτυξης δεν έχει αυτόνομη κίνηση και αναπτύσσει ομαλές, στρογγυλές, κίτρινες αποικίες με ολόκληρα περιθώρια. Εντούτοις, φαινότυποι αποικιών με χρώμα άσπρο, ρόδινο, κόκκινο και πορτοκαλί εμφανίζονται μετά από μεταλλάξεις [7]. Το ελάχιστο pH για την ανάπτυξη του Cmm έχει αναφερθεί ότι είναι 4,6-5,0 [3].

Η τομάτα είναι ο κυριότερος ξενιστής, αλλά σε μερικές περιπτώσεις φυσικές μολύνσεις μπορεί να εμφανιστούν και σε άλλα είδη της οικογένειας *Solanaceae*,

όπως τα φυτά *Solanum mammosum*, *Solanum douglasii*, *Solanum nigrum* και *Solanum triflorum*. και σε ζιζάνια του γένους *Solanum*. Σαν ξενιστές του παθογόνου σε τεχνητές μολύνσεις αναφέρονται ακόμη και άλλα σολανώδη ή φυτά άλλου γένους, π.χ. *Datura stramonium*, *Chenopodium album* και *Amaranthus retroflexus* που έχουν αναγνωρισθεί ως πηγές μολύσματος για επιφυτική επιβίωση και εξάπλωση. Η σπουδαιότητα αυτών των επιφυτικών πληθυσμών δεν έχει γίνει πλήρως κατανοητή, αν και φαίνονται να συμβάλλουν στην προσβολή μέσω των τομών κλαδεύματος [4].

4. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ

4.1. Είσοδος παθογόνου

Τα κύρια στοιχεία του βιολογικού κύκλου του παθογόνου αποτυπώνονται στην εικόνα 1. Κατά την διασυστηματική προσβολή το παθογόνο μπαίνει στο φυτό από πληγές στις ρίζες και το λαιμό που προκαλούνται από έντομα, νηματώδεις αλλά και κατά την μεταφύτευση και τις καλλιεργητικές φροντίδες. Αρχικά εγκαθίσταται στα αγγεία του ξύλου και στη συνέχεια στο φλοιό και την εντεριώνη και προκαλεί την διασυστηματική προσβολή. Στην περίπτωση των δευτερογενών παρεγχυματικών μολύνσεων, η είσοδος του παθογόνου γίνεται από τα φυσικά ανοίγματα (στομάτια, φακίδια, τριχίδια), το τρίχωμα του φυλλώματος και διάφορες υπέργειες πληγές ή λύσεις της συνέχειας της επιδερμίδας (π.χ. πληγές από την αποφύλλωση και την συγκομιδή) οι οποίες σπανιότερα μπορούν να καταστούν διασυστηματικές. Διασπορά μολυσμάτων στο έδαφος γίνεται με το νερό του ποτίσματος και τα καλλιεργητικά εργαλεία [11].

4.2. Μετάδοση παθογόνου

Το βακτήριο μεταφέρεται με τον σπόρο, εσωτερικά και εξωτερικά αυτού. Εσωτερικά το παθογόνο εντοπίζεται γύρω από το έμβρυο, όπου φθάνει δια μέσου της μικροπύλης. Οι μολυσμένοι σπόροι είναι δυνατό να μην εκδηλώσουν αμέσως την προσβολή αφού δίνουν φυτάρια φαινομενικά υγιή, στα οποία η ασθένεια θα εμφανιστεί συνήθως μόνο σε προχωρημένο στάδιο ανάπτυξης. Φυσικά μολυσμένος σπόρος σε αναλογία 1:10.000 μπορεί να οδηγήσει σε επιδημική εκδήλωση της ασθένειας στον αγρό εφόσον επικρατήσουν ευνοϊκές συνθήκες, ενώ η μετάδοση μπορεί να γίνει και με μολυσμένα φυτάρια (σπορόφυτα). Σήμερα, ιδιαίτερα σημαντικό

ρόλο στη μετάδοση του παθογόνου φαίνεται ότι έχουν τα εμβολιασμένα σπορόφυτα λόγω της μεγάλης συχνότητας μετάδοσης του παθογόνου κατά την διαδικασία του εμβολιασμού. Άλλοι τρόποι μεταφοράς του βακτηρίου είναι με τον άνεμο, τη βροχή ή την άρδευση με υψηλή καταιόνηση, παράγοντες που είναι υπεύθυνοι για τις επιφανειακές μολύνσεις, τα συμπτώματα των οποίων γίνονται ορατά μερικές μέρες αργότερα [10].

Στον αγρό μεταδίδεται με τα εργαλεία κλαδέματος μέσω των τομών που δημιουργούνται από το κλάδεμα, ενώ στο έδαφος η διασπορά του μολύσματος γίνεται με το νερό του ποτίσματος τα καλλιεργητικά εργαλεία και τα έντομα [11].

4.3. Επιβίωση παθογόνου

Το παθογόνο μπορεί να επιβιώσει για αρκετούς μήνες σε μολυσμένα υπολείμματα καλλιεργειών, λιγότερο στα θαμμένα υπολείμματα σε σχέση με αυτά που βρίσκονται στην επιφάνεια του εδάφους, στα οποία η αποσύνθεση είναι πιο αργή και είναι μικρότερη η αλληλεπίδραση με άλλους μικροοργανισμούς. Επίσης αντέχουν και επιβιώνουν σε ξηρές συνθήκες στον εξοπλισμό, σε κουτιά και στα υλικά υποστύλωσης του θερμοκηπίου [4].

Μπορεί επίσης να παραμείνει σε θερμοκήπιο αλλά και στο χωράφι, όταν οι καλλιέργειες είναι συνεχείς κατά την διάρκεια του έτους. Τέλος, το παθογόνο επιβιώνει στα υλικά υποστύλωσης των φυτών, στα εργαλεία και στα ζιζάνια [11].

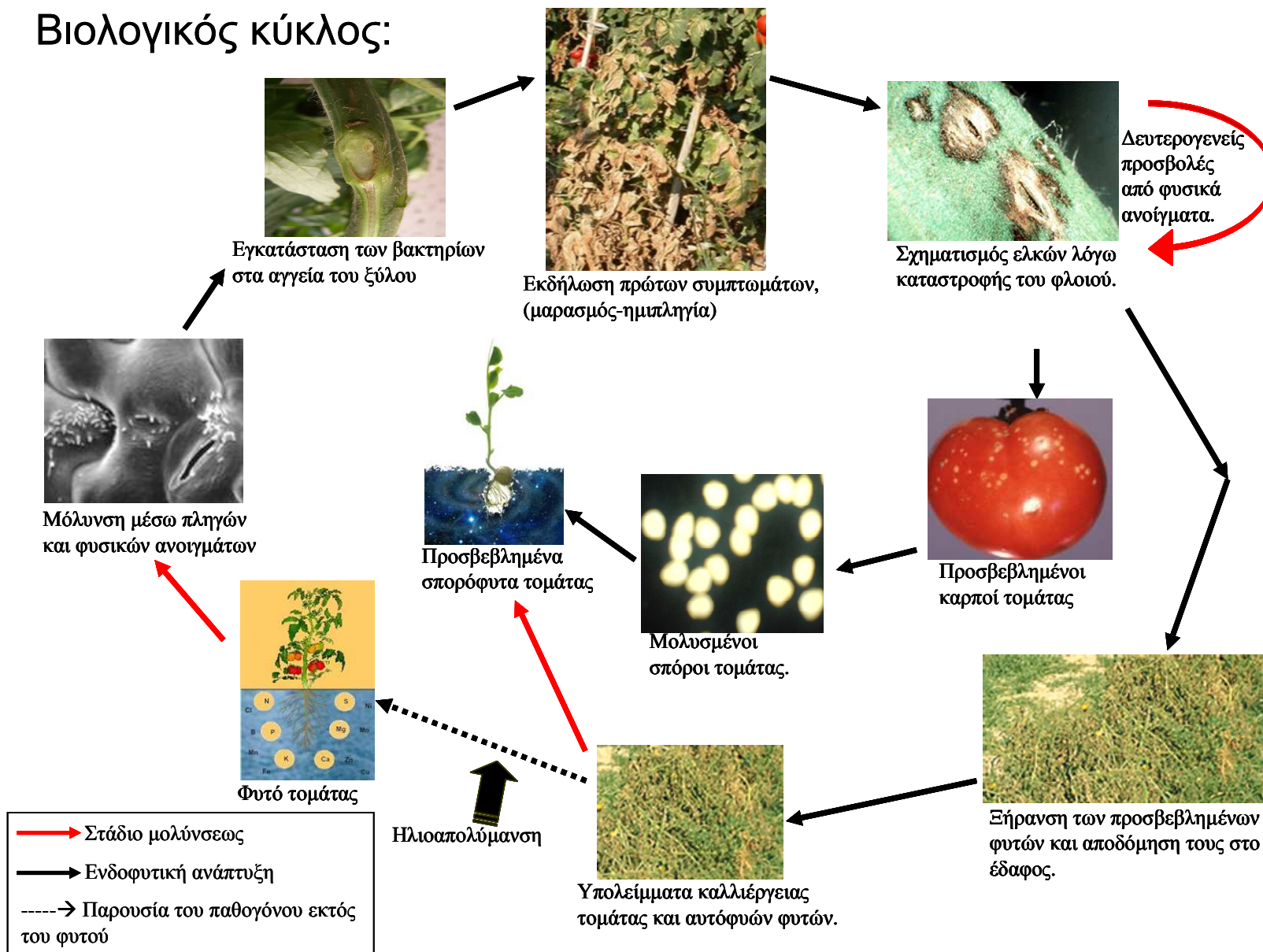
4.4. Προσβολές από τον σπόρο

Ο σπόρος είναι ο κύριος παθητικός φορέας του παθογόνου, διευκολύνοντας στο εμπόριο την διασπορά της ασθένειας σε μεγάλο πληθυσμό φυτών. Η Ευρωπαϊκή Κοινότητα το αντιμετωπίζει σαν οργανισμό καραντίνας και αναφέρει προστατευτικά μέτρα ενάντια στην εισαγωγή και την εξάπλωση του βακτηρίου, καθώς επίσης απαγορεύει την παρουσία του σε φυτά ή προϊόντα φυτών που προορίζονται για φύτευση [2].

Το βακτήριο μπορεί να υπάρχει στην επιφάνεια του σπόρου, καθώς και στο εσωτερικότερο στρώμα του περικαρπίου. Αυτό καθιστά δυσκολότερη την εξάλειψη του οργανισμού του έλκους με επεμβάσεις στους σπόρους, σε σχέση με άλλα παθογόνα που προκαλούν στίγματα και μικροκηλίδες [17].

Το βακτηριακό έλκος είναι πιο δύσκολο να ανιχνευτεί αξιόπιστα, απ' ό,τι πολλοί άλλοι οργανισμοί που προκαλούν ασθένειες. Σύμφωνα με πρόσφατη έρευνα του Πανεπιστημίου της Αϊόβα, το όριο ανίχνευσης με τη χρήση πρότυπων μεθόδων ελέγχου ήταν 1:3.000 έως 1:10.000 (ένας μολυσμένος σπόρος ανά 10.000) [17].

Βιολογικός κύκλος:



Εικόνα 1. Βιολογικός κύκλος του *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*

5. ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ-ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ

Ανίχνευση

Η ανάπτυξη νέων τεχνικών οι οποίες έχουν επικυρωθεί, είναι ουσιαστική για την ανίχνευση μολυσμένων σπόρων. Αυτές οι τεχνικές πρέπει να συγκρίνονται με αναγνωρισμένες μεθόδους πριν από την ευρεία αποδοχή τους. Η απομόνωση από δείγμα σπόρου συχνά είναι δύσκολή, επειδή το βακτήριο είναι βραδείας ανάπτυξης και μπορεί να πάρει περισσότερες από 10 μέρες για την αρχική απομόνωση. Επιπλέον υπάρχει πιθανότητα γρηγορότερης ανάπτυξης άλλων μικροοργανισμών, με αποτέλεσμα το *Cmm* να μην μπορέσει να ανταγωνισθεί τους οργανισμούς αυτούς και να μην καταφέρει να αναπτυχθεί, δίνοντας έτσι ψεύτικα αρνητικά αποτελέσματα στην μέθοδο ανίχνευσης [2].

Η διαδικασία για την διάγνωση περιλαμβάνει την απομόνωση από μολυσμένο ιστό, πιθανή ανίχνευση με γρήγορη δοκιμή (rapid test), ταυτοποίηση της απομόνωσης και προσδιορισμό της παθογένειας του. Ένα τεστ στους σπόρους συγκεκριμένα πραγματοποιείται με καλλιέργεια σε επιλεκτικά υποστρώματα και κατόπιν ταυτοποίηση με απομονώσεις και προσδιορισμό της παθογένειας. Ο ανοσοφθορισμός και η εφαρμογή PCR, σε συνδυασμό με βιοδοκιμές σε φυτάρια τομάτας, μπορούν να φανούν χρήσιμα σαν βοηθητικές δοκιμές. Η ανίχνευση του *Cmm* στα νεαρά φυτάρια είναι αμφίβολη, καθώς η περιοχή του παθογόνου (ρίζα, βλαστός ή φύλλα) εξαρτάται από τις συνθήκες καλλιέργειας των φυταρίων [4].

Ανοσομαγνητικός διαχωρισμός ακολουθούμενος από διαδοχικές καλλιέργειες (IMS-plating) είναι ένας συνδυασμός ανοσολογικής και καλλιεργητικής μεθόδου στην οποία εφαρμόζεται ορολογική αναγνώριση για να παγιδευτούν κύτταρα-στόχοι, τα οποία στην συνέχεια θα καλλιεργηθούν σε μη εκλεκτικά μέσα. Προτάθηκε σαν μια κατάλληλη μέθοδος για τον έλεγχο του *Cmm* σε δείγμα σπόρων τομάτας [2].

Ταυτοποίηση

Εάν δεν αναπτυχθούν οι τυπικές αποικίες από τους σπόρους με τις παραπάνω μεθόδους ή με την βιοδοκιμή, τότε η διάγνωση μας είναι αρνητική. Για τους άλλους τύπους φυτικών ιστών, εάν έστω και ένα από τα τεστ διάγνωσης είναι θετικό, αλλά δεν έχουν αναπτυχθεί τυπικές αποικίες από τις απομονώσεις, τότε ξανά γίνονται απομονώσεις από τους φυτικούς ιστούς. Η ταυτοποίηση της καλλιέργειας *Cmm*

γίνεται όταν ένα θετικό αποτέλεσμα συσχετιστεί από τουλάχιστον δυο τεστ από δυο διαφορετικά χαρακτηριστικά του παθογόνου. (βιοχημικός χαρακτηρισμός, ELISA, δοκιμή δημιουργίας συσσωματωμάτων, ανοσοφθορισμός, PCR, ή FAP) [4].

6. ΚΑΤΑΠΟΛΕΜΗΣΗ

ΓΕΝΙΚΑ

Η αντιμετώπιση των βακτηρίων παρουσιάζει αρκετές δυσκολίες γιατί δεν υπάρχουν δραστικά φάρμακα, τα βακτήρια πολλαπλασιάζονται πολύ γρήγορα, δημιουργούν εύκολα ανθεκτικά στελέχη και δεν είναι απόλυτα γνωστή η βιολογία τους. Επιπλέον οι βακτηριακές προσβολές μπορεί να είναι ασυμπτωματικές και επίσης οι πηγές μόλυνσης των φυτών να είναι πολλές [19].

Για την αποτελεσματική διαχείριση της ασθένειας είναι σημαντικό να γνωρίζουμε πώς δρουν τα βακτηριακά παθογόνα. Εξαπλώνονται κυρίως με το νερό και μπορούν να μεταφερθούν σε μεγάλες αποστάσεις με την βροχή που παρασύρεται από τον άνεμο. Η άρδευση με καταιονισμό επίσης προάγουν τη διασπορά των βακτηρίων. Στην επιφάνεια του φυτού, τα βακτήρια εισχωρούν στο εσωτερικό από πληγές ή ένα φυσικά ανοίγματα. Τα βακτήρια πολλαπλασιάζονται πολύ πιο γρήγορα από τους μύκητες: υπό ιδανικές συνθήκες παράγουν μια νέα γενιά κάθε 90 λεπτά [17].

Αν και τα βακτήρια είναι σχετικώς εύκολο να εξολοθρευτούν με απολυμαντικά επιφανειών, σε νεκρωμένο ιστό, είναι δύσκολο να εξαλειφθούν σε φυτά. Τυπικά, τα απολυμαντικά δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην καλλιέργεια, διότι ίσως να βλάψουν τους φυτικούς ιστούς. Τα βακτήρια στο εσωτερικό των φύλλων (στα στόματα, στα υδατώδη ή σε πληγές), ακόμη και μέσα σε σχισμές πάνω στην επιφάνεια των φύλλων προστατεύονται και συνεχίζουν να πολλαπλασιάζονται [17].

Οι στρατηγικές διαχείρισης για τον έλεγχο της βακτηριακής ασθένειας της τομάτας πρέπει να περιλαμβάνουν μια πολύπλευρη προσέγγιση. Εφόσον μετά την εγκατάστασή του, το βακτήριο είναι δύσκολο να εξαλειφθεί από την καλλιέργεια, το πρώτο βήμα είναι να προσπαθήσουμε να το κρατήσουμε εκτός εξ αρχής. Προς το παρόν δεν έχουμε μια μέθοδο, που να μπορεί με χαμηλό κόστος να ελέγξει αρκετά νεαρά φυτά, έτσι ώστε να είμαστε σίγουροι ότι δεν υπάρχουν παθογόνα, άρα πρέπει

επίσης να εφαρμόσουμε ένα πρόγραμμα πρόληψης νωρίς κατά την ανάπτυξη της καλλιέργειας [17].

6.1. Καλλιεργητικά μέτρα:

Είναι τα κυριότερα μέσα που διαθέτει ο παραγωγός για την αντιμετώπιση των βακτηρίων. Η εφαρμογή καλλιεργητικών μέτρων αποσκοπεί στην παρεμπόδιση της εγκατάστασης του παθογόνου στην καλλιέργεια. Στη σημαντική μείωση των αρχικών εστιών μόλυνσης και στην αποφυγή της διάδοσης του παθογόνου. Τα μέσα αυτά χρησιμοποιούνται για την αντιμετώπιση και άλλων μικροοργανισμών και περιλαμβάνουν:

- Εφαρμογή αμειψισποράς (2-3 χρόνια). Όταν αυτό δεν είναι εφικτό, να γίνεται απολύμανση του εδάφους με την μέθοδο της ηλιοαπολύμανσης. Αποτελέσματα ερευνών έδειξαν ότι σε διάρκεια 30 ημερών ηλιοαπολύμανσης με αδιαφανή πλαστικά μειώθηκε σημαντικά το βακτηριακό μόλυσμα, και μειώθηκε σημαντικά η % εμφάνιση της ασθένειας σε φυτά τομάτας (από 50% σε 10%) [20],
- Άμεσο ξερίζωμα και κάψιμο των ύποπτων ή προσβεβλημένων φυτών μόλις εντοπιστούν και καταστροφή των υπολειμμάτων της καλλιέργειας με φωτιά εκτός του αγρού [19],
- Εφαρμογή ισορροπημένης λίπανσης και αποφυγή της υπερβολικής αζωτούχας λίπανσης [19],
- απολύμανση των χρησιμοποιούμενων εργαλείων κλαδέματος με φορμόλη, οινόπνευμα και απολύμανση του εσωτερικού του θερμοκηπίου πριν την εγκατάσταση της καλλιέργειας ψεκάζοντας με διάλυμα φορμόλης 4% [19],
- Καταστροφή υπολειμμάτων των φυτών μαζί με το ριζικό σύστημα [19],
- Κλάδεμα, εφόσον κρίνεται αναγκαίο, με απόσπαση των βλαστών με το χέρι ή με εργαλεία κλαδέματος. Αμέσως μετά το κλάδεμα να γίνεται ψεκάσμος των φυτών με ένα χαλκούχο σκεύασμα (βορδιγάλειος πολτός, οξυχλωριούχος χαλκός, υδροξειδίο του χαλκού) [19],
- Καταπολέμηση σολανωδών ζιζανίων- ξενιστών [19],
- Το νερό του ποτίσματος να μην διέρχεται από προσβεβλημένες φυτείες [19],
- Αποφυγή επαναφύτευσης σε έδαφος που είχε εμφανιστεί η ασθένεια [19],

- Μείωση της σχετικής υγρασίας στο χώρο του θερμοκηπίου και επαρκής εξαερισμός τους [19].

6.2. Χρήση πιστοποιημένου πολλαπλασιαστικού υλικού

- ↪ Σπορά πιστοποιημένου σπόρου (να έχει ελεγχθεί για την απουσία του παθογόνου ή να έχει γίνει η κατάλληλη επέμβαση για την αποφυγή του),
- ↪ Φύτευση υγιών σπορόφυτων ή εμβολιασμένων φυτών που προέρχονται από αξιόπιστους φυτωριακούς οίκους,
- ↪ Επιλογή ανθεκτικών ποικιλιών.

6.3. Εξυγίανση σπόρου

Η εξυγίανση του σπόρου έχει ως σκοπό την θανάτωση του παθογόνου βακτηρίου το οποίο επιβιώνει στο σπόρο. Ένας μόνο μολυσμένος σπόρος ανάμεσα σε 10.000 μπορεί να είναι αρκετός για να προκαλέσει ξέσπασμα της ασθένειας εφόσον επικρατήσουν ευνοϊκές συνθήκες για το παθογόνο, με καταστροφικές συνέπειες για τους παραγωγούς [17]. Έχουν γίνει αρκετές έρευνες και πειράματα έτσι ώστε να βρεθεί ένας αποτελεσματικός τρόπος εξυγίανσης του σπόρου για να αποφευχθούν τέτοιου είδους συνέπειες από την χρήση μολυσμένου σπόρου. Μια αποτελεσματική επέμβαση στους σπόρους πρέπει να καταστρέψει το βακτήριο, στο εξωτερικό και το εσωτερικό του σπόρου. Η εξυγίανση στους σπόρους επιτυγχάνεται με τις εξής επεμβάσεις: εμβάπτιση σε θερμό νερό, ζύμωση και με χρήση αντιβιοτικών.

6.3.1. Εμβάπτιση σε θερμό νερό

Η μέθοδος του ζεστού νερού είναι η λιγότερο επιθυμητή, επειδή η θερμοκρασία και η διάρκειά της περιορίζονται από την ανάγκη να κρατήσουμε τους σπόρους βιώσιμους. Από την άλλη πλευρά, η επέμβαση με το ζεστό νερό μπορεί να γίνει επιτόπου στον αγρό, με εξοπλισμό που είναι σχετικά εύκολο να αποκτηθεί, και είναι ένα μέτρο καταπολέμησης. Οι οδηγίες πρέπει να ακολουθούνται προσεκτικά, ώστε να ελαχιστοποιηθούν οι βλάβες στους σπόρους. Ακόμα και έτσι όμως μπορεί να υπάρξουν σημαντικές απώλειες στη βλαστικότητα των σπόρων. Οι σπόροι προθερμαίνονται για 10 λεπτά σε νερό με θερμοκρασία 37°C και στην συνέχεια τοποθετούνται σε ζεστό νερό στους 50°C σταθερά για 25 λεπτά. Τέλος, τοποθετούνται για 5 λεπτά σε κρύο νερό και κατόπιν στεγνώνονται σχολαστικά. Αναμένεται απώλεια 5% - 10% στη βλαστικότητα των βιώσιμων σπόρων [17].

6.3.2. Ζύμωση

Οι σπόροι της τομάτας συνήθως εξάγονται μετά από πολτοποίηση του καρπού και αφότου αυτός αφεθεί σε ζύμωση για 24 ώρες ή περισσότερο. Τέτοια ζύμωση έχει βρεθεί ότι μειώνει το ποσοστό των μολυσμένων σπόρων ανά παρτίδα. Βρέθηκε επίσης ότι υπήρξε βελτιωμένη αποτελεσματικότητα της εξαγωγής σπόρων ντομάτας μέσω της επέμβασης στο πολτό σε συνδυασμό με χημικά μέσα (πχ. υδροχλωρικό οξύ) [3].

6.3.3. Χρήση αντιβιοτικών

Το ενδιαφέρον για την επέμβαση στους σπόρους με αντιβιοτικά (όπως η στρεπτομυκίνη κ.α.) μειώνεται τώρα, λόγω των ανησυχιών για την ανάπτυξη και μετάδοση ανθεκτικότητας στα φάρμακα [3].

6.4. Χημική καταπολέμηση

Η εφαρμογή χημικής καταπολέμησης για την αντιμετώπιση του βακτηρίου αποτελεί μια αποτελεσματική και πρακτική μέθοδο. Παρόλα αυτά πρέπει να χρησιμοποιείται σαν έσχατη λύση κυρίως γιατί δημιουργεί προβλήματα στο περιβάλλον καθώς και στην υγεία του ανθρώπου, ενώ παράλληλα εμφανίζονται ανθεκτικά στελέχη του παθογόνου. Επίσης το κόστος εξακολουθεί να είναι υψηλό και τέλος απαιτούνται επαναλαμβανόμενες εφαρμογές.

Ένα από τα χημικά σκευάσματα που μπορούν να χρησιμοποιηθούν και να είναι αποτελεσματικά σύμφωνα με έρευνες που έχουν γίνει είναι ο χαλκός. Είναι κοινή πρακτική να ξεκινά ένα εντατικό πρόγραμμα ψεκασμού με χαλκό μόλις εμφανιστούν συμπτώματα της ασθένειας. Έρευνες έδειξαν ότι οι διαφυλλικοί ψεκασμοί με χαλκό μειώνει τον αριθμό των βακτηριακών κυττάρων στη φυλλική επιφάνεια. Η δράση του στερεού χαλκού στα βακτήρια οφείλεται στα ελεύθερα ιόντα του χαλκού στο διάλυμα του ψεκασματος, η συγκέντρωση των οποίων αλλάζει με το pH. Αναλόγως με την ένταση της ασθένειας, το μέγεθος και το ρυθμό ανάπτυξης των φυτών, μπορεί να χρειάζεται ψεκασμός κάθε 7 μέρες ή λιγότερες. Ο ψεκασμός με χαλκό είναι λιγότερο αποτελεσματικός, έως αναποτελεσματικός, όταν μεγαλώνει το χρονικό διάστημα ανάμεσα στους ψεκασμούς [17].

Τέλος πολλές έρευνες στη Βόρεια Αμερική έδειξαν ότι η συνδυασμένη εφαρμογή mancozeb με χαλκό είναι ιδιαίτερα αποτελεσματική στην καταπολέμηση της ασθένειας [17].

Το κύριο μειονέκτημα της χημικής καταπολέμησης είναι οι επιζήμιες επιπτώσεις της στο περιβάλλον (πχ. αφανισμός των ωφέλιμων μικροοργανισμών-εντόμων). Για το λόγο αυτό έχουν ενταθεί οι έρευνες για την εξεύρεση εναλλακτικών μεθόδων καταπολέμησης, φιλικών για το περιβάλλον.

6.5. Εναλλακτικές μέθοδοι καταπολέμησης

6.5.1.Χρήση χημικών ουσιών

Μια μέθοδος εναλλακτικής καταπολέμησης του *Cmm* είναι η εφαρμογή χημικών ουσιών στο σπόρο. Σύμφωνα με έρευνες που έχουν γίνει, χρησιμοποιούνται διαλύματα από χημικές ουσίες στις οποίες γίνεται εμβάπτιση των σπόρων. Τα αποτελέσματα των ερευνών αυτών παρουσιάζονται παρακάτω:

- Εμβάπτιση σπόρων σε NaOCl κατέστρεψε τους επιφανειακούς πληθυσμούς του παθογόνου, αλλά δεν εξάλειψε τους εσωτερικούς πληθυσμούς [5],
- Επέμβαση με 0,6 M HCl για 5-10 ώρες εξάλειψε το παθογόνο αλλά μείωσε σημαντικά τη βλαστικότητα του σπόρου [5],
- Επέμβαση με 0,25% και 0,5% ACA (Acetic Acid) σε θερμοκρασία δωματίου εξάλειψε το *Cmm* από τους σπόρους. Το ACA στις ίδιες συγκεντρώσεις αλλά σε μεγαλύτερες θερμοκρασίες, εξουδετέρωσε αποτελεσματικά το παθογόνο εξωτερικά και εσωτερικά του σπόρου. Οι επιδράσεις των παραπάνω επεμβάσεων στη βλαστικότητα του σπόρου ποικίλαν. Συγκεκριμένα ενώ η εφαρμογή 0,25% ACA στους 52°C είχε καλά αποτελέσματα χωρίς αρνητική επίδραση στη βλαστικότητα, η συγκέντρωση 0,5% ACA στους 52°C για 20 λεπτά έδειξε σημαντικά χαμηλότερο ποσοστό βλαστικότητας [5],
- Επεμβάσεις με HCl (0,6M) και ο-υδροξυφαινύλιο (0,05%) μείωσαν αποτελεσματικά το μόλυσμα *Cmm* στο σπόρο και εμπόδισαν την εμφάνιση ελκών στα φυτά στο χωράφι [3].

6.5.2.Χρήση βιολογικών παραγόντων

Βάκιλλοι

Τα βακτήρια του γένους *Bacillus* sp. είναι θετικά κατά Gram, ραβδοειδούς σχήματος, αερόβια ή προαιρετικά αναερόβια, σχηματίζουν ενδοσπόρια και περιλαμβάνουν περισσότερο από 60 είδη με σχετικά διαφορετικούς φαινότυπους [1]. Η άριστη θερμοκρασία ανάπτυξής τους κυμαίνεται γύρω στους 30 °C.

Διάφορα είδη του γένους *Bacillus* spp. διαθέτουν ιδιαίτερα χαρακτηριστικά γνωρίσματα που τα κάνουν ισχυρούς παράγοντες βιολογικής καταπολέμησης των ασθενειών των φυτών:

α) σχηματίζουν ενδοσπόρια, που είναι ανθεκτικές μορφές, με τις οποίες μπορούν να επιβιώνουν για μεγάλα χρονικά διαστήματα στους φυτικούς ιστούς [1],

β) λόγω της προσαρμοστικότητάς τους αποτελούν βασικό συστατικό της μικροχλωρίδας των καλλιεργήσιμων εδαφών [13],

γ) παράγουν δευτερογενείς μεταβολίτες οι οποίοι διαθέτουν αντιβιοτικές ιδιότητες κατά διάφορων παθογόνων μυκήτων και βακτηρίων και επιπρόσθετα συμβάλλουν στην καλύτερη ανάπτυξη των φυτών [18],

δ) έχουν την ικανότητά ενδοφυτικού αποικισμού [9]. Δηλαδή, την ικανότητα να παραμένουν στο αγγειακό σύστημα του φυτού και να ανταγωνίζονται αποτελεσματικά παθογόνα που μολύνουν διασυστηματικά τα φυτά και τα οποία συνήθως είναι περισσότερο ανθεκτικά εξαιτίας της θέσης που αναπτύσσονται [18].

Κατά καιρούς έχουν χρησιμοποιηθεί αρκετά στελέχη του γένους *Bacillus* ως βιολογικοί παράγοντες για την καταπολέμηση του βακτηριακού έλκους της τομάτας. Σε πειράματα, έχει παρατηρηθεί ότι διάφορα στελέχη του *Bacillus subtilis* έχουν την δυνατότητα να εμποδίζουν την μόλυνση φυτών στο θερμοκήπιο από το *Clavibacter* [14]. Ο μηχανισμός με τον οποίο ελέγχεται η ασθένεια στην συγκεκριμένη μελέτη δεν είναι γνωστός. Από άλλες αναφορές στον μηχανισμό άμυνας που ενεργοποιείται μετά την εφαρμογή βακίλλων συμπεραίνεται ότι μείγματα στελεχών *Bacillus* spp. τα οποία ενεργοποιούν διαφορετικούς μηχανισμούς άμυνας μπορεί να είναι πιο αποτελεσματικά από μεμονωμένα στελέχη [8], ενώ σε άλλες έρευνες έχει διαπιστωθεί άμεση εμπλοκή των βακτηρίων με την ενεργοποίηση διαφόρων ορμονών ή την παραγωγή αντιβιοτικών; ή έμμεση εμπλοκή ως επαγωγών της λεγόμενης

διασυστηματικής ανθεκτικότητας (ISR). Συνήθως τα στελέχη *Bacillus* spp. που προκαλούν την εκδήλωση ISR προάγουν και την ανάπτυξη των φυτών [14].

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η διερεύνηση της αποτελεσματικότητας επιλεγμένων στελεχών του γένους *Bacillus* spp. κατά του Cmm σε σπόρο τομάτας.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

ΓΕΝΙΚΑ

1. Δοκιμές βλαστικότητας στο σπόρο

Για το πείραμα χρησιμοποιήθηκε σπόρος υβριδίου «BISON F1», τον οποίο προμηθευτήκαμε από την εταιρεία Σπύρου. Πριν από την μόλυνση των σπόρων, έγιναν δοκιμές βλαστικότητας, για τον έλεγχο τυχόν φυτοτοξικότητας τους.

Ακολουθήθηκε η εξής μεθοδολογία: Στον πάτο ενός τριβλίου τοποθετήθηκε μια στρώση από διηθητικό χαρτί το οποίο είχε εμποτιστεί με μικρή ποσότητα νερού. Επάνω σε αυτό διασκορπίστηκαν 150 σπόροι. Πάνω από τους σπόρους τοποθετήθηκε μία δεύτερη στρώση διηθητικού χαρτιού που επίσης εμποτίστηκε με νερό. Το διηθητικό χαρτί είχε ως σκοπό το να διατηρήσει την απαραίτητη υγρασία ώστε οι σπόροι να μπορέσουν να βλαστήσουν μέσα στο τριβλίο. Στη συνέχεια τα τριβλία κλείστηκαν με παραφίλμ για αποφυγή τυχόν μόλυνσης από εξωτερικούς παράγοντες και τοποθετήθηκαν σε θάλαμο ελεγχόμενης θερμοκρασίας, στους 25°C. Πέντε μέρες μετά και αφού γινόταν τακτικά έλεγχος για την υγρασία των τριβλίων, για να μην αφυδατωθούν οι σπόροι, καταμετρήθηκε ο αριθμός των σπόρων που βλάστησαν (112 σπόροι).

Ο μέσος όρος της βλαστικότητας κυμάνθηκε στο 75% και θεωρήθηκε επαρκής για την έναρξη των πειραμάτων στους μολυσμένους σπόρους.

2. Καλλιέργεια παθογόνου

Καλλιεργήθηκε το βακτήριο *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (*Cmm*) σε εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα m- SCM, του οποίου η σύνθεση είναι η εξής:

- | | |
|---|--|
| ↳ Mannose 10 g/l | ↳ MgSO ₄ · 7H ₂ O 0.25 g/l |
| ↳ Yeast extract 0.1 g/l | ↳ Boric acid 1.5 g/l |
| ↳ K ₂ HPO ₄ 2 g/l | ↳ Agar 16 g/l |
| ↳ KH ₂ PO ₄ 0.5 g/l | |

Μετα την αποστείρωση (κλίβανος) προστίθενται:

- ↳ Cycloheximide 200 mg (διάλυση σε 1 ml μεθανόλης)
- ↳ Nolidilic acid 30 mg (διάλυση σε 1 ml ,01M NaOH)
- ↳ Nikotinic acid 100mg (διάλυση σε 20 ml AA H₂O) [12].

3. Έλεγχος παθογένειας στελεχών του *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*

Πριν από την μόλυνση των σπόρων, ήταν απαραίτητο να ελεγχθεί η παθογένεια διαφόρων στελεχών του βακτηρίου *Cmm*. Τα στελέχη με την μεγαλύτερη παθογένεια χρησιμοποιήθηκαν στη τεχνητή μόλυνση των σπόρων. Η παθογένεια των βακτηριακών στελεχών ελέγχθηκε με τεχνητές μολύνσεις σε φυτά *Mirabilis jalapa* με την πρόκληση αντίδρασης υπερευαισθησίας (HR) (εικ.9, 10& 11).

Από την συλλογή του εργαστηρίου Βακτηριολογίας μεταφυτεύτηκαν και αναπτύχθηκαν διάφορα στελέχη του *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* σε θρεπτικά υποστρώματα NAG και m- SCM. Κατόπιν έγινε έγχυση με σύριγγα στα φύλλα του *Mirabilis jalapa* με πυκνά αιωρήματα των βακτηριακών στελεχών που επιλέχθηκαν (Πίνακας 1). Μετά από την πάροδο 24- 48 ωρών, εκτιμήθηκε η εμφάνιση ή όχι της πρόκλησης τυπικής αντίδρασης υπερευαισθησίας (πίνακας 1).

Πίνακας 1: Έλεγχος παθογένειας διαφόρων στελεχών *Cmm* με την δοκιμή αντίδρασης υπερευαισθησίας σε φυτά *Mirabilis jalapa*.

Βακτηριακά στελέχη <i>Cmm</i>	Αντίδραση HR εκδήλωση ναι (+) / όχι(-)
4020	+
4054	+
4035	+
4205	+
4046	+
4051	+
4047	+
4021	+
4212	+
4218	+
4214	+
4034	+
4010	-
4015-1	-
4002	-
4000	-
4064	-
4070	-
4206	-
4207	-
4208	-
4209	-
4210	-
4211	+
4213	-
4053	-
4015	-
4009	-
559	-
4032	-
4203	-
4204	-
4216	-
4217	-
4215	-
4038	-
4006	-
4056	-

4. Προετοιμασία τεχνητά μολυσμένου σπόρου

Στο πείραμα 1 και 3 χρησιμοποιήθηκαν τεχνητά μολυσμένοι σπόροι τομάτας ποικιλίας BISON. Για την μόλυνση χρησιμοποιήθηκε αιώρημα των στελεχών 4054, 4020, 4212, 4214 του βακτηρίου *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, από την συλλογή του εργαστηρίου Βακτηριολογίας, με την μέθοδο της εφαρμογής υποπίεσης.

Τα βακτηριακά στελέχη αναπτύχθηκαν για 48 ώρες σε θρεπτικό υπόστρωμα Tryptone Soy Agar (TSA). Στη συνέχεια ετοιμάσθηκε αιώρημα συγκέντρωσης 10^7 (οπτική πυκνότητα μολύσματος, $O.D._{600} = 0.028$). Ο σπόρος τοποθετήθηκε σε φιάλη δημιουργίας κενού που περιείχε 400 ml του αντίστοιχου βακτηριακού αιωρήματος του *Cmm*. Με την βοήθεια αντλίας κενού δημιουργήσαμε υποπίεση στην φιάλη με το υδατικό διάλυμα για 5 λεπτά.

Στο πείραμα 2, χρησιμοποιήθηκε φυσικά *Cmm* μολυσμένος σπόρος από ένα ήδη προσβεβλημένο καρπό τομάτας.

5. Επεμβάσεις στους σπόρους

Οι σπόροι εμβαιπίστηκαν για 10 λεπτά στις ακόλουθες επεμβάσεις: α) υγρές καλλιέργειες βακίλων του γένους *Bacillus* spp. (d1, d3 d9), χαλκός, και Tryptone Soy Broth (TSB).

Για την καλλιέργεια των βακίλων ακολουθήσαμε την παρακάτω διαδικασία. Χρησιμοποιήθηκαν οι βάκιλοι D₁, D₃ και D₉ του γένους *Bacillus* spp. από το εργαστήριο φυτοπαθολογίας (Βιολογικής Καταπολέμησης Ασθενειών), οι οποίοι αναπτύχθηκαν σε TSA για 24 ώρες σε θάλαμο επώασης στους 22 °C. Στη συνέχεια έγινε αιώρημα των βακίλων σε απιονισμένο και αποστειρωμένο (AA) νερό και μετρήθηκε η οπτική πυκνότητα (Optical Density, O.D.) 0,1, με την βοήθεια του σπεκτροφωτόμετρου, στα 600nm. Στη συνέχεια, σε κωνικές φιάλες των 200ml, τοποθετήθηκαν 100ml TSB και 100μl από το τελικό αιώρημα κάθε βακίλου. Οι καλλιέργειες επωάστηκαν σε περιστροφικό θάλαμο ανάπτυξης (Orbit) 100mot/min χωρίς φως για 3 ημέρες στους 30 °C. Μετά από το διάστημα αυτό μετρήθηκε ξανά η οπτική πυκνότητα των βακίλων: D₁=0.093, για τον D₃ =0.102 και για τον D₉=0.098. Για την υγρή καλλιέργεια TSB: Σε κωνική φιάλη 200ml βάλουμε 100ml νερού και 3gr TSB. Για τον χαλκό: Σε κωνική φιάλη 200ml προστέθηκαν 3gr χαλκού σε 100ml AA νερό (Kocide 101 Υδροξείδιο του χαλκού 50%WP, Griffin, U.S.A). Τέλος,

χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες, μολυσμένοι σπόροι (Μ.Σ.) και υγιείς σπόροι (Υ.Σ.) χωρίς καμία άλλη επέμβαση.

Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν την περίοδο Μαΐου-Ιουνίου 2008.

ΠΕΙΡΑΜΑ 1 (In vitro με τεχνητά μολυσμένο σπόρο)

Συνολικά για το πείραμα 1 χρησιμοποιήθηκαν 700 σπόροι, 100 ανά επέμβαση, οι οποίοι κατανεμήθηκαν σε 4 τριβλία “Petri” (25 σπόροι/ τριβλίο με εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα m-SCM. Οι σπόροι μετά τις επεμβάσεις στέγνωσαν πάνω σε διηθητικό χαρτί. Στην συνέχεια τοποθετήθηκαν στα τριβλία και επωάστηκαν σε θάλαμο ανάπτυξης στους 27°C για 20 ημέρες.

Μετά το χρονικό αυτό διάστημα επώασης, εκτιμήθηκε το ποσοστό σπόρων με εμφάνιση Cmm (εικ.13, 14, 15& 16). Η εκτίμηση έγινε με βάση τον φαινότυπο των αποικιών του βακτηρίου γύρω από τους σπόρους και στην συνέχεια με μεταφορά και ανάπτυξη των αποικιών αυτών σε υπόστρωμα NAG, καθώς και με τη μέθοδο της χρώσης Gram. Υπολογίσθηκε το ποσοστό % εμφάνισης Cmm / τριβλίο.

ΠΕΙΡΑΜΑ 2 (In vivo με τεχνητά μολυσμένο σπόρο)

Χρησιμοποιήθηκαν 72 σπόροι/επέμβαση. Μετά την εφαρμογή των επεμβάσεων οι σπόροι στέγνωσαν σε διηθητικό χαρτί. Κατόπιν φυτεύτηκαν σε ποτηράκια τα οποία τοποθετήθηκαν σε δίσκους σποράς.

Οι δίσκοι τοποθετήθηκαν σε πάγκους ανάπτυξης φυτών στο θερμοκήπιο σε 6 τυχαιοποιημένες ομάδες (Blocks) (1 δίσκος/επέμβαση/ομάδα) (εικ.17). Η λίπανση ξεκίνησε τρεις εβδομάδες μετά, 3 φορές την εβδομάδα με λίπασμα 20-20-20.

Η εκτίμηση έγινε με βάση την εμφάνιση των συμπτωμάτων του Cmm πάνω στα φυτά 40 ημέρες μετά τη σπορά. Επίσης η παρουσία του παθογόνου ελέγχθηκε με την διαδικασία της «στάμπας» (εικ.18, 19& 20) και του ανοσοφθορισμού στο εργαστήριο. Συγκεκριμένα, πέντε εβδομάδες μετά την φύτευση, έγινε λήψη δείγματος βλαστού, από όλα τα φυτά που βλάστησαν, λίγο πάνω από τις κοτυληδόνες, το οποίο τοποθετήθηκε σε εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα m-SCM. Τα τριβλία τοποθετήθηκαν σε θάλαμο ανάπτυξης και επτά ημέρες μετά έγινε εκτίμηση του ποσοστού εμφάνισης

του βακτηρίου γύρω από το τμήμα του βλαστού. Για τον ανοσοφθορισμό η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής:

Προετοιμασία εξάπλωσης βακτηρίων: σε αντικειμενοφόρες πλάκες (οι οποίες είχαν πάνω σχηματισμένους κύκλους) απλώθηκαν πάνω αιωρήματα των βακτηρίων (50μl/κύκλο). Έμειναν μέχρι να στεγνώσουν. Στη συνέχεια καλύφθηκαν με οινόπνευμα για 10 λεπτά.

Αντίδραση

Πρώτη φάση: Έγινε αραίωση του αντιορού του βακτηρίου Cmm με φυσιολογικό ρυθμιστικό διάλυμα νερού. Ακολούθησαν άλλα δυο ξεπλύματα βυθίζοντας την αντικειμενοφόρο πλάκα για πέντε λεπτά σε δυο μπάνια φυσιολογικού ρυθμιστικού διαλύματος νερού. Τέλος έγινε προσεκτικό στέγνωμα της αντικειμενοφόρου πλάκας από κάτω και έξω από τον κύκλο με διηθητικό χαρτί.

Δευτέρη φάση: Έγινε αραίωση του φθορίζοντος αντιορού (αντιορός του ορού του κουνελιού συνδεδεμένος με το methyl isothiocyanate of fluorescein). Από αυτό, απλώθηκε μια σταγόνα (0.2ml) πάνω στους κύκλους. Παρέμεινε για 30λεπτά μέχρι να δράσει. Τέλος ξεπλύθηκε και στέγνωσε όπως προηγουμένως.

Παρατήρηση

Μεταξύ αντικειμενοφόρου και καλυπτρίδας τοποθετήθηκαν 10μl διαλύματος γλυκερίνης. Η παρατήρηση έγινε με τον ελαιοκαταδυτικό φακό (x100) και σε μικροσκόπιο που είναι εφοδιασμένο με σύστημα φθορισμού.

Μάρτυρες που χρησιμοποιήθηκαν:

Αρνητικός: ακολουθείται η ίδια διαδικασία με την διαφορά ότι δεν προστέθηκε αντιορός του βακτηρίου Cmm,

Θετικός: ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία με τη διαφορά ότι το αιώρημα του βακτηρίου έχει γίνει με το βακτήριο που χρησιμοποιήσαμε για να φτιάξουμε τον αντιορό.

ΠΕΙΡΑΜΑ 3 (Φυσικά μολυσμένος σπόρος)

Στον φυσικά μολυσμένο σπόρο εφαρμόστηκαν οι επεμβάσεις με τον ίδιο τρόπο όπως στα δύο προηγούμενα πειράματα (9 σπόροι/επέμβαση). Στη συνέχεια ο σπόρος σπάρθηκε σε ξεχωριστά ποτηράκια που τοποθετήθηκαν σε πάγκους ανάπτυξης στο θερμοκήπιο 'πλήρως τυχαιοποιημένα'. Η εκτίμηση της ασθένειας έγινε όπως περιγράφεται στο πείραμα 2, 40 ημέρες μετά τη σπορά.

ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Στα δεδομένα των πειραμάτων έγινε ανάλυση διασποράς (ANOVA) και η σύγκριση των μέσων όρων των επεμβάσεων έγινε με βάση το LSD (Least Significant Difference). Το στατιστικό πακέτο Genstat ed. 7 χρησιμοποιήθηκε για όλες τις αναλύσεις.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Πείραμα 1

Τα αποτελέσματα του πειράματος παρουσιάζονται στον πίνακα 2.

Πίνακας 2: Σύγκριση του % ποσοστού εμφάνισης Cmm μεταξύ των επεμβάσεων σε σπόρο τομάτας in vitro

Επέμβαση	Χαλκός	TSB	Μ.Σ.	Υ.Σ	D1	D3	D9
%Εμφάνιση Cmm/τριβλίο (μέσοι όροι)	0	100	99	0	13	34	10

LSD = 9.4

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα όλες οι επεμβάσεις με στελέχη του γένους *Bacillus* sp. (D1, D3, D9) περιόρισαν σημαντικά την εμφάνιση του παθογόνου in vitro. Το μυκητοκτόνο (χαλκός) ήταν σημαντικά καλύτερο και από τα 3 στελέχη βακίλλων που δοκιμάστηκαν, καθώς παρεμπόδισε την ανάπτυξη του βακτηρίου πλήρως. Τα στελέχη D1 και D9 αποδείχθηκαν σημαντικά πιο αποτελεσματικά από το στέλεχος D3. Το θρεπτικό υπόστρωμα Tryptone Soy Broth (TSB) προήγαγε την ανάπτυξη του παθογόνου όπως ήταν αναμενόμενο, ενώ στον άνοσο σπόρο (Υ.Σ.) η εμφάνιση ήταν μηδενική και στο μολυσμένο μάρτυρα (Μ.Σ.) καθολική.

Πείραμα 2

Τα ποσοστά βλάστησης των σπόρων στο θερμοκήπιο ήταν ιδιαίτερα χαμηλό ανεξαρτήτως επέμβασης, γεγονός που δυστυχώς δεν μπορεί να αποδοθεί στο παθογόνο καθώς η βλαστικότητα και του υγιούς σπόρου (μάρτυρας) ήταν εξίσου χαμηλή.

Επιπλέον, στα φυτά που βλάστησαν δεν παρατηρήθηκαν συμπτώματα της ασθένειας, σε καμία από τις επεμβάσεις, έως και την 40^η μέρα μετά την σπορά που έγινε οπτική εκτίμηση της συμπτωματολογίας των φυτών. Βάση των παραπάνω, συλλέχθηκαν 2 δείγματα από κάθε βλαστημένο φυτό για την ανίχνευση του βακτηρίου με τις εργαστηριακές μεθόδους της 'αποτύπωσης-σφραγίδας' και του ανοσοφθορισμού. Το βακτήριο δεν ανιχνεύτηκε με την μέθοδο του ανοσοφθορισμού. Στο εκλεκτικό υπόστρωμα (μέθοδος αποτύπωμα-σφραγίδα) καταγράφηκε εμφάνιση του Cmm σε όλες τις επεμβάσεις. Η ανάλυση διασποράς (ANOVA) έδειξε μεγάλη

παραλλακτικότητα εντός των επεμβάσεων (ομάδες) με συνέπεια οι διαφορές μεταξύ των επεμβάσεων να είναι στατιστικά μη σημαντικές (πίνακας 3).

Πίνακας 3: Ανάλυση Διασποράς του % ποσοστού εμφάνισης Cmm σε δείγματα φυτών τομάτας μετά τη μεταφορά τους από το θερμοκήπιο σε εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα m-SCM

Πηγή παραλλακτικότητας	df	s.s.	m.s	v.r	F prob.
Ομάδα	5	29.8	5.9	4.2	
Επέμβαση	6	5.9	1.0	0.7	0.6
Σφάλμα	30	42.6	1.4		
Σύνολο	41	78.4			

P ≤ 0,05

Πείραμα 3

Λόγω του μικρού αριθμού φυτών και της έλλειψης επαναλήψεων δεν ήταν δυνατή η στατιστική ανάλυση των δεδομένων. Εντούτοις, τα αποτελέσματα του πειράματος μπορούν να ληφθούν ως μια αρχική ένδειξη της αποτελεσματικότητας των διαφόρων επεμβάσεων.

Τα ποσοστά βλάστησης των σπόρων στο θερμοκήπιο για κάθε επέμβαση παρουσιάζονται στον πίνακα 4.

Πίνακας 4: Ποσοστά % βλάστησης των μολυσμένων σπόρων τομάτας στο θερμοκήπιο, μετά την εφαρμογή των διαφόρων εφαρμογών στο σπόρο

Επέμβαση	D1	D3	D9	TSB	Χαλκός	Μάρτυρας
% βλάστησης σπόρων	77,7	44,4	22,2	33,3	44,4	44,4

Σύμφωνα με τον πίνακα 4, η επέμβαση D1 είχε το μεγαλύτερο ποσοστό βλαστικότητας γεγονός που ίσως υποδεικνύει την αποτελεσματικότητα της επέμβασης κατά του παθογόνου προ-φυτρωτικά καθώς η διαφορά με τον μάρτυρα είναι μεγάλη (33,3%).

Όσον αφορά την εμφάνιση της ασθένειας μετα-φυτρωτικά, στο θερμοκήπιο δεν εμφανίστηκαν συμπτώματα μέχρι και την 40^η ημέρα μετά τη σπορά που πραγματοποιήθηκε η οπτική εκτίμηση της συμπτωματολογίας των φυτών. Επίσης σε

κανένα από τα δείγματα του ανοσοφθορισμού δεν ανιχνεύτηκε το βακτήριο. Τέλος τα αποτελέσματα των δειγμάτων στο εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα παρουσιάζονται στον πίνακα 5.

Πίνακας 5: Ποσοστά % εμφάνισης Cmm σε δείγματα φυτών τομάτας από φυσικά μολυσμένο σπόρο μετά τη μεταφορά τους από το θερμοκήπιο σε εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα m-SCM

Επέμβαση	D1	D3	D9	TSB	Χαλκός	Μάρτυρας
% Εμφάνιση Cmm	0	25	0	75	25	50

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα όλες οι επεμβάσεις με στελέχη του γένους *Bacillus* spp. περιόρισαν την εμφάνιση της ασθένειας in vitro, αλλά τα στελέχη D1 και D9 παρεμπόδισαν την ασθένεια πλήρως ενώ το στέλεχος D3 και ο χαλκός μείωσαν τα ποσοστά κατά 50% σε σύγκριση με τον μάρτυρα.

Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με τα αποτελέσματα του πειράματος στον τεχνητά μολυσμένο σπόρο καθώς και στα δύο πειράματα τα στελέχη D1 και D9 ήταν τα πιο αποτελεσματικά στην καταπολέμηση της ασθένειας in vitro. Αντίθετα από το πείραμα 1, ο χαλκός δεν έδωσε το ίδιο ικανοποιητικά αποτελέσματα ενώ το θρεπτικό TSB προήγαγε την ανάπτυξη του παθογόνου όπως ήταν αναμενόμενο.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Σε γενικές γραμμές το πείραμα *in vitro* έδειξε ότι το μυκητοκτόνο παρεμπόδισε πλήρως την εμφάνιση ενώ αντίστοιχα το TSB ως θρεπτικό υπόστρωμα προήγαγε την ανάπτυξη του παθογόνου. Εξίσου καλά αποτελέσματα έδωσαν και ότι οι επεμβάσεις με στελέχη του γένους *Bacillus* sp.. Περιορίσαν σημαντικά την εμφάνιση της ασθένειας με πιο αποτελεσματικά τα στελέχη D1 και D9.

Γενικά τα βακτήρια του γένους *Bacillus* sp. προωθούν την ανάπτυξη των φυτών και το προστατεύουν από διάφορα παθογόνα (μύκητες, βακτήρια, ιοί) [15]. Αυτό οφείλεται στους τρόπους δράσεις των στελεχών του *Bacillus* spp., οι οποίοι διεγείρουν διάφορους δρόμους άμυνας των φυτών, επιδρούν στην ανάπτυξη των φυτών, ενεργοποιούν διαφορετικά μονοπάτια μεταφοράς του σήματος και διαφορετικές φυτοπροστατευτικές ουσίες (π.χ. τα ένζυμα υπεροξειδάση, χιτινάση και β 1-3 γλυκανάση), τα οποία διαφέρουν ανάλογα με τα στελέχη του βακίλλου [8].

Τα αποτελέσματα των *in vivo* πειραμάτων δεν ήταν δυνατό να αναλυθούν καθώς το ποσοστό βλάστησης των φυτών ήταν ιδιαίτερα χαμηλό. Επειδή τα χαμηλά ποσοστά βλάστησης παρατηρήθηκαν σε όλες τις επεμβάσεις, συμπεριλαμβανομένου και του αμόλυντου μάρτυρα, η μείωση στην βλαστικότητα δεν μπορεί να αποδοθεί σε προσβολή από το παθογόνο. Επιπρόσθετα στις απομονώσεις που έγιναν από τα φυτά δεν ανιχνεύτηκε το Cmm.

Είναι σημαντικό να επαναληφθούν τα πειράματα *in vivo* με το *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, για να βρεθούν πιο αποτελεσματικοί μέθοδοι εκτίμησης της ασθένειας και να ξεπεραστούν τα προβλήματα που σχετίζονται τόσο με την ασυμπτωματική φύση του βακτηρίου στα φυτά στο χωράφι όσο και με την δυσκολία της ανίχνευσής του στα φυτά στο εργαστήριο. Επιπρόσθετα θα πρέπει να διερευνηθεί η αποτελεσματικότητα των παραπάνω στελεχών του βακίλλου στο χωράφι.

Θα αποτελούσε ενδιαφέρον να γίνουν επιπλέον έρευνες για τους μηχανισμούς άμυνας που ενεργοποιούνται με την εφαρμογή των βακίλλων που αφορούν την επαγωγή αλλαγών στην φυσιολογία του φυτού και που σχετίζονται με την προστασία από διάφορες ασθένειες, αφού μέχρι στιγμής έχουν επικεντρωθεί στη παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών [8].

Σαν συμπέρασμα της προσπάθειας αυτής μπορούμε να πούμε ότι η καταπολέμηση του *Cm1* στο σπόρο τομάτας με εφαρμογή χαλκού και βακίλλων είχε θετικά αποτελέσματα και χρίζει περαιτέρω ερευνητικής διερεύνησης καθώς θα μπορούσε στο μέλλον να αποτελέσει μια εναλλακτική μέθοδο καταπολέμησης των βακτηριακών παθογόνων των σπόρων, εφόσον υπερνικηθούν οι δυσκολίες που έχουν να κάνουν με την τυποποίηση των βακίλλων σε εμπορικά σκευάσματα.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

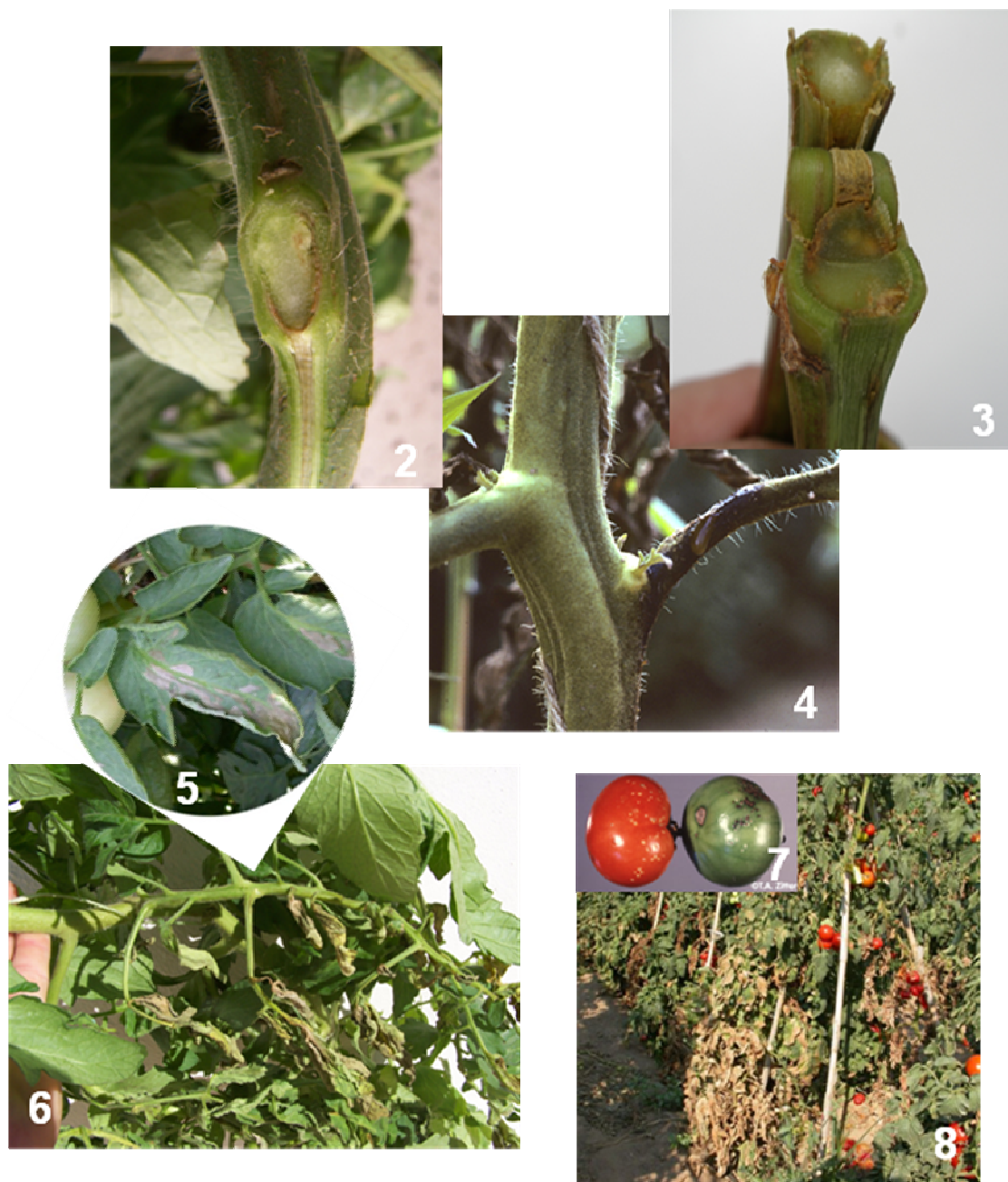
1. CLAUS D., BERKELEY R.C. W., 1986. Genus *Bacillus* Cohn 1872. In: Sneath PHA, ed. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Section 13, Vol. 2 Baltimore, MD, USA: Williams & Wilkins Co, 1105-39.
2. DE LEON L., RODRIGUEZ A., LOPEZ M.M., SIVARIO F., 2007. Evaluation of the efficacy of immunomagnetic separation for the detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomato seeds. Journal of Applied Microbiology, 104(2008) 776-786.
3. DHANVANTARI B.N., 1989. Effect of seed extraction methods and seed treatments on control of tomato bacterial canker. Canada. J.Plant Pathology. 11: 400-408.
4. EPPO BVILETIN 35 275-283, 2005. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*.
5. FATMI M., SCHAAD N.W., BOLKAN H.A., 1991. Seed Treatments for Eradicating *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* from Naturally Infected Tomato Seeds. Plant disease. 75 (4):383-385.
6. ΓΚΟΥΜΑΣ Δ., 2005. Εργαστηριακές ασκήσεις φυτοπαθολογίας. Ηράκλειο.
7. HAYWARD A.C., WATERSTON J.M., 1964. *Corynebacterium michiganense*. Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria No. 19. CAB International, Wallingford, UK.
8. KLOEPPER J.W., CHOONG-MIN RYU, ZHANG S., 2004. Induced Systemic Resistance and Promotion of Plant Growth by *Bacillus* spp.. American Phytopathological Society 94:1259-1266.
9. KLOEPPER J.W., RODRIGUEZ- KABANA R., ZEHNDER G.W., MURPHY J.F., SIKORA E., FERNANDEZ C., 1999. Plant root- bacterial interactions in biological control of soilborne diseases and potential extension to systemic and foliar diseases. Australian Plant Pathology 28, 21-6.
10. ΜΑΛΑΘΡΑΚΗΣ Ν., ΓΚΟΥΜΑΣ Δ., ΑΥΓΕΛΗΣ Α., 2007. Οι ασθένειες της τομάτας. Σελ.92. ISBN:978-960-930173-2. Ηράκλειο.
11. ΠΑΝΑΓΟΠΟΥΛΟΣ Χ., 2000. Ασθένειες κηπευτικών καλλιεργειών. Εκδόσεις Σταμούλη, Αθήνα.
12. SCHAAD N. W., JONES J. B., CHUN W., 2001. Plant Pathogenic Bacteria. American Phytopathological Society. 218-235.

13. STABB W.V., JACOBSON L.M., HANDELSMAN J., 1994. Zwittermicin A-producing strains of *Bacillus Cereus* from diverse soils. *Applied and Environmental Microbiology* 60, 4404-12.
14. UTKHEDE R., KOCH C., 2004. Biological treatments to control bacterial canker of greenhouse tomatoes. *Biocontrol* 49:305-314.
15. WALTERS D., HEIL M., 2007. Costs and trade off associated with induced resistance. *Physiological and Molecular Plant Pathology* (71) 3-17.
16. WERNER N.A., FULBRIGHT D.W., PODOLSKY R., BELL J., HAUSBECK M.K., 2002. Limiting Populations and Spread of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* on Seedling Tomatoes in the Greenhouse. *Plant Disease*, 86 (5) 535-542.
17. WIEBE W., Ph.D., 2006. Bacterial Disease of Tomato: Bacterial Spot, Bacterial Speck, Bacterial Canker. <http://www.omafra.gov.on.ca/English/crops/facts/05-069.htm>.
18. WULFF E.G., MGUNI C.M., MANSFELD- GIESE K., FELS J., LUBECK M., HOCKENHULL J., 2002. Biochemical and molecular characterization of *Bacillus amyloliquefaciens*, *B. subtilis* and *B. pumilus* isolates with distinct antagonistic potential against *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Plant Pathology* 51, 574-584.

ΠΗΓΕΣ ΑΠΟ INTERNET

19. ΑΝΩΝΥΜΟΣ 2000. ΤΕΙ ΚΡΗΤΗΣ, Σχολή Τεχνολογίας Γεωπονίας, Ε.Π.Ε.Α.Ε.Κ., Πρόγραμμα συμπληρωματικής Εκπαίδευσης, «Βιολογική Γεωργία» Ενέργεια 3.4γ. http://www.triton.chania.teicrete.gr/bio_geo/Laxanika_Crete /Fytoproستasia.htm.
20. ΑΝΤΩΝΙΟΥ Π.Π., ΤΖΑΜΟΣ Ε.Κ., 1995. Εφαρμογή της Ηλιοαπολυμάνσεως Αντιμετώπιση Αδρομυκώσεων και Αδροβακτηριώσεων σε Θερμοκηπιακές Καλλιέργειες. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας, Αθήνα. <http://www.minagric.gr/greek/data/files2251/ANTONI2.DOC>.

ΦΩΤΟΓΡΑΦΙΚΟ ΥΛΙΚΟ

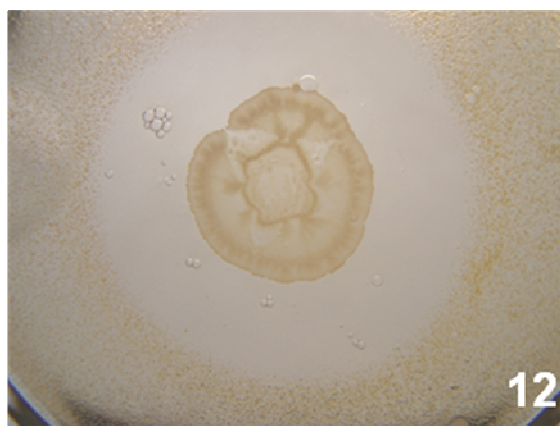


ΕΙΚΟΝΑ 2, 3 & 4. Συμπτώματα σε στέλεχος: Κίτρινος- καστανός μεταχρωματισμός των αγγείων σε βλαστό τομάτας. Έλκη σε μίσχο και στο βλαστό τομάτας μετά από προσβολή από *Clm*.

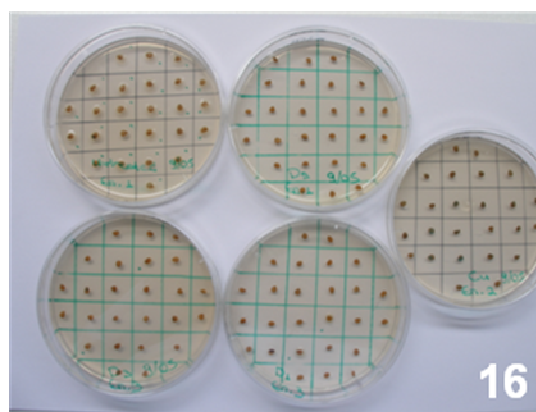
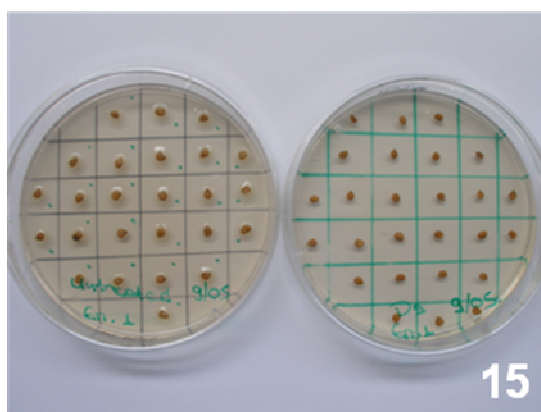
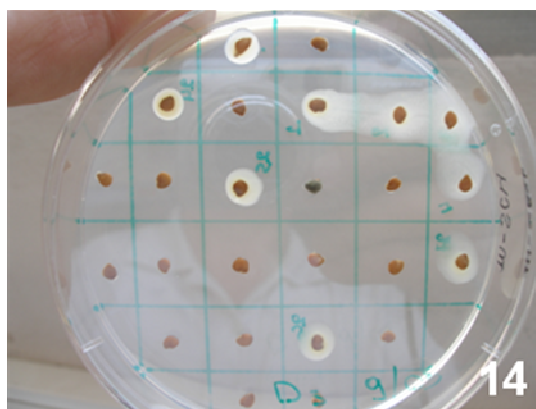
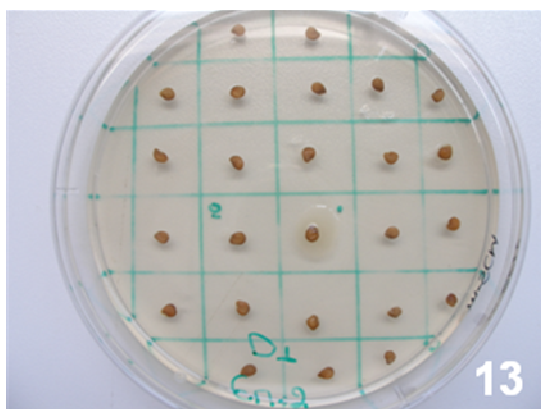
ΕΙΚΟΝΑ 5, 6, 7 & 8. Συμπτώματα ημιπληγίας σε ανεπτυγμένο φυτό τομάτας. Σύνδρομο βραδέως μαρασμού στα μεγαλύτερης ηλικίας φυτά. Κίτρινος- καστανός μεταχρωματισμός των αγγείων σε βλαστό τομάτας. Τυπικές κηλίδες- στίγματα «μάτι ππηνού» σε καρπούς τομάτας.



ΕΙΚΟΝΑ 9, 10 & 11. Έλεγχος παθογένειας βακτηριακών στελεχών Csmm: Αντίδραση υπερευαισθησίας στο φυτό *Mirabilis jalapa* με στελέχη του Csmm που χρησιμοποιήθηκαν στην εργασία (σημειώνεται η αρνητική HR με το στέλεχος 4)

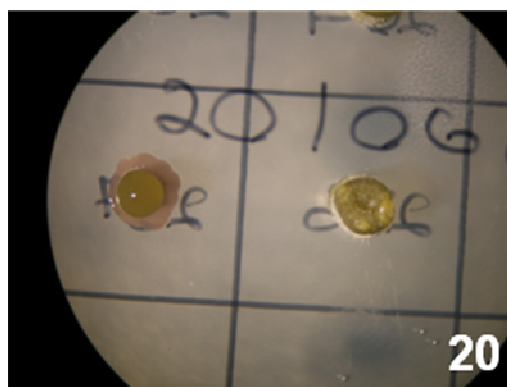
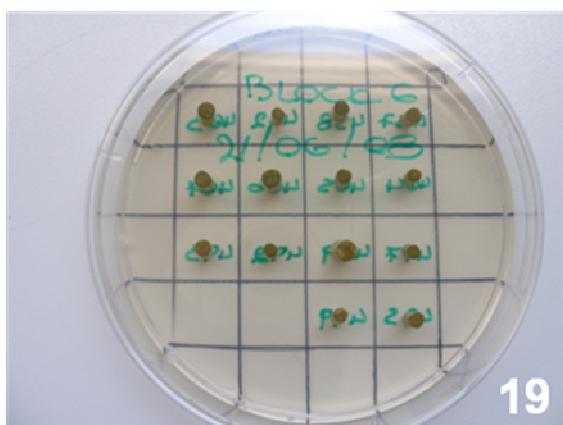
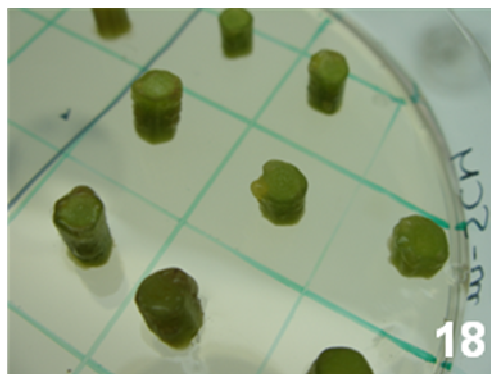


ΕΙΚΟΝΑ 12. Έλεγχος παρεμπόδισης της ανάπτυξης στελέχους του Csmm από στελέχη του *Bacillus* spp. (δημιουργία ζώνης παρεμπόδισης).



ΕΙΚΟΝΑ 13, 14 & 15. Τυπική ανάπτυξη καλλιέργειας Cmm σε εκλεκτικό υπόστρωμα m-SCM από σπόρους τομάτας μολυσμένους (επέμβαση με βακίλλους D1, D3 & D9).

ΕΙΚΟΝΑ 16. Επέμβαση με ανταγωνιστικά βακτηριακά στελέχη (βακίλλοι) και χαλκό σε τεχνητά μολυσμένο σπόρο τομάτας με Cmm.



ΕΙΚΟΝΑ 17. Πειράματα in vitro: Εγκατάσταση και ανάπτυξη φυτών στο θερμοκήπιο.
Εικ. 18, 19 & 20. Έλεγχος της παρουσίας του παθογόνου στα μολυσμένα φυτάρια τομάτας με την μέθοδο της «αποτύπωσης-σφραγίδα».