



ΑΝΩΤΑΤΟ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΚΡΗΤΗΣ  
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΕΦΠΟΝΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΘΕΡΜΟΚΗΠΙΑΚΩΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ ΚΑΙ ΑΝΘΟΚΟΜΙΑΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΜΕΛΕΤΗ ΜΙΑΣ ΝΕΑΣ ΒΑΚΤΗΡΙΩΣΗΣ ΤΗΣ ΡΟΚΑΣ  
(*Eruca sativa*)



Σπουδάστρια: ΠΛΑΤΟΥΛΑΤΟΥ ΜΑΡΙΑΝΘΗ  
Εισηγητής: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ Δρ. ΓΚΟΥΜΑΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2008



ΑΝΩΤΑΤΟ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΚΡΗΤΗΣ  
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΕΛΕΤΟΝΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΘΕΡΜΟΚΗΠΙΑΚΩΝ ΚΑΛΙΕΡΓΕΙΩΝ ΚΑΙ ΑΝΘΟΚΟΜΙΑΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΜΕΛΕΤΗ ΜΙΑΣ ΝΕΑΣ ΒΑΚΤΗΡΙΩΣΗΣ ΤΗΣ ΡΟΚΑΣ

(*Eruca sativa*)

Σπουδάστρια: ΠΛΑΤΟΥΛΑΤΟΥ ΜΑΡΙΑΝΘΗ

Εισηγητής: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ Δρ. ΓΚΟΥΜΑΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2008

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

**ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ**

Πρόλογος .....	5
Περίληψη.....	6
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1.....	7
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	7
1.1 Γενικά για το βακτήριο <i>Pseudomonas syringae</i> .....	8
1.2 Το βακτήριο <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>maculicola</i> .....	9
1.3 Το βακτήριο <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>alisalensis</i> .....	13
1.4 Συμπτώματα του <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>alisalensis</i> στην ρόκα. ....	14
1.5 Συμπτώματα του <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>alisalensis</i> σε άλλα σταυρανθή (μπρόκολο – κουνουπίδι). ....	15
1.6 Συμπτώματα του <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>maculicola</i> σε φυλλώδη σταυρανθή.....	15
1.7 Το φυτό ρόκα. ....	16
1.8 Σκοπός της μελέτης.....	17
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2.....	18
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ .....	18
2.1 Απομόνωση του παθογόνου .....	19
2.2 Δοκιμές παθογένειας .....	20
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3.....	23
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....	23
3.1 Περιγραφή των συμπτωμάτων της ασθένειας.....	24
3.2 Απομόνωση και ταυτοποίηση του παθογόνου .....	24
3.3 Δοκιμές παθογένειας .....	25
3.3.1 Αντίδραση υπερευαισθησίας στον καπνό.....	25
3.3.2 Τεχνητές μολύνσεις σε φυτά ρόκας.....	25
3.3.3 Μελέτη του εύρους των ξενιστών του παθογόνου .....	29
3.3.4 Τεχνητές μολύνσεις σε λοβούς φασολιάς.....	30
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4.....	31
ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	31
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5.....	35
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	35
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ .....	39
ΦΩΤΟΓΡΑΦΙΚΟ ΥΛΙΚΟ .....	39

## Πρόλογος

Με την ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά, κατ' αρχήν τον εισηγητή μου Δρ. Γκούμα Δημήτριο για την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με το παρόν θέμα, για τις πολύτιμες γνώσεις, την τεχνογνωσία καθώς και την ανεκτίμητη βοήθειά του τόσο στο πειραματικό, όσο και στο θεωρητικό μέρος της πτυχιακής μου εργασίας.

Ακόμη θα ήθελα να ευχαριστήσω τους φίλους μου, Ιακωβίδη Μηνά, Λιαντράκη Ζωή, Μαυρέα Ζωή, Μπλέτσου Αργυρώ και Τζόκα Ιωάννη για την ηθική τους συμπαράσταση και την σπουδάστρια Παρασχάκη Δέσποινα για την άριστη συνεργασία μας.

Με εκτίμηση,  
Παγουλάτου Μαριάνθη

## Περίληψη

Τον Μάρτιο του 2007 μέχρι και Μάρτιο του 2008 σε δείγματα φυτών ρόκας που συνέλεξαν σπουδαστές του ΤΕΙ Κρήτης από οπωροπωλεία και πολυκαταστήματα της πόλης του Ηρακλείου και προέρχονταν από καλλιέργειες ρόκας από τις περιοχές Μεγάρων και Μαραθώνα του Ν. Αττικής, από το Ν. Ηλείας και από το Ν. Ηρακλείου Κρήτης, παρατηρήθηκαν συμπτώματα παρασιτικής ασθένειας που διαφοροποιούνταν από τις γνωστές μέχρι τότε προσβολές σε φυτά ρόκας.

Σε προκαταρκτικές απομονώσεις διαπιστώθηκε ότι η ασθένεια οφείλεται σε βακτήρια. Για ευνόητους λόγους διάγνωσης αλλά και προστασίας της καλλιέργειας κρίθηκε αναγκαίο να πραγματοποιηθεί μια μελέτη που θα στόχευε στην απομόνωση, τον χαρακτηρισμό και την ταυτοποίηση των βακτηρίων αυτών. Έτσι λοιπόν άρχισε η εργασία αυτή που αποτέλεσε το αντικείμενο της πτυχιακής μου εργασίας, με σκοπό τη βιβλιογραφική επισκόπηση της πιθανολογούμενης ασθένειας, την ταυτοποίηση του παθογόνου, καθώς και τον έλεγχο της παθογένειας των βακτηριακών στελεχών που απομονώθηκαν. Η εργασία αυτή αποτελείται από δύο μέρη:

Το θεωρητικό μέρος, όπου γίνεται μια βιβλιογραφική περιγραφή των χαρακτηριστικών του βακτηρίου, το οποίο απομονώθηκε και προσδιορίστηκε ως βακτήριο του γένους *Pseudomonas* και συγκεκριμένα το *Pseudomonas syringae* pv. *alisalensis*. Το δεύτερο και πειραματικό μέρος της εργασίας αυτής περιλαμβάνει τις διαδικασίες απομόνωσης, προσδιορισμού και ταυτοποίησης του παθογόνου.

Τέλος, εμπεριέχεται παράρτημα φωτογραφιών με τα συμπτώματα της ασθένειας σε φυτά ρόκας, τα οποία προήλθαν από φυσικές μολύνσεις αλλά και φωτογραφίες συμπτωμάτων από τεχνητές μολύνσεις που πραγματοποιήθηκαν σε φυτά ρόκας αλλά και σε άλλα φυτά της οικογένειας των σταυρανθών.

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1**

### **ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

### 1.1 Γενικά για το βακτήριο *Pseudomonas syringae*

Το βακτήριο *Pseudomonas syringae* απομονώθηκε πρώτη φορά από ασθενές φυτό πασχαλιάς (*Syringa vulgaris* L.) από τον M. W. Beijerinck το 1899 και στη συνέχεια ταξινομήθηκε από τον van Hall το 1902. Το *P. syringae* ταξινομείται στην γ υποκλάση των Πρωτεοβακτηρίων σαν κατά Gram αρνητικό και αερόβιο βακτήριο. Έχει ραβδόμορφο σχήμα και φέρει μαστίγια πολικά και ανήκει στις φθορίζουσες ψευδομονάδες. Είναι αρνητικό στην υδρόλυση της οξειδάσης και της αργινίνης, ιδιότητα που το διαχωρίζει από τα υπόλοιπα φθορίζοντα βακτήρια του ίδιου γένους ενώ δεν παράγει πηκτινολυτικά ένζυμα, ιδιότητα που το διαφοροποιεί από το βακτήριο *Pseudomonas viridiflava*.

Ο όρος παθοποικιλία, χρησιμοποιείται συχνά για τον διαχωρισμό βακτηρίων, του ίδιου γένους, που εμφανίζουν διαφοροποιήσεις ως προς την παθογένεια τους, δηλαδή ως προς το εύρος των ξενιστών που προσβάλλουν. Συνήθως, για τον καθορισμό των παθοποικιλιών του *Pseudomonas syringae* χρησιμοποιούνται βιοχημικές, φυσιολογικές και μοριακές τεχνικές και μέθοδοι. Γενικά σε διάφορες μελέτες έχει διαπιστωθεί ότι η ομαδοποίηση με βάση τις παραπάνω δοκιμές συμπίπτει με την ομαδοποίηση σε επίπεδο παθοποικιλίας που γίνεται με βάση το εύρος των ξενιστών. Στελέχη της ίδιας παθοποικιλίας, γενικά, εμφανίζουν περιορισμένο αριθμό ξενιστών. Εξαιρέση αποτελεί η παθοποικιλία *syringae* στελέχη της οποίας προκαλούν ασθένειες σε περισσότερα από 80 φυτά-ξενιστές. Το φαινόμενο αυτό μπορεί να οφείλεται στο γεγονός, ότι πολύ συχνά ένα φυτό προσβάλλεται από στελέχη δυο διαφορετικών παθοποικιλιών ένα από τα οποία συνήθως ανήκει στην παθοποικιλία *syringae*.

Ανάμεσα στην ποικιλία των μικροοργανισμών που αποικίζουν τη φυλλόσφαιρα, το βακτήριο *Pseudomonas syringae* εμφανίζει ιδιαίτερη σημασία καθώς συμμετέχει σε αυτή με τις ιδιότητες του παθογόνου, του επίφυτου και του παγοποιητικού παράγοντα. Επίσης είναι ο πρώτος γενετικά τροποποιημένος μικροοργανισμός που εισήχθηκε σε οικολογικά περιβάλλοντα, για την αντιμετώπιση του παγετού.

Κατά τη διάρκεια του πρώτου μισού του 19<sup>ου</sup> αιώνα το βακτήριο *P. syringae* είχε απομονωθεί και ταυτοποιηθεί ως το παθογόνο αίτιο πολλών ασθενειών των φυτών. Ο ρόλος του ως φυτοπαθογόνου, είχε αναγνωριστεί από πολύ νωρίς. Το 1959, ο J. E. Crosse (Crosse, 1959) σε μελέτη του πάνω στο βακτηριακό έλκος της κερασιάς, εξέφρασε τη θεωρία για το ρόλο των επιφυτικών πληθυσμών των βακτηρίων στην



επιδημιολογία των ασθενειών, που προκαλούνται από διάφορες παθοποιικιλίες του *P. syringae*, όπως επίσης και από άλλα βακτήρια. Με βάση τις εργασίες αυτές διαπιστώθηκε ο σημαντικός ρόλος των επιφυτικών βακτηρίων της φυλλόσφαιρας στην ανάπτυξη και στην εκδήλωση των ασθενειών. Σήμερα είναι γενικά αποδεκτή η άποψη ότι ορισμένα είδη βακτηρίων αποικίζουν τη φυλλόσφαιρα φυτών χωρίς να εκδηλώνουν απαραίτητα μολυσματικότητα, παρά μόνο κάτω από κατάλληλες συνθήκες. Παρόλο που είναι γενικά αποδεκτό, ότι οι επιφυτικοί πληθυσμοί του *P. syringae* στη φυλλική επιφάνεια ασυμπτωματικών φυτών-ξενιστών καθώς και σε φύλλα μη ξενιστών μπορούν να χρησιμεύσουν ως πηγές μολυσμάτων, αυτό γίνεται μόνο όταν οι πληθυσμοί των βακτηρίων αυξάνονται σε τέτοιο επίπεδο, ώστε να διαταράσσεται η ισορροπία ανάμεσα στο βακτήριο και στο περιβάλλον στο οποίο αναπτύσσεται.

Τα στελέχη του *P. syringae* που εμφανίζουν τον φαινότυπο της δημιουργίας παγοκρυστάλλων, σε θερμοκρασίες κάτω του μηδενός αλλοιώνουν το φυλλικό περιβάλλον μέσα στο οποίο αναπτύσσονται. Φυτά που είναι ευαίσθητα στο ψύχος καταστρέφονται εξαιτίας της δημιουργίας παγοκρυστάλλων στους μεσοκυττάριους χώρους, όταν επικρατούν θερμοκρασίες, ανάλογα με το φυτικό είδος, από -5 μέχρι 10°C. Με την παρουσία στη φυλλόσφαιρα στελεχών του *P. syringae*, που εμφανίζουν το φαινότυπο INA<sup>+</sup>, η δημιουργία παγοκρυστάλλων γίνεται σε υψηλότερες θερμοκρασίες (-2 °C). Επειδή τα περισσότερα βακτηριακά κύτταρα ανάμεσα σε ένα πληθυσμό INA<sup>+</sup> βακτηρίων δεν είναι ενεργά σε δεδομένη χρονική στιγμή και σε συγκεκριμένη θερμοκρασία, όσο μεγαλύτερος είναι ο βακτηριακός πληθυσμός τόσο αυξάνεται η πιθανότητα ένα ή περισσότερα κύτταρα να διαθέτουν την ικανότητα δημιουργίας παγοκρυστάλλων. Έτσι το *P. syringae* καταστρέφει τους φυτικούς ιστούς στους οποίους αναπτύσσεται με δυο τρόπους, αφενός με την ανάπτυξη ασθενειών και αφ ετέρου με την πρόκληση παγετοπληξίας.

## **1.2 Το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola***

Τα σταυρανθή προσβάλλονται από διάφορα παθογόνα με αποτέλεσμα την εκδήλωση σημαντικών ασθενειών (Πίνακας 1). Το *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola*, είναι η πιο σημαντική ψευδομονάδα που προκαλεί ασθένειες στα σταυρανθή. Περιγράφηκε για πρώτη φορά σαν παθογόνο στο κουνουπίδι (*Brassica oleracea* var. *botrytis* οικ. Brassicaceae), το 1911 και από τότε έχει περιγραφεί σε τουλάχιστον 25 μέλη της οικογένειας Brassicaceae.

**Πίνακας 1.** Κυριότερες ασθένειες των σταυρανθών (Παναγόπουλος 2000, <http://osufact.okstate.edu>).

<b>Βακτηριολογικές ασθένειες φυλλώματος</b>	
<b>Ασθένεια</b>	<b>Παθογόνο</b>
Βακτηριακή νέκρωση	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>alisalensis</i>
Μελάνωση νεύρων ή μαύρη σήψη (Black rot)	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>
Βακτηριακή κηλίδωση (bacterial leaf spot)	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>armoraciae</i>
Παπυρώδης κηλίδωση (Peppery leaf spot)	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>maculicola</i>
Μελάνωση των νεύρων	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>
Υγρή βακτηριακή σήψη	<i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i>
Βακτηριακή οφειλόμενη σε <i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas marginalis</i> pv. <i>marginalis</i>
Καρκίνος Crown gall	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
Βακτηριακή κηλίδωση από <i>Xanthomonas</i>	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>armoraciae</i>
Ακτινομόκωση	<i>Streptomyces</i> spp.
Κιτρίνισμα (Yellowing diseases)	Phytoplasma
<b>Μυκητολογικές ασθένειες φυλλώματος</b>	
Λευκή κηλίδωση (White leaf spot)	<i>Cercospora brassicicola</i> , <i>Cercospora</i> spp.
Μαύρη κηλίδωση (Black leaf spot)	<i>Alternaria brassicae</i>
Ανθράκωση (Anthracnose)	<i>Colletotrichum higginsianum</i>
Δακτυλιωτή κηλίδωση	<i>Mycosphaerella brassicicola</i>
Περονόσπορος (Downy mildew)	<i>Peronospora parasitica</i>
Λευκή σκωρίαση (White rust)	<i>Albugo candida</i>
Μαύρος λαιμός	<i>Leptosphaeria maculans</i> ( <i>Phoma lingam</i> )
Αλτερναρίωση	<i>Alternaria brassicae</i>
Όγκοι ριζών (Clubroot)	<i>Plasmodiophora brassicae</i>
Σκληρωτινίαση	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>
Ανδρομόκωση (Verticillium wilt)	<i>Verticillium dahliae</i>
Βοτρύτης	<i>Botrytis cinerea</i>
Ριζοκτόνια	<i>Thanatephorus cucumeris</i>
Σήψη από <i>Rhizopus</i> (Black mold rot)	<i>Rhizopus stolonifer</i>
Ωίδιο (Powdery mildew)	<i>Erysiphe polygoni</i>
Σκληρωτίαση (Southern blight)	<i>Sclerotium rolfsii</i>
<b>Ιολογικές ασθένειες</b>	
Ιός του μωσαϊκού του γογγυλιού	Turnip mosaic potyvirus (TuMV)
Ιός του μωσαϊκού της ανθοκράμβης	Cauliflower mosaic caulimovirus (CaMV)
Ιός του μωσαϊκού της ραφανίδος	Radish mosaic comovirus (RaMV)
Ιός του ζαρώματος των φύλλων του γογγυλιού	Turnip crinkle carmovirus (TCV)
Ιός της ροζέτας του γογγυλιού	Turnip rosette sobemovirus (TRoV)
<b>Ασθένειες εδάφους</b>	
Σήψεις και τήξεις φυταρίων	<i>Fusarium</i> , <i>Rhizoctonia</i> , <i>Pythium</i> spp.
Σήψεις ριζών	<i>Aphanomyces raphani</i> , <i>Phymatotrichopsis omnivore</i> , <i>Phytophthora magesperma</i>

Είναι ένα κοινό παθογόνο βακτηριακών κηλιδώσεων στα σταυρανθή όπως στο μπρόκολο (*Brassica oleracea* var. *Italica*) και στο κουνουπίδι (*Brassica oleracea* var. *botrytis*) (Πίνακας 2). Το *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* και το *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* είναι συγγενή παθογόνα και μερικοί ερευνητές υποθέτουν ότι πρόκειται για συνώνυμα της ίδιας παθοποικιλίας. Αυτά μπορεί να έχουν αλληλεπικαλυπτόμενο εύρος ξενιστών όπως π.χ. στελέχη του *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* προκαλούν ασθένεια στο κουνουπίδι, σε μερικές αλλά όχι σε όλες τις μελέτες. Οι Cintas *et al.* , 2002 υποστηρίζουν ότι πρόκειται για δύο διαφορετικές αλλά πολύ συσχετιζόμενες παθοποικιλίες. Το *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* δεν προκαλεί ασθένεια στο μπρόκολο, μπροκολίνι και το κουνουπίδι, ενώ αντίθετα το *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* προκαλεί ασθένειες (Bull *et al.*, 2004).

**Πίνακας 2.** Ξεניστές των βακτηρίων *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* & *Pseudomonas syringae* pv. *alisalensis*

ΟΝΟΜΑΣΙΑ ΞΕΝΙΣΤΩΝ			ΠΑΘΟΓΟΝΑ	
ΛΑΤΙΝΙΚΗ	ΑΓΓΛΙΚΗ	ΕΛΛΗΝΙΚΗ	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>maculicola</i>	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>alisalensis</i>
<i>Brassica oleracea</i> var. <i>botrytis</i> X <i>B. oleracea</i> var. <i>alboglabra</i>	Broccolini (Asprobrock)		+	+
<i>Brassica oleracea</i> var. <i>italica</i>	Broccoli	Μπρόκολο	+	+
<i>Brassica oleracea</i> var. <i>botrytis</i>	Cauliflower	Κουνουπίδι	+	+
<i>Brassica oleracea</i> subsp. <i>gemmifera</i>	Brussels sprouts	Λάχανο Βρυξελλών		+
<i>Brassica napus</i>	Rape, turnip, navet	Ελαιοκράμβη		+
<i>Brassica napus</i> var. <i>napobrassica</i>	Rutabaga (παραλλαγή <i>B. rapa</i> )			+
<i>Brassica juncea</i> var. <i>crispifolia</i>	Mustard	Σινάπι	+	
<i>Brassica nigra</i>		Σινάπι		
<i>Brassica hirta</i>	White mustard	Σινάπι		+
<i>Brassica rapa</i>	Turnip greens		+	
<i>Brassica rapa</i> subsp. <i>rapa</i>	Broccoli raab, Rappini	Κράμβη η ράπυς, γογγύλι, ράφους, ράπυς, ραίβα	+	+
<i>Brassica rapa</i> var. <i>perviridis</i>	Spinash mustard	Σινάπι	+	
<i>Brassica rapa</i> var. <i>utilis</i>	Turnip		+	
<i>Brassica oleracea</i> var. <i>viridis</i>	Collards		+	
<i>Brassica oleracea</i> var. <i>pekinensis</i>	Kale	Κινέζικο λάχανο	+	
<i>Eruca sativa</i>	Arugala	Ρόκα		+
<i>Raphanus sativus</i>	Radish	Ραπάνι		+
<i>Avena sativa</i>	Oat	Βρώμη	-	+
<i>Phleum pratense</i>	Timothy	Φλέως (αγροστόδη)	-	+
<i>Bromus carinatus</i>	California brome		-	+
<i>Lycopersicon esculentum</i>	Tomato	Τομάτα	+	+

### 1.3 Το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *alisalensis*

Οι βακτηριακές ασθένειες του μπρόκολου, είναι σχετικά νέες και σε αρκετές περιπτώσεις καταστροφικές ασθένειες. Η ασθένεια βακτηριακή νέκρωση - κηλίδωση περιγράφηκε αρχικά το 1998, μετά από σημαντικές προσβολές που διαπιστώθηκαν σε καλλιεργήσιμες εκτάσεις στην κοιλάδα του Salinas των ΗΠΑ. Τα αρχικά συμπτώματα που παρατηρούνται είναι μικρές υδαρείς κηλίδες στα κατώτερα φύλλα του φυτού. Σταδιακά οι κηλίδες επεκτείνονται και περιβάλλονται από ένα χλωρωτικό περιθώριο. Συχνά οι κηλίδες μπορεί να συνενωθούν και να σχηματίσουν μεγαλύτερα νεκρωτικά τμήματα. Η ασθένεια, θεωρείται οικονομικά σημαντική για το μπρόκολο, αφού οι νεκρώσεις του φυλλώματος καθιστούν την παραγωγή μη εμπορεύσιμη ή μειώνουν την εμπορική της αξία. Αρχικές έρευνες, (1997) έδειξαν, ότι το παθογόνο ήταν το βακτήριο *Pseudomonas syringae*, χωρίς όμως να ταυτοποιηθεί το παθογόνο σε επίπεδο παθοποικιλίας. Δεδομένου ότι το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola*, προκαλεί συνήθως βακτηριακές κηλιδώσεις σε πολλά σταυρανθή, πιθανά το πραγματικό παθογόνο αίτιο της βακτηριακής νέκρωσης του μπρόκολου, να μην αναγνωρίστηκε άμεσα, επειδή πιθανά αποδόθηκε στο πρώτο βακτήριο. Ωστόσο το παθογόνο του μπρόκολου, βρέθηκε ότι έχει ένα χαρακτηριστικό μορφολογικό φαινότυπο της αποικίας, έντονα διαφορετικό από εκείνο του *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* άλλα και από άλλα γνωστά παθογόνα των σταυρανθών. Μια νέα παθοποικιλία, το *Pseudomonas syringae* pv. *alisalensis*, προσδιορίστηκε ως το παθογόνο που προκαλεί βακτηριακή νέκρωση του μπρόκολου, γιατί το παθογόνο βρέθηκε να έχει ένα συγκεκριμένο εύρος ξενιστών, και μια συγκεκριμένη αλληλουχία νουκλεοτιδίων κατά την εξέταση σε PCR (rep-pcr). Στη συνέχεια η έξαρση της βακτηριακής νέκρωσης σε εμπορικές καλλιέργειες μπρόκολου (*Brassica oleracea* subsp. *botrytis*), και ρόκας (*Eruca sativa*) βρέθηκε ότι προκαλούνται από το ίδιο παθογόνο, δηλαδή το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *alisalensis*. Το παθογόνο έχει μεγαλύτερο εύρος ξενιστών από το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola*, στους οποίους συμπεριλαμβάνονται και κάποια μονοκοτυλήδονα, όπως το ζιζάνιο Βρώμος της Καλιφόρνιας (*Bromus carinatus*) και Φλέως (timothy, *Phleum pretense*), η Βρώμη (*Avena sativa*) και διάφορα σταυρανθή: ανθοκράμβη (*Brassica oleracea* subsp. *botrytis*), λαχανάκια Βρυξελλών (*Brassica oleracea* subsp. *gemmifera*), Asprobrock (*Brassica oleracea* var. *botrytis* x *Brassica alboglabra*) rape (*Brassica*

*napus*), white mustard (*Brassica hirta*) και το ραπάνι radish, (*Raphanus sativus*), και τομάτα (*Lycopersicon esculentum*). Λίγα στοιχεία είναι γνωστά σχετικά με την οικολογία και την επιδημιολογία του *Pseudomonas syringae* pv. *alisalensis* σε αντίθεση με το *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* και άλλες παθοποικιλίες του *Pseudomonas syringae*.

Διάφορες παθοποικιλίες του *Pseudomonas syringae* μεταφέρονται με το σπόρο στις καλλιέργειες λαχανικών. Το βακτήριο μπορεί να επιβιώσει στο έδαφος, κυρίως σε φυτικά υπολείμματα και μπορεί να αποτελέσει το αρχικό μόλυσμα για την ανάπτυξη της ασθένειας σε καλλιέργειες που ακολουθούν. Για παράδειγμα, το *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola*, επιβιώνει σε φυτικά υπολείμματα για πάνω από δύο μήνες μετά από ενσωμάτωσή τους και «επανερχόμενο μόλυσμα» του *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* από προηγούμενες καλλιέργειες μπορεί να προκαλέσει μολύνσεις σε διαδοχικές καλλιέργειες τομάτας στο ίδιο χωράφι. Ωστόσο η ικανότητα των παθογόνων να επιβιώνουν στο έδαφος και/ή στα υπολείμματα και να χρησιμεύουν ως «επανερχόμενο μόλυσμα», διαφέρει ανάλογα με τις περιβαλλοντικές συνθήκες, από τις φυλές των παθοποικιλιών του *Pseudomonas syringae*. Επιπλέον, το *Pseudomonas syringae*, είναι ένα ετερογενές είδος που μπορεί να διαιρεθεί σε τουλάχιστον οκτώ είδη (γονοτυπικά) με βάση τη γονιδιακή τους συσχέτιση. Τα είδη αυτά διαφέρουν μεταξύ τους οικολογικά και γι' αυτό το λόγο η σπουδαιότητα των μολυσμάτων, μπορεί επίσης να διαφέρει. Ανεξάρτητα αν το μόλυσμα προέρχεται από το έδαφος και/ή φυτικά υπολείμματα, φαίνεται να παίζει ιδιαίτερο ρόλο στη βακτηριακή νέκρωση των σταυρανθών. Το *Pseudomonas syringae* pv. *alisalensis*, στο έδαφος ή στα φυτικά υπολείμματα μπορεί να έχει ιδιαίτερη σημασία για την διαχείριση της ασθένειας αν το μόλυσμα που επιβιώνει μολύνει τα νέα φυτά. Αυτό θα μπορούσε να είναι ιδιαίτερα σημαντικό σε περιοχές με ήπιο καιρό, που επιτρέπουν μακρά περίοδο βλάστησης και πολλαπλασιασμού των φυτών σε επαναλαμβανόμενες σπορές τον ίδιο χρόνο στα ίδια χωράφια (Cintas *et al.*, 2006., Cintas *et al.*, 2002, Cintas *et al.*, 2000).

#### **1.4 Συμπτώματα του *Pseudomonas syringae* pv. *alisalensis* στην ρόκα.**

Αρχικά, τα συμπτώματα εμφανίζονται σαν μικρές, γωνιώδεις, υδαρείς κηλίδες, ορατές και από τις δύο επιφάνειες του φύλλου. Αργότερα οι κηλίδες μεγαλώνουν, παραμένουν γωνιώδεις και αποκτούν διαδοχικά χρώμα γκρι – καφέ – καστανό - μαύρο. Μερικές φορές, ένα ιώδες (ερυθροκύανο) περιθώριο παρατηρείται γύρω από τις

κηλίδες. Ένα σημαντικό διαγνωστικό στοιχείο της ασθένειας είναι το ότι τα συμπτώματα της ασθένειας είναι παρόμοια με εκείνα των προσβολών από τον περονόσπορο των σταυρανθών (*Peronospora parasitica*), χωρίς όμως την παρουσία του παθογόνου μύκητα που γίνεται εμφανής με την ανάπτυξη και παρουσία των σποριαγγείων του παθογόνου. Οι κηλίδες όταν συνενώνονται δίνουν στα προσβεβλημένα φύλλα εμφάνιση νεκρωτική ενώ τα προσβεβλημένα τμήματα συνήθως αποκτούν υφή παπυρώδη. Η έντονη προσβολή προκαλεί την καταστροφή και την έντονη ποιοτική υποβάθμισή των φύλλων (Bull *et al.*, 2004).

### **1.5 Συμπτώματα του *Pseudomonas syringae* pv. *alisalensis* σε άλλα σταυρανθή (μπρόκολο – κουνουπίδι).**

Τα αρχικά συμπτώματα εμφανίζονται σαν μικρά υδαρή στίγματα (flecks), κυρίως στα κατώτερα φύλλα. Τα στίγματα αυτά, σταδιακά μεγαλώνουν και παραβάλλονται από ένα ανοιχτού κίτρινου χρώματος περιθώριο, τα οποία συνήθως συνενώνονται με αποτέλεσμα τον σχηματισμό μεγάλων νεκρωτικών τμημάτων (Koike *et al.*, 2006).

### **1.6 Συμπτώματα του *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* σε φυλλώδη σταυρανθή.**

Τα τυπικά συμπτώματα που προκαλούνται από το από το *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola*, είναι μικρές, καστανές νεκρωτικές κηλίδες, με ακανόνιστα όρια, περιβαλλόμενες από χλωρωτικό περιθώριο. Εντούτοις, το παθογόνο μπορεί να προκαλεί ποικίλα συμπτώματα, στα οποία περιβάλλονται από χλωρωτικές, υδαρείς και νεκρωτικές κηλιδώσεις, μέχρι νέκρωση του κατώτερου ήμισυ του φυλλώματος του φυτού, στην περίπτωση της συνένωσης των νεκρωτικών κηλίδων. Το κιτρίνισμα των φύλλων είναι εντονότερο στα παλαιά απ' ότι στα νεαρότερα φύλλα (Keinath *et al.*, 2006.)

Όπως προκύπτει από τις περιγραφές διαφόρων ερευνητών, η διαφοροποίηση των συμπτωμάτων που προκαλούνται από το *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* και το *Pseudomonas syringae* pv. *alisalensis*, δεν είναι πάντα εύκολη.

### 1.7 Το φυτό ρόκα.

Το Εύζωμον το ήμερον (*Eruca sativa*), της οικογένειας των σταυρανθών (Brassicaceae ή Cruciferae), είναι ετήσιο φυτό, ιθαγενές της Ευρώπης κοινό στην



Ελλάδα και τις παραμεσόγειες χώρες, γνωστό με την κοινή ονομασία ρόκα, ή αρώματος (στην Κρήτη). Είναι λαχανικό γνωστό μεταξύ εκείνων που ονομάζονταν «επίσπορα» από τον Θεόφραστο, δηλαδή αυτών που μπορούν να σπαρθούν πολλές φορές κατά την διάρκεια του έτους. Είναι συγγενές

με το φυτό *Eruca langirostra* δηλαδή την άγρια ρόκα ή αζούματο που παλαιότερα φύτευε σε μεγάλες εκτάσεις, σαν σπαρτό, και θεωρείτο φυτό με μελισσοκομική αξία (Γενναδίου, 1959).

Η ρόκα είναι χειμωνιάτικο φυτό, ενώ ανθίζει από το Μάρτιο έως τον Ιούνιο. Το ύψος του φυτού φτάνει τα 20 - 100 χιλιοστά με βλαστούς που διακλαδίζονται. Τα άνθη του φυτού είναι μπεζ με διάμετρο δύο έως τέσσερα εκατοστά και σχηματίζουν ταξιανθία κόρυμβο, με την τυπική δομή του άνθους των σταυρανθών. Τα πέταλα είναι μπεζ, με μωβ πορφυρές νευρώσεις και οι στήμονες κίτρινοι. Το φυτό αποβάλλει τα σέπαλά του, αμέσως μετά την άνθιση. Τα φύλλα του είναι πτεροειδή, έλοβα με τέσσερις έως δέκα μικρούς, πλευρικούς λοβούς και ένα μεγάλο, ακραίο λοβό. Ο καρπός είναι μικρός, κωνικός, ραμφοειδής και περιέχει αρκετούς ωοειδής σπόρους κίτρινου χρώματος. Ο βλαστός και τα φύλλα της ρόκας τρώγονται σε διάφορες σαλάτες, ενώ σε ορισμένες περιοχές μαγειρεύεται. Η ρίζα του φυτού είναι πασσαλώδης. Πολλαπλασιάζεται με σπόρο. Η σπορά γίνεται με το χέρι (στα πεταχτά), από την Άνοιξη μέχρι το Φθινόπωρο. Σε μεγάλες καλλιέργειες η σπορά γίνεται με σπαρτικές μηχανές. Ευδοκίμει στα περισσότερα εδάφη με μικρή αντοχή στο pH (6-7). Τα τελευταία χρόνια έχει γίνει ιδιαίτερα δημοφιλής σε διάφορες χώρες του κόσμου. Καλλιεργείται για τα μικρά της φύλλα και καταναλώνεται ως σαλάτα από μόνη της, ή σε ανάμειξη με άλλες σαλάτες. Στην περίπτωση αυτή, συγκομίζεται περίπου δεκαοχτώ ημέρες από την σπορά. Τα ώριμα φυτά συγκομίζονται τριάντα με πενήντα ημέρες από την σπορά και πωλούνται σε ματσάκια και συνήθως τρώγεται μαγειρεμένη. Η γεύση της είναι πιπεράτη, αρωματική και ελαφρώς πικρή. Η άγρια ρόκα έχει πιο πιπεράτη γεύση και πιο έντονο άρωμα από την καλλιεργούμενη. Από τα σπόρια του φυτού



λαμβάνεται ένα ελαφρώς καυστικό έλαιο που χρησιμοποιείται στην φαρμακευτική. Η ρόκα που χρησιμοποιείται για θεραπευτικούς σκοπούς, πρέπει να συγκομίζεται κατά την ανθοφορία του φυτού.

### **1.8 Σκοπός της μελέτης**

Σκοπός της εργασίας αυτής, είναι η μελέτη μιας πρωτοεμφανιζόμενης ασθένειας της ρόκας 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.

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2**

### **ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

## 2.1 Απομόνωση του παθογόνου

Για την απομόνωση των στελεχών του βακτηρίου, πάρθηκαν δείγματα φύλλων μολυσμένων φυτών τα οποία ξεπλύθηκαν αρχικά με νερό βρύσης για την απομάκρυνση ξένων υλών και στη συνέχεια με απεσταγμένο και αποστειρωμένο νερό. Επιλέχθηκαν τμήματα από την περιφέρεια των κηλίδων τα οποία μετά την κοπή τους τοποθετήθηκαν σε τριβλίο που περιείχε 2ml αποστειρωμένο νερό, όπου και τεμαχίστηκαν σε πολύ μικρά κομμάτια.

Ποσότητα 20 μl από το αιώρημα που δημιουργήθηκε, απλώθηκε σε τριβλία που περιείχαν θρεπτικό υπόστρωμα King's B (King *et al.*, 1954) με τη μέθοδο της διασποράς και επώαστηκε στους 27 °C για 24-48 ώρες. Οι επικρατέστερες αποικίες που παρατηρήθηκαν κατά τις απομονώσεις υποκαλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα King's μέχρι να δημιουργηθεί καθαρή καλλιέργεια. Οι απομονώσεις που επιλέχθηκαν διατηρήθηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα Gelose profonde στους 4°C σε όλη τη διάρκεια της εργασίας.

Από τις απομονώσεις που έγιναν σε θρεπτικό υπόστρωμα King's φάνηκε ότι τα απομονωμένα βακτήρια ανήκαν στις φθορίζουσες ψευδομονάδες. Στη συνέχεια εξετάστηκαν αρχικά ως προς τις δοκιμές L.O.P.A.T. (παραγωγή LEVAN, δραστηριότητα οξειδάσης, πηκτινόλυση στην πατάτα, αναερόβια διάσπαση αργινίνης, αντίδραση υπερευαισθησίας στον καπνό) και στη συνέχεια χαρακτηρίστηκαν αναλυτικότερα με βάση τις μορφολογικές, φυσιολογικές και βιοχημικές δοκιμές που αναφέρονται στον Πίνακα 4.

Οι απομονώσεις της ρόκας και τα ήδη ταυτοποιημένα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν συγκριτικά κατά τη διάρκεια της εργασίας, παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.

Πίνακας 3. Βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια της μελέτης

Βακτήριο	Βακτηριακά στελέχη	Ξενιστής	Προέλευση
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	226	Πεπονιά	Τυμπάκι - Ηράκλειο
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	201, 202	Αχλαδιά, Ξυνά	Μπενάκειο - Αθήνα
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	84, 92, 111, 115	Τομάτα	Τυμπάκι, Μητρόπολις
<i>Pseudomonas viridiflava</i>	273, 275, 280	Σέλινο	Τ.Ε.Ι. - Ηράκλειο
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>apii</i>	279	Σέλινο	Τ.Ε.Ι. - Ηράκλειο
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>alisalensis</i>	E <sub>3</sub> , E <sub>3-1</sub> , E <sub>3-2</sub> , E <sub>3-3</sub> , E <sub>3-4</sub>	Ρόκα	Ηράκλειο- Κρήτη
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>alisalensis</i>	R <sub>1</sub> , R <sub>1-1</sub> , R <sub>1-2</sub> , R <sub>1-3</sub> , R <sub>1-4</sub>	Ρόκα	Μέγαρα - Αττικής
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>alisalensis</i>	R <sub>6</sub> , R <sub>6-1</sub> , R <sub>6-2</sub> , R <sub>6-3</sub> , R <sub>6-4</sub>	Ρόκα	Ηράκλειο - Κρήτη
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>alisalensis</i>	Λ-B <sub>5</sub>	Λαχανάκι Βρυξελλών	Επαναπομόνωση από τεχνητή μόλυνση

## 2.2 Δοκιμές παθογένειας

Όλα τα απομονωθέντα στελέχη εξετάστηκαν ως προς την ικανότητα έκλυσης αντίδρασης υπερευαισθησίας σε φυτά καπνού, με την μέθοδο της έγχυσης βακτηριακού αιωρήματος με την βοήθεια σύριγγας. Τα φυτά μετά την έγχυση καλύφθηκαν με σακούλες πολυαιθυλενίου για τη διατήρηση της υγρασίας σε επίπεδο κορεσμού και τοποθετήθηκαν σε συνθήκες δωματίου.

Η παθογένεια των απομονωθέντων βακτηρίων εξετάστηκε αρχικά με την πραγματοποίηση τεχνητών μολύνσεων σε σπορόφυτα ρόκας (*Eruca sativa*) ηλικίας περίπου ενός μήνα και στη συνέχεια σε ανεπτυγμένα φυτά ρόκας ηλικίας 2-3 μηνών, σε καλλιέργεια σε γλάστρες στο θερμοκηπίου. Οι μολύνσεις έγιναν στα φύλλα των φυτών μετά τη δημιουργία πληγών με τη βοήθεια «βούρτσας – ψύκτρας». Στη συνέχεια τα φυτά ψεκάστηκαν μέχρι απορροής με το αντίστοιχο βακτηριακό αιώρημα, με ψεκαστήρα χειριού.

Η παρασκευή των αιωρημάτων έγινε σε απεσταγμένο – αποστειρωμένο νερό με την βοήθεια αποστειρωμένης οδοντογλυφίδας, από καλλιέργεια 48 ωρών σε θρεπτικό υπόστρωμα King's B. Οι συγκεντρώσεις των αιωρημάτων που χρησιμοποιήθηκαν ήταν περίπου 10<sup>6</sup> cfu/ml. Τα φυτά καλύφθηκαν με σακούλες πολυαιθυλενίου για τη

διατήρηση της υγρασίας σε επίπεδο κορεσμού και τοποθετήθηκαν στο θερμοκήπιο. Μετά από 48 – 72 ώρες αφαιρέθηκαν οι σακούλες και τα φυτά παρέμειναν στο θερμοκήπιο, σε συνθήκες υγρασίας (70-80 %) και θερμοκρασίας περίπου 15 – 25 °C.

Παρατηρήσεις για την ανάπτυξη των συμπτωμάτων λαμβάνονταν για τουλάχιστον δεκαπέντε ημέρες. Επιπλέον, η παθογένεια των απομονωθέντων βακτηρίων ελέγχθηκε και σε κεφαλές από λαχανάκια Βρυξελλών (*Brassica oleracea* var. *gemmifera*), όπως και σε φύλλα κινέζικου λάχανου (*Brassica oleracea* var. *pekinensis*), με την εναπόθεση βακτηριακού αιωρήματος 10 μl, συγκέντρωσης περίπου  $10^6$  cfu/ml, σε σημείο που προηγούμενα είχε γίνει πληγή με βελόνα σύριγγας. Οι ιστοί ξεπλύθηκαν προσεκτικά και επανειλημμένα με απεσταγμένο και αποστειρωμένο νερό πριν την μόλυνση τους. Η παρασκευή των βακτηριακών αιωρημάτων έγινε όπως αναφέρθηκε προηγούμενα. Στη συνέχεια τοποθετήθηκαν σε διαφανές πλαστικό δοχείο στο οποίο είχε προστεθεί ενυδατωμένο χαρτί, για τη διατήρηση της υγρασίας. Η επώαση έγινε σε θερμοκρασία εργαστηρίου για διάστημα 10 ημερών.

Επιπλέον, μολύνσεις πραγματοποιήθηκαν σε λοβούς φασολιάς με την χρήση αποστειρωμένης οδοντογλυφίδας. Οι μολύνσεις έγιναν με παραλαβή καλλιέργειας των απομονωθέντων βακτηρίων από θρεπτικό υπόστρωμα King's, με το άκρο της οδοντογλυφίδας και βύθιση αυτού σε βάθος περίπου 2mm από την επιφάνεια των λοβών. Στη συνέχεια οι λοβοί τοποθετήθηκαν σε διαφανή πλαστικά δοχεία, κατά τέτοιο τρόπο ώστε να μην εφάπτονται, στα οποία είχε προηγουμένως προστεθεί νερό για τη διατήρηση υψηλής σχετικής υγρασίας. Στη συνέχεια τα δοχεία διαχειρίστηκαν όπως προηγούμενα.

Για τον έλεγχο του εύρους των ξενιστών πραγματοποιήθηκαν τεχνητές μολύνσεις σε φυτά της οικογένειας Brassicaceae σε στάδια ανάπτυξης που κυμαίνονταν από δύο μέχρι και οχτώ εβδομάδων. Τα φυτά αναπτύχθηκαν σε γλάστρες σε θερμοκήπιο. Μολύνσεις πραγματοποιήθηκαν σε φυτά: μπρόκολο (*Brassica oleracea* var. *italica*), κουνουπίδι (*Brassica oleracea* var. *botrytis*), λάχανο (*Brassica oleracea* var. *capitata*), ραπάνι στρογγυλό (*Raphanus sativus*), ραπάνι μακρύ (*Raphanus sativus*), ραπάνι άσπρο (*Raphanus sativus*), γούλα - σέσκουλο (*Beta vulgaris*), ελαιοκράμβης (*Brassica napus*), αλλά και φυτά τομάτας (*Lycopersicon esculentum*) και βρώμης (*Avena sativa*). Η μόλυνση πραγματοποιήθηκε με τον ίδιο τρόπο που έγιναν οι τεχνητές μολύνσεις στα φυτά της ρόκας. Τα φυτά τοποθετήθηκαν για 72h σε συνθήκες κορεσμού της σχετικής υγρασίας σε διάφανο πλαστικό δοχείο και στη συνέχεια αναπτύχθηκαν σε

θερμοκήπιο σε συνθήκες 60-70% σχετικής υγρασίας και θερμοκρασίας  $12 - 25^{\circ}\text{C} \pm 3$  °C, όπου και παρέμειναν ως την τελική μέτρηση. Για λόγους σύγκρισης στα ίδια φυτά έγιναν κατά περίπτωση τεχνητές μολύνσεις με βακτηριακά στελέχη του *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *Pseudomonas syringae* pv. *apii* και *Pseudomonas viridiflava*. Τέλος, σε όλες τις δοκιμές παθογένειας, χρησιμοποιήθηκαν συγκριτικά μάρτυρες στους οποίους οι μολύνσεις έγιναν με απεσταγμένο και αποστειρωμένο νερό και στη συνέχεια η μεταχείριση των φυτών ήταν παρόμοια με τα υπόλοιπα.

**ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3**  
**ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**

### **3.1 Περιγραφή των συμπτωμάτων της ασθένειας**

Τον Μάρτιο του 2007 μέχρι και Μάρτιο του 2008 σε δείγματα φυτών ρόκας που συνέλεξαν σπουδαστές του ΤΕΙ Κρήτης από οπωροπωλεία και πολυκαταστήματα της πόλης του Ηρακλείου και προέρχονταν από καλλιέργειες ρόκας από τις περιοχές Μεγάρων και Μαραθώνα του Ν. Αττικής, από το Ν. Ηλείας και από το Ν. Ηρακλείου Κρήτης, παρατηρήθηκαν συμπτώματα παρασιτικής ασθένειας που διαφοροποιούνταν από τις γνωστές μέχρι τότε προσβολές σε φυτά ρόκας.

Τα συμπτώματα περιορίζονται στη φυλλική επιφάνεια. Αρχικά παρατηρούνται μικρές υδαρείς, γωνιώδεις κηλίδες μεγέθους 2-5 mm, συνήθως με χλωρωτικό περιθώριο, οι οποίες είναι εμφανείς και στις δυο πλευρές του φύλλου. Οι κηλίδες περιορίζονται συχνά ανάμεσα στις νευρώσεις του ελάσματος του φύλλου και για αυτό συνήθως έχουν σχήμα γωνιώδες ενώ σπανιότερα το σχήμα τους είναι κυκλικό. Σταδιακά, οι υδαρείς κηλίδες γίνονται νεκρωτικές, παίρνουν χρώμα γκρι – καφέ – καστανό, αφυδατώνονται και συνήθως αποκτούν πατυρώδη εμφάνιση. Όταν οι κηλίδες συνενώνονται, δημιουργούν μεγαλύτερα νεκρωτικά τμήματα προκαλώντας τη μερική ή/και την πλήρη καταστροφή του φύλλου (Εικόνες 3 – 4). Οι προσβολές εκδηλώνονται στα φύλλα του φυτού ανεξάρτητα από την ηλικία τους, η εμπορευσιμότητα των οποίων μειώνεται ή εκμηδενίζεται ακόμη και με μικρό ποσοστό προσβολής, αφού αποτελούν το εδώδιμο τμήμα του φυτού. Επιπλέον, τα προσβεβλημένα σημεία αποτελούν θέσεις ανάπτυξης δευτερογενών μολύνσεων κυρίως από βακτήρια σήψεων ιδιαίτερα σε τυποποιημένες συσκευασίες φυτών ρόκας.

### **3.2 Απομόνωση και ταυτοποίηση του παθογόνου**

Κατά τη διάρκεια της μελέτης στο εργαστήριο Φυτοπαθολογίας - Βακτηριολογίας του Τ.Ε.Ι. Κρήτης, πραγματοποιήθηκε μεγάλος αριθμός απομονώσεων από προσβεβλημένα φυτά ρόκας που παρουσίαζαν τα συμπτώματα της βακτηριακής νέκρωσης. Οι απομονώσεις που πραγματοποιήθηκαν, προήλθαν από μολυσμένα φυτά ρόκας που παρουσίαζαν τα συμπτώματα της βακτηριακής νέκρωσης, τα οποία συλλέχθηκαν κυρίως από πολυκαταστήματα και οπωροπωλεία της πόλης. Στις απομονώσεις εμφανίζονταν σταθερά ένα είδος βακτηριακών αποικιών. Σε απομονώσεις που έγιναν σε θρεπτικό υπόστρωμα King's B, οι αποικίες των βακτηρίων, ήταν χρώματος υπόλευκου, υπερυψωμένες, θολές, μουκώδεις, με κανονικό περίγυρο (Εικόνα 1.2).



Όλες οι απομονώσεις χαρακτηρίστηκαν ως αρνητικές κατά Gram, σύμφωνα με τη δοκιμή της διαλυτότητας σε 3% KOH και με την τεχνική της χρώσης κατά Gram. Ήταν αερόβιες, δηλαδή εμφάνισαν οξειδωτικό μεταβολισμό της D- γλυκόζης στο υλικό των Hugh & Leifson. Σε θρεπτικό υλικό NA-Sucrose 5%, όπου εξετάζεται η παραγωγή Levan, οι αποικίες ήταν κυκλικές, χρώματος λευκού, βλεννώδους υφής, με ομαλό περιθώριο και διάμετρο 3-4mm μετά από 3 μέρες ανάπτυξης, γυαλιστερές και κυρτές δηλαδή χαρακτηριστικές του φαινοτύπου «παραγωγής Levan».

Με βάση τις δοκιμές L.O.P.A.T (L- παραγωγή Levan, O- παραγωγή οξειδάσης, P- πηκτινόλυση (σήψη) των κονδύλων της πατάτας, A- διάσπαση αργινίνης και T- αντίδραση υπερευαισθησίας σε φυτά καπνού) οι απομονώσεις από τα φύλλα της ρόκας ταυτοποιήθηκαν σαν μέλη της ομάδας Ia των φθοριζουσών ψευδομονάδων και πιο συγκεκριμένα διαπιστώθηκε ότι ανήκουν στο είδος *Pseudomonas syringae* αφού εμφάνισαν το φαινότυπο: [+ - - +] δηλαδή παραγωγή Levan (+), παραγωγή οξειδάσης (-), πηκτινόλυση (σήψη) των κονδύλων της πατάτας (-), αναερόβια διάσπαση της αργινίνης (-), αντίδραση υπερευαισθησίας (+).

Στους Πίνακες 4 & 5, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της αναλυτικής φαινοτυπικής ταυτοποίησης σε επίπεδο παθοποικιλίας. Παρατηρούμε ότι οι απομονώσεις της ρόκας, εμφανίζουν διαφορετικό φαινοτυπικό προφίλ από εκείνο των στελεχών του βακτηρίου *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* αλλά και του *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. Όλα τα στελέχη αναφοράς που χρησιμοποιήθηκαν στη διάρκεια του πειράματος εμφάνισαν τον φαινότυπο της ομάδας όπου ανήκουν.

### **3.3 Δοκιμές παθογένειας**

#### **3.3.1 Αντίδραση υπερευαισθησίας στον καπνό**

Τα απομονωθέντα στελέχη εξετάστηκαν ως προς την αντίδραση υπερευαισθησίας και όλα έδωσαν τυπική αντίδραση υπερευαισθησίας σε φύλλα καπνού ποικιλίας *Xanthi*, σε διάστημα 24-48 h (Εικόνα 1).

#### **3.3.2 Τεχνητές μολύνσεις σε φυτά ρόκας**

Οι απομονώσεις από τη ρόκα που επιλέχθηκαν για τις τεχνητές μολύνσεις προκάλεσαν την εκδήλωση των παρακάτω συμπτωμάτων σε διάστημα δέκα ημερών: Οι αρχικά υδαρείς κηλίδες, σταδιακά, εξελίχθηκαν σε νεκρωτικές με ή χωρίς χλωρωτικό

περιθώριο που συχνά οριοθετούνταν από τις νευρώσεις των φύλλων, ήταν χρώματος καφέ και αποκτούσαν αργότερα παχυρώδη εμφάνιση (Εικόνες 4 – 4.5), ενώ κατά γενικό κανόνα ήταν παρόμοιες με εκείνες που παρατηρήθηκαν κατά τις φυσικές μολύνσεις στην καλλιέργεια του φυτού.

Πίνακας 4. Ταυτοποίηση βακτηριακών απομονώσεων από τη βακτηριακή κηλίδωση της ρόκας

ΔΟΚΙΜΕΣ	ΑΠΟΜΟΝΩΣΕΙΣ ΡΟΚΑΣ R E		PSEUDOMONAS			
			<i>syringae</i> pathovars			
			<i>viridiflava</i>	<i>syringae</i>	<i>tomato</i>	<i>apii</i>
Κωδικός Στελέχους	E <sub>3</sub> , E <sub>3-1</sub> , E <sub>3-2</sub> , E <sub>3-3</sub> , E <sub>3-4</sub>	R <sub>1</sub> , R <sub>1-1</sub> , R <sub>1-2</sub> , R <sub>1-3</sub> , R <sub>1-4</sub> , R <sub>6</sub> , R <sub>6-1</sub> , R <sub>6-2</sub> , R <sub>6-3</sub> , R <sub>6-4</sub>	273, 275,	201, 202, 207, 226	84, 92, 111, 115	279
<i>Αριθμός στελεχών</i>	<b>5</b>	<b>10</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>1</b>
Φθορισμός σε AF	+	+	+	+	+	+
Παραγωγή LEVAN	-	+(R <sub>1-4</sub> -)	+	+	+	+
Οξειδάση	-	-	-	-	-	-
Πηκτινόλυση πατάτας	-	-	+	-	-	-
Αργινίνη	-	-	-	-	-	-
Αντίδραση υπερευαισθησίας (HR)	+	+	+	+	+	+
Αναγωγή νιτρικών σε N <sub>2</sub>	-	-	-	-	-	-
Arginine	-	-	-	-	-	-
Υδρόλυση ζελατίνης	-	-	NT	NT	+	-
Cellobiose	-	-	-	-	-	-
Meso tartaric	-	-	+	+	-	+
D-Sorbitol	-	-	-	-	-	-
Trehalose	-	-	-	-	-	-
I-Inositol	-	-	-	-	-	-
L-Lactate	-	-	+	+	-	+
Trigonelline	E <sub>3-4</sub> <sup>+</sup> , E <sub>3</sub> <sup>-</sup>	-	+	-	+	+
D-Tartaric	-(E <sub>3</sub> <sup>+</sup> )	+	+	-	+	-
Meso-Erithritol	-	-	-	-	-	-
DL-Tartaric	-	-	+	-	+	-
Sodium acetate	-	-	+	-	-	-
L-Tartaric	-	-	-	-	-	-
Sucrose	-	-	-	-	-	-
Sodium formate	-(E <sub>3</sub> <sup>+</sup> )	-(R <sub>6-1</sub> <sup>+</sup> )	+	+	+	+

Πίνακας 5. Αποτελέσματα από τις δοκιμές API 20 NE (Εικόνα 1.3)

ΔΟΚΙΜΕΣ	ΣΤΕΛΕΧΗ	
	<i>Pseudomonas tomato</i> 115	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>alisalensis</i> R <sub>1-1</sub>
NO <sub>3</sub>	-	-
Tryptophan	-	-
Glucose	-	-
Arginine	-	-
Urease	-	-
Aesculin	+	-
Gelatine	+	-
β-Galactosidase	-	-
Glucose	+	+
Arabinose	+	+
Mannose	+	+
Mannit	+	+
N-Acetylglucosamin	-	-
Maltose	-	-
Gluconat	+	+
Caprat	+	-
Adipat	-	-
Malat	+	+
Citrat	+	+
Phenylacetat	-	-

### 3.3.3 Μελέτη του εύρους των ξενιστών του παθογόνου

Τα αποτελέσματα των συγκριτικών τεχνητών μολύνσεων σε διάφορα φυτά με στελέχη από τα απομονωθέντα βακτήρια της ρόκα και με στελέχη του *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* παρουσιάζονται στον Πίνακα 6. Επιπλέον στη διάρκεια της μελέτης πραγματοποιήθηκαν μολύνσεις τόσο σε φυτά ρόκας όσο και διάφορα άλλα φυτά με βακτηριακά στελέχη που ανήκαν στην ομάδα *syringae* και με στελέχη του *Pseudomonas viridiflava*. Προέκυψε ότι:

Τα στελέχη της ρόκας μόλυναν τα φυτά: ρόκα (Εικόνες 4 - 4.5), μπρόκολο (Εικόνες 5 - 5.3), κουνουπίδι (Εικόνες 5.4 & 5.5), βρώμη (Εικόνες 8 - 8.3), κινέζικο λάχανο (Εικόνες 6 & 6.1), ραπάνι στρογγυλό (Εικόνες 7 & 7.1), ραπάνι μακρύ (Εικόνες 7.2 & 7.3), ραπάνι άσπρο (Εικόνες 7.4 & 7.5), ελαιοκράμβη (Εικόνες 6.2 & 6.3), τομάτα (Εικόνες 9 - 9.2) και λαχανάκια Βρυξελλών. Αντίθετα τα στελέχη του *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* μόλυναν μόνο την τομάτα.

Τα στελέχη αναφοράς που χρησιμοποιήθηκαν στις μολύνσεις έδωσαν τα παρακάτω αποτελέσματα :

- Τα στελέχη από πεπονιά (201, 202, 207, 226) του *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* δεν μόλυναν τα φυτά της ρόκας στο διάστημα των δέκα ημερών, αφού δεν παρατηρήθηκε καμία εκδήλωση συμπτωμάτων.
- Τα στελέχη 273 & 275 του *Pseudomonas viridiflava* μόλυναν τα φυτά της τομάτας αλλά τα συμπτώματα ήταν διαφορετικά και τυπικά της προσβολής από το βακτήριο. Τα ίδια στελέχη δεν μόλυναν το κουνουπίδι και το λάχανο ενώ φυτά από μπρόκολο έδωσαν άτυπα συμπτώματα προσβολής.
- Το στέλεχος 279 του *Pseudomonas apii*, δεν μόλυνε τα φυτά λάχανο, μπρόκολο και κουνουπίδι, καθώς δεν παρατηρήθηκε καμία εκδήλωση συμπτωμάτων.

**Πίνακας 6.** Αποτελέσματα τεχνητών μολύνσεων

Φυτό	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>alisalensis</i>	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	
<b>Ρόκα</b>	<i>Eruca sativa</i>	+	-
<b>Λαχανάκια Βρυξελλών</b>	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>gemmifera</i>	+	-
<b>Κινέζικο λάχανο</b>	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>pekinensis</i>	+	-
<b>Μπρόκολο</b>	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>italica</i>	+	-
<b>Κουνουπίδι</b>	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>botrytis</i>	+	-
<b>Ραπάνι στρογγυλό</b>	<i>Raphanus sativus</i>	+	-
<b>Ραπάνι μακρύ</b>	<i>Raphanus sativus</i>	+	-
<b>Ραπάνι άσπρο</b>	<i>Raphanus sativus</i>	+	-
<b>Ελαιοκράμβη</b>	<i>Brassica napus</i> (Rapa navet)	+	-
<b>Τομάτα</b>	<i>Lycopersicon esculentum</i>	+	+
<b>Βρώμη</b>	<i>Avena sativa</i>	+	-
<b>Λάχανο</b>	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	-	-
<b>Σέσκουλο</b>	<i>Beta vulgaris</i>	-	-

### 3.3.4 Τεχνητές μολύνσεις σε λοβούς φασολιάς

Στις μολύνσεις που πραγματοποιήθηκαν σε άωρους λοβούς φασολιάς εμφανίστηκαν 3 ομάδες συμπτωμάτων. Οι λοβοί που μολύνθηκαν με στελέχη της ευρύτερης ομάδας του *Pseudomonas syringae* (συμπεριλαμβάνονται τα στελέχη της ρόκας), εκδήλωσαν ως σύμπτωμα καφέ κηλίδωση στις θέσεις μόλυνσης, χωρίς να αναπαραγάγουν ευδιάκριτα το τυπικό σύμπτωμα του brown spot, δηλαδή τη δημιουργία των χαρακτηριστικών καστανέρυθρων κυκλικών ή γωνιωδών βυθισμένων κηλίδων, που προκαλούν ορισμένα από τα στελέχη του βακτηρίου στους λοβούς φασολιάς. Η δεύτερη ομάδα συμπτωμάτων αφορά τα συμπτώματα που προκάλεσαν τα στελέχη της ομάδας του *Pseudomonas viridiflava*. Οι λοβοί που μολύνθηκαν με τα στελέχη αυτά εμφάνισαν τις χαρακτηριστικές ερυθρό-πορτοκαλόχρες κηλίδες. Τέλος τα στελέχη 111 και 115 του *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* δεν μολύναν τους λοβούς, αφού όπως και ο μάρτυρας (μόλυνση με νερό) δεν εμφάνισαν κανένα σύμπτωμα (Εικόνα 1.1).

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4**

### **ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ**

Από τα αποτελέσματα της εργασίας προκύπτει ότι τα συμπτώματα της βακτηριακής κηλίδωσης σε φυτά ρόκας (*Eruca sativa*) προκαλούνται από μια φθορίζουσα ψευδομονάδα, που ανήκει στο είδος *Pseudomonas syringae*. Το βακτήριο αυτό αναφέρεται για πρώτη φορά ως παθογόνο αίτιο ασθένειας της ρόκας στην Ελλάδα. Το φαινοτυπικό μορφολογικό, φυσιολογικό και βιοχημικό προφίλ που παρουσίασαν οι απομονώσεις από τη ρόκα, διαφοροποιείται από εκείνο των αντίστοιχων ταυτοποιημένων στελεχών των βακτηρίων *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, ως προς την αδυναμία χρησιμοποίησης των meso – tartaric (τρυγικό οξύ) και του L-Lactate (Na - γαλακτικού) αλλά και τη χρησιμοποίηση του D-Tartaric ως πηγή άνθρακα, ενώ διαφοροποιείται από εκείνο άλλων στελεχών που χρησιμοποιήθηκαν συγκριτικά στη παρούσα μελέτη.

Επιπλέον οι απομονώσεις της ρόκας, διαφοροποιούνται από τα στελέχη του *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* ως προς την χρησιμοποίηση της Trigonelline, του DL-Tartaric και ως προς την υδρόλυση της ζελατίνης. Ο βιοχημικός φαινότυπος που εμφάνισαν οι απομονώσεις της ρόκας, είναι ο ίδιος με αυτόν του βακτηρίου *Pseudomonas syringae* pv. *alisalensis* και διαφοροποιείται από εκείνον του *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola*, σύμφωνα με τα δεδομένα από τις εργασίες των Cintas *et al.*, 2002 (εμφανίζονται στον Πίνακα 7) και Peters *et al.*, 2004. Τα βακτήρια, *Pseudomonas viridiflava* και *Pseudomonas syringae* pv. *apii*, έδωσαν τον αναμενόμενο βιοχημικό φαινότυπο (Goumas *et al.*, 1999).

Από τις δοκιμές παθογένειας, προκύπτει ότι εκτός από τα φυτά της οικογένειας Brassicaceae οι απομονώσεις της ρόκας μόλυναν και την βρώμη (*Avena sativa*), (Πίνακας 6). Η μόλυνση και μονοκοτυλήδων φυτών χαρακτηρίζει το είδος *Pseudomonas syringae* pv. *alisalensis* (Πίνακας 8). Το λάχανο (*Brassica oleracea* var. *capitata*), ήταν το μόνο φυτό από την οικογένεια Brassicaceae που δεν μολύνθηκε μετά από ψεκασμό με αιώρημα του βακτηρίου. Επιτυχής ήταν η μόλυνση μόνο με τη χρησιμοποίηση πυκνού αιωρήματος και έκχυση στους παρεγχυματικούς ιστούς.

Τα παραπάνω δεδομένα μας δίνουν την δυνατότητα να υποστηρίξουμε ότι πιθανά οι απομονώσεις της ρόκας να ταξινομούνται ως στελέχη του βακτηρίου *Pseudomonas syringae* pv. *alisalensis*, γεγονός που θα πρέπει να επιβεβαιωθεί με τις σύγχρονες μοριακές τεχνικές.



Πίνακας 7. Σύμφωνα με τους Cintas *et al.*, 2002.

Table 3. Characterization of *Pseudomonas syringae* strains

Test <sup>y</sup>	<i>P. syringae</i> <sup>w</sup>						
	<i>P. syringae</i> pv. <i>alisalensis</i>		<i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i>	<i>P. syringae</i> pv. <i>maculicola</i>		<i>P. syringae</i> pv. <i>coronafaciens</i>	<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i>
	Host <sup>x</sup>			Host			
	Broccoli raab	Broccoli		Broccolini	Various		
Levan production	+ <sup>z</sup>	+	+	+	+	+	+
Oxidase	-	-	-	-	-	-	-
Potato	-	-	-	-	-	-	-
Arginine	-	-	-	-	-	-	-
Tobacco HR	+	+	+	+	+	+	+
KOH reaction	+	+	+	+	+	+	+
Ice nucleation	+	+	-	-	-	+	+
Phage sensitivity	+	+	-	-	-	-	-
Coronatine genes	+	+	+	+	+	-	-
Carbon utilization							
Tartaric acid	+	+	+	+	+	-	-
Erythritol	-	-	-	-	-	+	+
Trigonelline	-	-	+	+	+	-	+
Ascorbic Acid	-	-	+	+	+	+	+

<sup>w</sup> *P. syringae* strains tested *P. syringae* pv. *alisalensis*, BS91, BS92, BS130, BS132; *P. syringae* pv. *maculicola* from cauliflower, 0649-18, 0788-18, *P. syringae* pv. *maculicola* from broccolini BS220, BS221; *P. syringae* pv. *tomato* 0482-1, 0183-4; *P. syringae* pv. *coronafaciens* NCPPB600, 345; *P. syringae* pv. *syringae* B301Dr.

<sup>x</sup> Host indicates the original host from which the pathogen was isolated.

<sup>y</sup> Tests performed according to published methods (10,34).

<sup>z</sup> Summary of results from all tests. + = always positive for the test; - = always negative for the test; +/- = sometimes positive and sometimes negative.

**Πίνακας 8.** Ξενιστές δείκτες για τον προσδιορισμό της παθοποικιλίας *alisalensis* (σύμφωνα με τους Cintas *et al.*, 2002).

Experimental host	<i>Pseudomonas syringae</i>				
	pv. <i>alisalensis</i>	pv. <i>maculicola</i>	pv. <i>tomato</i>	pv. <i>coronafaciens</i>	pv. <i>syringae</i>
Broccoli raab	+	-	-	-	-
Broccoli	+	+	-	-	-
Brocolini	+	+	-	-	-
Cauliflower	+	+	-	-	-
Tomato	+	+/-	+	-	-
Calif. brome	+	-	-	+	-
Corn	-	-	-	-	-
Oat	+	-	-	+	-
Rye	-	-	-	+	-
Timothy	+	-	-	-	-

Dr. Carolee Bull, USDA-ARS

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5**

## **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

*Ξενογλώσση βιβλιογραφία*

1. Bull, C. T., Goldman, P. H., Morris, N. C., Koike, S. T., and Kobayashi, D. Y. 2004. Expanded host and geographic range of *Pseudomonas syringae* pv. *alisalensis*. (Abstr.) *Phytopathology* 94:S12.
2. Bull, C. T., Goldman, P. H., Smith, R. F., and Koike, S. T. 2004. *Pseudomonas syringae* pv. *alisalensis* and *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* cause disease on crucifers used in cover crop mixtures. (Abstr.) *Phytopathology* 94:S150.
3. Bull, C. T., Goldman, P., and Koike, S. T. 2004. Bacterial blight on arugula, a new disease caused by *Pseudomonas syringae* pv. *alisalensis* in California. *Plant Dis.* 88:1384.
4. Cintas, N. A., Koike, S. T., and Bull, C. T. 2001. Emerging bacterial pathogens of crucifers in the Salinas Valley of California. Pages 272-274 in: *Plant Pathogenic Bacteria*, S. H. De Boer, ed. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
5. Cintas, N. A., Koike, S. T., and Bull, C. T. 2002. A new pathovar, *Pseudomonas syringae* pv. *alisalensis* pv. nov., proposed for the causal agent of bacterial blight of broccoli and broccoli raab. *Plant Dis.* 86:992-998.
6. Cintas, N. A., Koike, S. T., Bunch, R. A., and Bull, C. T. 2006. Holdover inoculum of *Pseudomonas syringae* pv. *alisalensis* from broccoli raab causes disease in subsequent plantings. *Plant Dis.* 90:1077-1084.
7. Cintas, N. A., Koike, S.T., and Bull, C. T. 2000. Rappini bacterial blight declines with delayed replanting in the Salinas Valley of California. (Abstr.) *Phytopathology* 90:S15.
8. Cuppels, D. A., Louws, F. J., and Ainsworth, T. 2006. Development and evaluation of PCR-based diagnostic assays for the bacterial speck and bacterial spot pathogens of tomato. *Plant Dis.* 90:451-458.
9. Goumas D.E. and Chatzaki A.K. 1998. Characterization and host range evaluation of *Pseudomonas viridiflava* from melon, blite, tomato, chrysanthemum and eggplant. *European Journal of Plant Pathology*, 104, 181-188.

10. Goumas D.E., Malathrakis N.E. and Chatzaki A.K. 1999. Characterization of *Pseudomonas viridiflava* associated with a new symptom on tomato fruit. *European Journal of Plant Pathology*, 105, 927-932.
11. Keinath, A. P., Wechter, W. P., and Smith, J. P. 2006. First Report of Bacterial Leaf Spot on Leafy Brassica Greens Caused by *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* in South Carolina. *Plant Dis.* 90:863.
12. Koike, S. T., Cintas, N. A., and Bull C. T. 2000. Bacterial blight, a new disease of broccoli caused by *Pseudomonas syringae* in California. *Plant Dis.* 83:370.
13. Koike, S. T., Henderson, D. M., Azad, H. R., Cooksey, D. A., and Little, E. L. 1998. Bacterial blight of broccoli raab: A new disease caused by a pathovar of *Pseudomonas syringae*. *Plant Dis.* 82:727-731.
14. Koike, S. T., Kammeijer, K., Bull, C. T., and O'Brien, D. 2006. First Report of Bacterial Blight of Romanesco Cauliflower (*Brassica oleracea* var. *botrytis*) Caused by *Pseudomonas syringae* pv. *alisalensis* in California. *Plant Dis.* 90:1551.
15. Mohamed, M. F., and Coyne, D. P. 1995. Photoperiod sometimes influences common bacterial blight disease of common beans. *HortScience* 30:551-553.
16. Peters, B. J., Ash, G. J., Cother, E. J., Hailstones, D. L., Noble, D. H. and Urwin, N. A. R. 2004. *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* in Australia: pathogenic, phenotypic and genetic diversity. *Plant pathology* 53, 73-79.
17. Schaad, N. W., Jones, J. B., and Chun, W. 2001. Laboratory Guide for Identification of PLANT PATHOGENIC BACTERIA. Third edition p 373.
18. Zhao, Y. F., Damicone, J. P., Demezas, D. H., Rangaswamy, V., and Bender, C. L. 2000. Bacterial leaf spot of leafy crucifers in Oklahoma caused by *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola*. *Plant Dis.* 84:1015-1020.
19. Zhao, Y. F., Damicone, J. P., and Bender, C. L. 2002. Detection, survival, and sources of inoculum for bacterial diseases of leafy crucifers in Oklahoma. *Plant Dis.* 86:883-888.

*Ελληνική βιβλιογραφία*

1. Παναγόπουλος, Χ. Ν., 2000. Ασθένειες Κηπευτικών Καλλιεργειών. Β΄ έκδοση. Εκδ. Σταμούλης, Αθήνα. σελ. 480.
2. Γεννιάδου Π. Γ., 1959. Λεξικόν Φυτοπαθολογικών. Β΄ έκδοσις, Τόμος Α΄ & Β΄. Εκδ. Χρ. Μόσχου. σελ. 1041.

*Διαδίκτυο*

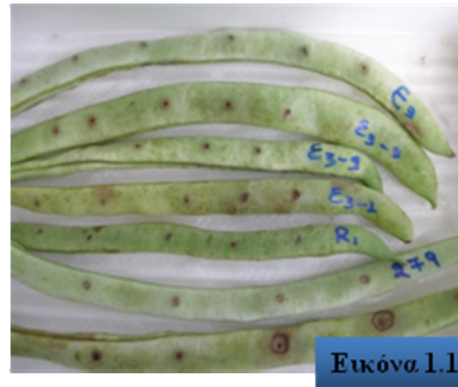
- ❖ <http://osufact.okstate.edu>
- ❖ [www.apset.org](http://www.apset.org)

**ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ**  
**ΦΩΤΟΓΡΑΦΙΚΟ ΥΛΙΚΟ**



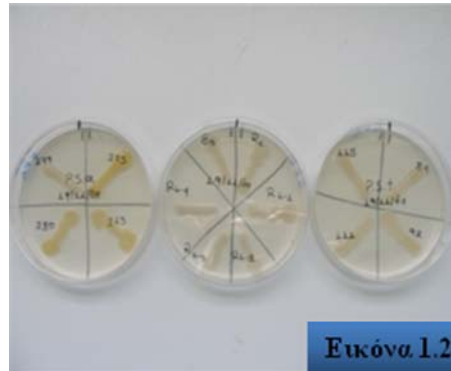
Εικόνα 1

Εικόνα 1. Τυπική αντίδραση υπερευαισθησίας με τα απομονωθέντα στελέχη του *Pseudomonas syringae* pv. *alisalensis*, σε φυτό καπνού cv. Xanthi.



Εικόνα 1.1

Εικόνα 1.1. Τεχνητές μολύνσεις σε λοβούς φασολιάς. Απουσία μόλυνσης (συμπτώματα) με στελέχη του *Pseudomonas syringae* pv. *alisalensis* (E<sub>3</sub>, E<sub>3-3</sub>, E<sub>3-2</sub>, E<sub>3-1</sub>, R<sub>1</sub>) και ερυθροκάστανες κηλιδώσεις με στέλεχος του *Pseudomonas viridiflava* (275) από σέλινο.



Εικόνα 1.2

Εικόνα 1.2. Καλλιέργειες των βακτηριακών στελεχών του γένους *Pseudomonas*, που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη. Ανάπτυξη σε θρεπτικό υπόστρωμα ΝΑΓ.



Εικόνα 1.3

Εικόνα 1.3. Βιοχημικές δοκιμές (αρι 20 ΝΕ) με το στέλεχος R<sub>1-1</sub> του *Pseudomonas syringae* pv. *alisalensis* και το στέλεχος 115 του *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*





Εικόνα 2



Εικόνα 2.1

Εικόνα 2 & 2.1. Λευκή σκωρίαση (*Albugo candida*) σε φυτό ρόκας (*Eruca sativa*), με συμπτώματα και σημεία στην άνω και κάτω επιφάνεια του φύλλου.



Εικόνα 2.2



Εικόνα 2.3

Εικόνα 2.2 & 2.3. Προσβολή από *Plasmodiophora brassicae* σε ρίζες σταυρανθών.



Εικόνα 2.4



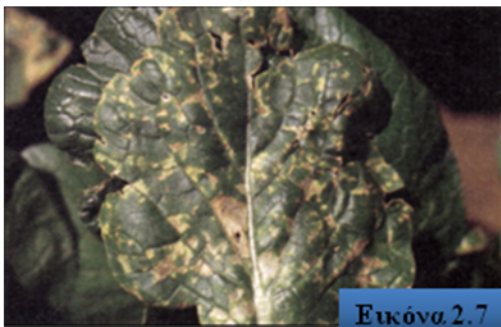
Εικόνα 2.5

Εικόνα 2.4 & 2.5. Μελάνωση νεύρων ή μαύρη σήψη (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*) σε φυτό ρόκας (*Eruca sativa*) (εικόνα 2.5) και φυτό κουνουπιδιού (*Brassica oleracea* var. *botrytis*) (εικόνα 2.6)



Εικόνα 2.6

Εικόνα 2.6. Βακτηριακή κηλίδωση (*Pseudomonas syringae* pv. *maculicola*), σε φυτό μπρόκολου (*Brassica oleracea* var. *italica*), ([www.apset.org](http://www.apset.org)).



Εικόνα 2.7



Εικόνα 2.8

Εικόνα 2.7 & 2.8: Βακτηριακή κηλίδωση (*Pseudomonas syringae* pv. *maculicola*), σε φυτό ελαιοκράμβης (*Brassica napus*) με συμπτώματα στην άνω και στην κάτω επιφάνεια του φύλλου (<http://osufact.okstate.edu>).



Εικόνα 2.9



Εικόνα 2.10

Εικόνα 2.9 & 2.10: Προσβολή από περονόσπορο (*Peronospora parasitica*) σε φύλλα ελαιοκράμβης (*Brassica napus*) με συμπτώματα στην άνω και στην κάτω επιφάνεια του φύλλου (<http://osufact.okstate.edu>).



Εικόνα 3 - 3.5. Φυσικές μολύνσεις του βακτηρίου *Pseudomonas syringae* pv. *alisalensis*, με χαρακτηριστικά συμπτώματα της ασθένειας, σε φύλλα ρόκας (*Bruca sativa*).



Εικόνα 4 – 4.5. Τεχνητές μολύνσεις με βακτηριακά στελέχη του *Pseudomonas syringae* pv. *alisaiensis*, σε φυτά ρόκας (*Eruca sativa*). Ανάπτυξη συμπτωμάτων παρόμοιων με εκείνα των φυσικών μολύνσεων



Εικόνα 5



Εικόνα 5.1



Εικόνα 5.2



Εικόνα 5.3



Εικόνα 5.4



Εικόνα 5.5

Εικόνα 5 – 5.5. Τεχνητές μολύνσεις με βακτηριακά στελέχη του *Pseudomonas syringae* pv. *ahisalensis*, σε φυτά μπρόκολου (*Brassica oleracea* var. *italica*), και ρόκας (*Eruca sativa*), (εικόνα 5 & 5.1), φυτά μπρόκολου (εικόνα 5.2 & 5.3) και φυτά κουνουπιδιού (*Brassica oleracea* var. *botrytis*), (εικόνα 5.4 & 5.5).



Εικόνα 6 – 6.3. Τεχνητές μολύνσεις με στελέχη του *Pseudomonas syringae* pv. *alisalensis*, σε φύλλα κινέζικου λάχανου (*Brassica oleracea* var. *gemmifera*), (εικόνες 6 & 6.1) και ελαιοκράμβης (*Brassica napus*), (εικόνες 6.2 & 6.3).



Εικόνα 7



Εικόνα 7.1



Εικόνα 7.2



Εικόνα 7.3

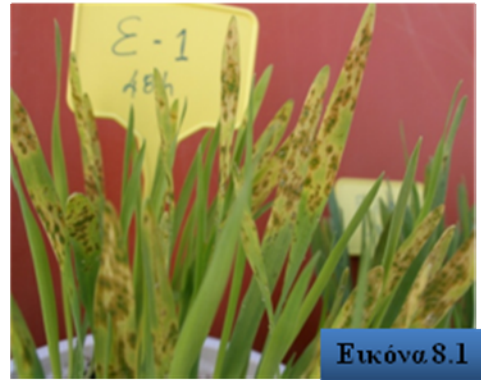
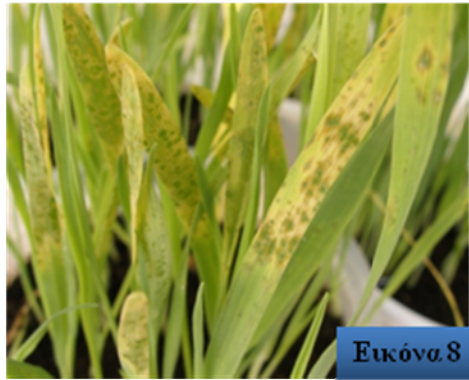


Εικόνα 7.4



Εικόνα 7.5

Εικόνα 7 – 7.5. Τεχνητές μολύνσεις με στελέχη του *Pseudomonas syringae* pv. *alisalensis* σε φύλλα φυτών ραπανιού (*Raphanus sativus*). Ραπάνι στρογγυλό (εικόνα 7 & 7.1), ραπάνι μακρύ (εικόνα 7.2 & 7.3), ραπάνι άσπρο (εικόνα 7.4 & 7.5).



Εικόνα 8 - 8.5. Τεχνητές μολύνσεις με στελέχη του *Pseudomonas syringae* pv. *alisalensis* σε φυτά βρώμης (*Avena sativa*), (εικόνες 8 - 8.3), λάχανου (*Brassica oleracea* var. *capitata*), (εικόνα 8.4) και σέσκουλου (*Beta vulgaris*) (εικόνα 8.5).





Εικόνα 9 – 9.2. Τεχνητές μολύνσεις με στελέχη του *Pseudomonas syringae* pv. *alisalensis* και του *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* σε φυτά τομάτας (*Lycopersicon esculentum*).