

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ
ΚΑΛΑΜΑΤΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΘΕΡΜΟΚΗΠΙΑΚΩΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ
& ΑΝΘΟΚΟΜΙΑΣ

«ΜΕΛΕΤΗ ΔΟΚΙΜΩΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ
ΤΟΥ ΒΑΚΤΗΡΙΟΥ ΤΗΣ ΜΑΡΑΝΣΗΣ ΤΗΣ ΤΟΜΑΤΑΣ
RALSTONIA SOLANACEARUM»



ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΤΟΥ ΣΠΟΥΔΑΣΤΗ:
ΣΑΡΑΝΤΗ ΜΑΛΑΦΟΥΡΗ

ΕΙΣΗΓΗΤΗΣ: ΒΛΑΧΟΠΟΥΛΟΣ ΕΥΑΓΓΕΛΟΣ

ΚΑΛΑΜΑΤΑ 2005

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε κατά την διάρκεια της πρακτικής μου άσκησης στο Εργαστήριο Βακτηριολογίας του Μπενακείου Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου. (ΜΦΙ)

Ευχαριστώ τον Ερευνητή βαθμίδας Α' Δρα Αλιβιζάτο Αθανάσιο Γεωπόνο-Βακτηριολόγο προϊστάμενο του Εργαστηρίου Βακτηριολογίας του Μ. Φ. Ι και επιστημονικό επιβλέποντα της πρακτικής μου άσκησης. Χάρη στην πολύτιμη επιστημονική καθοδήγηση του, ήταν δυνατή η διεξαγωγή των πειραματικών δοκιμών, διαφόρων άλλων επιστημονικών μεθόδων που εφαρμόστηκαν, καθώς και ο σωστός έλεγχος των αποτελεσμάτων.

Παράλληλα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επίκουρο καθηγητή του ΤΕΙ Καλαμάτας Δρα Βλαχόπουλο Ευάγγελο Γεωπόνο-Νηματολόγο, εισηγητή της εν λόγω πτυχιακής εργασίας.

Ευχαριστώ επίσης, το προσωπικό του Εργαστηρίου βακτηριολογίας του Μ. Φ. Ι. και συγκεκριμένα τους κ. Γλυνό Παρασκευά, Δρακούλη Σπύρο και Καράφλα Χαρούλα, για την βοήθεια τους και τις συμβουλές τους στην διεξαγωγή των πειραματικών δοκιμών.

Τέλος ευχαριστώ και όλους τους υπόλοιπους οι οποίοι συνέβαλαν σε οποιοδήποτε βαθμό, ώστε να ολοκληρωθεί η παρούσα μελέτη που διεξήχθη στα πλαίσια της πτυχιακής εργασίας.



**ΤΟ ΒΑΚΤΗΡΙΟ RALSTONIA SOLANACEARUM ΩΣ
ΦΥΤΟΠΑΘΟΓΟΝΟ**



ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Α

Γενικά στοιχεία, βιολογία βακτηρίου	7
1) Συμπτώματα	8
2) Αίτιο, συνθήκες αναπτύξεως	10
Περιβαλλοντικές συνθήκες αναπτύξεως	13
1) Θερμοκρασία περιβάλλοντος	13
2) Θερμοκρασία εδάφους	13
3) Φάσμα φωτός	14
4) Εδαφική υγρασία	14
5) Πληθυσμός νηματωδών	15
Οικολογία, επιδημιολογία	16
6) Καταπολέμηση ασθένειας	18

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Β

Εισαγωγή	20
Υλικά και μέθοδοι	20
1) Καλλιέργειες βακτηρίων	20
2) Συνθήκες ανάπτυξης φυτών	22
3) Τεχνητές μολύνσεις	22
4) Δοκιμές θρεπτικών υλικών	23
5) Μέθοδος χρώσης GRAM	23
6) Μέθοδος χρώσης μαστιγίων	24
7) Μέθοδος παραγωγής οξειδάσης	25
8) Μέθοδος παραγωγής φθορίζουσας χρωστικής	25
9) Μέθοδος χρώσης σουδανοφιλικών εγκλείστων	25
10) Δοκιμές χρησιμοποίησης σακχάρων/αλκοολών/οργ. οξέων	26

11) Παθογένειες φυτών-----	27
α) Αντίδραση υπερευαισθησίας καπνού-----	27
β) Δοκιμή παθογένειας φυτών τομάτας-----	27
12) Ορολογικές/ανοσολογικές δοκιμές	27
Μέθοδος ανοσοφθορισμού-----	28
13) Μοριακές μέθοδοι -----	31
PCR -----	31

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Γ

Αποτελέσματα των δοκιμών ανίχνευσης και ταυτοποίησης του βακτηρίου *Ralstonia solanacearum* σε φυτά τομάτας ποικιλίας Contessa

1) Αποτελέσματα τεχνητών μολύνσεων φυτών τομάτας-----	36
2) Δοκιμές θρεπτικών υλικών -----	38
α) Εκλεκτικά μη εκλεκτικά υλικά (Ευαισθησία υλικών)-----	38
β) Γραμμική εξάπλωση -----	43
3) Μέθοδος χρώσης GRAM -----	44
4) Μέθοδος χρώσης μαστιγίων -----	45
5) Μέθοδος παραγωγής οξειδάσης -----	46
6) Μέθοδος παραγωγής φθορίζουσας χρωστικής -----	47
7) Μέθοδος χρώσης σουδανοφιλικών εγκλείστων -----	48
8) Δοκιμές χρησιμοποίησης σακχάρων/αλκοολών/οργ. οξέων -----	49
9) Παθογένειες φυτών -----	51
α) Αντίδραση υπερευαισθησίας καπνού (24h) -----	51
β) Αντίδραση υπερευαισθησίας καπνού (48h) -----	51
γ) Δοκιμή παθογένειας φυτών τομάτας-----	51
10) Ορολογικές ανοσολογικές δοκιμές -----	53
Μέθοδος ανοσοφθορισμού-----	53

11) Μοριακές μέθοδοι -----	54
PCR -----	54
12) Δοκιμές ανίχνευσης και ταυτοποίησης από υψηλότερο σημείο-----	56

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Δ

Συμπεράσματα -----	59
Συζητήσεις συμπεράσματα μελέτης-----	61
Παράρτημα θρεπτικών υλικών-----	62
Προσάρτημα 1 -----	66
Προσάρτημα 2 -----	67
Προσάρτημα 3 -----	68
Βιβλιογραφία-----	69

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Α

ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ RALSTONIA SOLANACEARUM ΚΑΙ ΤΑ ΚΥΡΙΟΤΕΡΑ ΦΥΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΚΑ ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΑ ΠΟΥ ΠΡΟΚΑΛΕΙ Γενικά.

Το βακτήριο *Ralstonia solanacearum* είναι το παθογόνο των φυτών που προκαλεί ασθένεια γνωστή ως βακτηριακή μάρανση (Bacterial wilt) στην τομάτα και άλλα φυτά ή καστανή σήψη (Brown rot) στην πατάτα, είναι μια από τις πιο καταστρεπτικές αδροβακτηριώσεις κυρίως σε κλίματα τροπικά, υποτροπικά και γενικώς σε θερμά κλίματα, αλλά και σε χώρες της Βόρειας Ευρώπης και Αμερικής.

Προσβάλλει πολλά είδη φυτών που ανήκουν σε διαφορετικές οικογένειες. Οι πιο σημαντικοί ξενιστές είναι η τομάτα, πατάτα (Εικ1), καπνός, μελιτζάνα και πιπεριά στα Solanaceae και μπανάνα από την οικογένεια Musaceae.

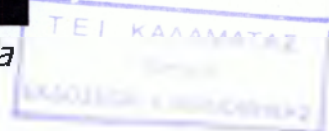
Επηρεάζει επίσης μέλη της οικογένειας Compositae, Leguminosae καθώς και άλλες οικογένειες φυτών (Kelman 1953), η ασθένεια επισημάνθηκε για πρώτη φορά παγκοσμίως από τον Burill στις Η. Π. Α. το 1890 επί κονδύλων πατάτας (Εικ2). Στην Ελλάδα η εμφάνιση της ασθένειας για πρώτη φορά έγινε το έτος 1957 σε καλλιέργειες πατάτας στην περιοχή της Μεσσηνίας καθώς επίσης και στην περιοχή του Αυλώνα, Αττικής.



(Εικ. 1) Φυτό πατάτας (Αίγυπτος) προσβεβλημένο από το *Ralstonia solanacearum*



(Εικ. 2) Κόνδυλος πατάτας προσβεβλημένος από *Ralstonia solanacearum* (σταγόνες βακτηριακής εξίδρωσης)



Η προέλευση του προβλήματος πιθανώς να ήταν εισαγόμενοι κόνδυλοι πατάτας από την Κύπρο ή πιθανώς από το νησί της Νάξου όπου συμπτώματα όμοια με αυτά της βακτηριακής μάρανσης είχαν παρατηρηθεί σε σοδειές χωραφιών πατάτας κατά την καλλιεργητική περίοδο 1953-1954.

Στην τομάτα η ασθένεια καταγράφηκε για πρώτη φορά από τον Παναγόπουλο και Ψαλλίδα το 1970 (μη δημοσιευμένα στοιχεία) καθώς και στον Πύργο περιοχή Βοιωτίας. Επίσης είχαν καταγραφεί και αναφερθεί η εμφάνιση της ασθένειας σε περιοχές της Κρήτης από τον Μαλαθράκι. Καμία αναφορά για βακτηριακή μάρανση δεν είχε αναφερθεί έως τότε με φορείς τον καπνό και την πιπεριά.

Έως το 1984 η ασθένεια δεν είχε θεωρηθεί σοβαρό φυτοπαθολογικό πρόβλημα ούτε στην τομάτα ούτε στην πατάτα. Η ασθένεια το 1984 παρουσιάστηκε σε σοβαρή μορφή και σε μεγάλη έκταση σε υπαίθριες καλλιέργειες τομάτας και μελιτζάνας στην περιοχή Σκάλας Λακωνίας καθώς και σε τομάτα υπό κάλυψη στην περιοχή Αλφειούσα Ηλείας με καταστρεπτικά αποτελέσματα (Ζάχος 1957 Psallidas 1989) . (Χ. Γ. Παναγόπουλος 2000)

1) Συμπτώματα:

Η ασθένεια αρχικά εκδηλώνεται με την μορφή ελαφρού μερικού ή καθολικού μαρασμού του φυλλώματος κατά τις θερμότερες ώρες της ημέρας ο οποίος και υποχωρεί την νύκτα. Ο μαρασμός γίνεται σύντομα

μόνιμος, έντονος και γενικεύεται σ' ολόκληρο το φυτό το οποίο τελικά καταρρέει και ξηραίνεται (Εικ. 3) .



(Εικ. 3) Φυτό τομάτας με έντονα συμπτώματα βακτηριακής μάρανσης.

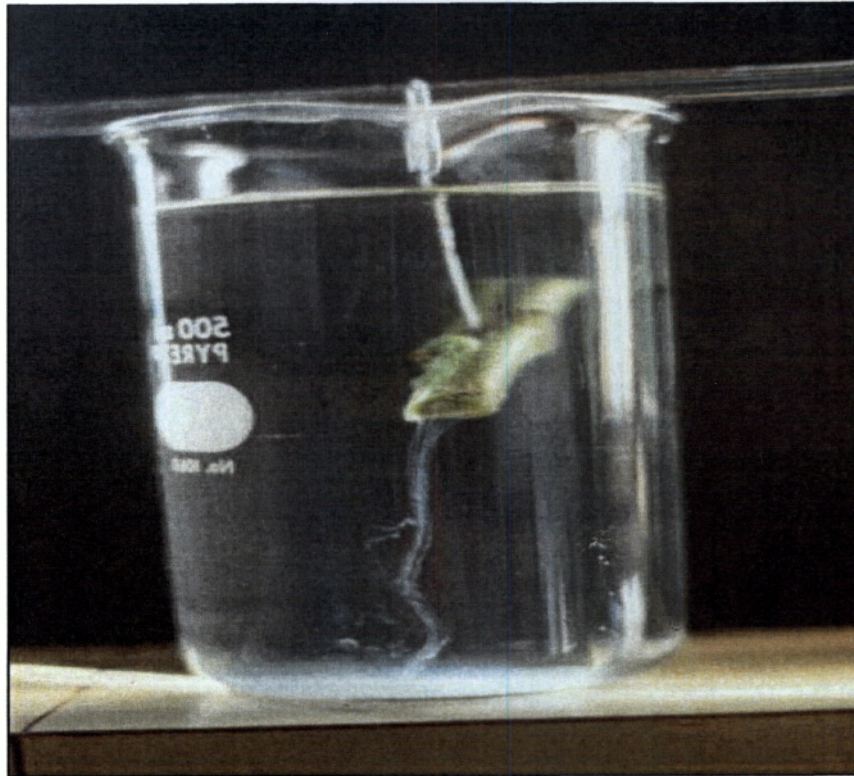
Άλλα συμπτώματα που παρατηρούνται είναι η χλώρωση φυλλώματος και νανισμός, ιδίως σε σχετικά ανθεκτικές ποικιλίες.

Τα στελέχη των ασθενών φυτών, ιδιαίτερα κοντά στην βάση, καθώς και οι ρίζες εμφανίζουν εσωτερικά καστανό μεταχρωματισμό των αγγείων του ξύλου (Εικ4) .



(Εικ. 4) Εγκάρσια τομή βλαστού φυτού πιπεριάς προσβεβλημένη από την βακτηριακή μάρανση.

Σε εγκάρσια τομή προσβεβλημένων βλαστών παρατηρείται έξοδος βλεννώδους υγρού που είναι πλήρες βακτηρίων (Εικ. 5) (Χ. Γ. Παναγόπουλος 2000)



(Εικ. 5.) Εξαγωγή βλεννώδους υγρού από τομή προσβεβλημένου βλαστού φυτού τομάτας

2) Αίτιο - Συνθήκες αναπτύξεως:

Η ασθένεια προκαλείται από το βακτήριο *Ralstonia solanacearum*, συν. *Pseudomonas solanacearum*, *Burkholderia solanacearum*, *Bacillus solanacearum*, *Bacillus musae*, *Bacterium solanacearum* κ. α. (Yabuuchi et al., 1992 Yabuuchi et al., 1996 Urakami et al. 1994).

Είναι αερόβιο, αρνητικό κατά Gram, έχει αυτόνομη κίνηση με την βοήθεια 1-4 πολικών μαστίγιων και δεν παράγει πράσινη φθορίζουσα χρωστική.

Παράγει οξειδάση και PHB (poly-β-hydroxybutyrate). Σε υλικό που περιέχει 5% σακχαρόζη σχηματίζει επίπεδες αποικίες σε αντίθεση με τις πλείστες ψευδομονάδες που σχηματίζουν αποικίες κυρτές (ένδειξη παραγωγής levan).

Τα στελέχη του παθογόνου που προσβάλουν την τομάτα έχουν ελάχιστη θερμοκρασία αναπτύξεως 10°C, άριστη 35-37°C και μέγιστη 41°C. Έχει μεγάλο αριθμό φυτών ξενιστών που ανήκουν σε 33

οικογένειες (200) φυτικά είδη, μεταξύ αυτών σπουδαία θέση καταλαμβάνουν παρά πολλά σολανώδη, η μπανάνα, η αραχίδα και πολλά ζιζάνια. Υπάρχουν πολλές φυλές του παθογόνου που διακρίνονται με βάση τον κύκλο των ξενιστών και ορισμένες βιοχημικές και φυσιολογικές ιδιότητες.

Από πρόσφατες έρευνες στην Ελλάδα (Psallidas, 1989) , οι ελληνικές απομονώσεις του βακτηρίου εντάσσονται στον βióτυπο II (κατά Hayward) και στη φυλή 3 σύμφωνα με την κατάταξη των Buddenhagen και Kelman.

Οι ελληνικές απομονώσεις έχουν περιορισμένο κύκλο ξενιστών και προσβάλλουν την τομάτα, μελιτζάνα και πατάτα, αλλά όχι τον καπνό. Τα βακτήρια της φυλής 1 προσβάλλουν πολλά καλλιεργούμενα και αυτοφυή σολανώδη, πολλά άλλα φυτά αλλά και μερικές διπλοειδείς μπανάνες και είδη του γένους Heliconia. (Χ. Γ. Παναγόπουλος 2000)

Το παθογόνο επιβιώνει στο έδαφος για πολλά χρόνια και μολύνει τα φυτά από τις ρίζες δια μέσου των πληγών. Ακόμη διαιωνίζεται στους κονδύλους της πατάτας (ελαφρά η λανθάνουσα μόλυνση) με τους οποίους μεταδίδεται στις αμόλυντες περιοχές. Μετάδοση της ασθένειας γίνεται με την φύτευση φτυαριών που προέρχονται από μολυσμένα σπορεία.

Το βακτήριο διασπείρεται με τα μαχαιρίδια κλαδέματος της τομάτας η τεμαχισμού των κονδύλων, τα εργαλεία κατεργασίας εδάφους το νερό ποτίσματος (Εικ. 7.) , τους νηματώδεις και τα έντομα του εδάφους. Η ασθένεια ευνοείται από τις υψηλές θερμοκρασίες (άριστη 30-35 °C) και τη μεγάλη εδαφική υγρασία. (Χ. Γ. Παναγόπουλος 2000)



(Εικ. 7.) Υδροπονική καλλιέργεια τομάτας (Φλώριδα, Η. Π. Α.) προσβεβλημένη από το *Ralstonia solanacearum* σε προχωρημένο στάδιο

ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΑΝΑΠΤΥΞΕΩΣ

1) Θερμοκρασία περιβάλλοντος:

Η θερμοκρασία είναι ο πιο σημαντικός παράγων επιδρώντας στους ξενιστές καθώς και την επιβίωση του βακτηρίου στο έδαφος. Γενικά, αύξηση σε ήπιες θερμοκρασίες μεταξύ 30-35 °C αυξάνει τα περιστατικά και τον ρυθμό εξάπλωσης του βακτηρίου σε ξενιστές όπως η τομάτα (για τις πιο πολλές φυλές του παθογόνου) της οποίας τα φυτά τα οποία έχουν ανοχές σε διαφοροποιούμενες θερμοκρασίες μπορούν να γίνουν πιο ευάλωτα σε πιο υψηλές θερμοκρασίες (A. C. Hayward 1991) .

Η ανοχή είναι θερμοευαίσθητη και ειδικά ανάλογα με την φυλή. Δεν είναι ακόμα γνωστό αν πρόκειται μιας λειτουργίας ιογενών παραγόντων μόνο πλήρως εκφραζόμενης σε υψηλές θερμοκρασίες η αν είναι ένα αποτέλεσμα της έλλειψης της έκφρασης της ανοχής των γονιδίων στον ξενιστή σε υψηλές θερμοκρασίες.

Σύμφωνα με τους Krausz & Thrurston 1975 θερμοκρασίες της τάξεως των 32 °C σε ελεγχόμενο περιβάλλον (θάλαμος) μείωσαν σημαντικά την ανοχή των φυτών και αύξησαν σημαντικά το ποσοστό μόλυνσης των φυτών αυτών από την βακτηριακή μάρανση.

2) Θερμοκρασία εδάφους:

Η θερμοκρασία εδάφους σε διαφορετικές περιοχές είναι επίσης ένας σημαντικός παράγων στην επιβίωση του βακτηρίου. Σε δροσερά σχετικά εδάφη έχουμε τις ιδανικές συνθήκες για να παραταθεί η ζωή του *Ralstonia Solanacearum* ενώ σε εδάφη κοντά σε ακτές ή γενικά σε εδάφη που η θερμοκρασία ανεβαίνει πάνω από 43°C και παραμένει σε αυτήν την θερμοκρασία για αρκετές ώρες ημερησίως έχει αποδειχθεί ότι σε αυτήν την θερμοκρασία για 4 ημέρες και πέρα ήταν καθαρές από βακτήριο. (Seneviratne 1988)

Σε χωράφια καλλιέργειας πατάτας που είχαν προσβληθεί με φυσικό τρόπο από την βακτηριακή μάρανση το *Ralstonia Solanacearum* είχε ανιχνευθεί με την χρήση φυτών δεικτών στο βάθος των 15 έως 75 εκ. (Graham, J., Lloyd. A. B., 1979)

Μεγάλης διάρκειας επιβίωση σε βαθύτερα εδαφικά στρώματα είναι πιθανόν να οφείλεται στις χαμηλότερες θερμοκρασίες και στην μείωση

της μικροβιακής δραστηριότητας οφειλόμενης στην παύση των γηγενών εδαφικών μικροοργανισμών.

Έχει παρατηρηθεί παρουσία του *Ralstonia Solanacearum* σε φυσικά μολυσμένα εδάφη αποθηκευμένα σε πλαστικές σακουλές σε θερμοκρασίες των 4 °C έως και 673 ημερών. (Granada et all. 1983)

3) Φάσμα φωτός:

Λίγες μελέτες έχουν εξετάσει το κατά πόσο επηρεάζει το φάσμα φωτός και γενικώς η φωτοπερίοδος την ανθεκτικότητα των ξενιστών του *Ralstonia Solanacearum*. (Kelman 1953)

Μειωμένες συνθήκες φάσματος φωτός δεν μείωσαν την ανοχή στην απομόνωση LB-6 του *Ralstonia Solanacearum* στην σειρά τομάτας 1169 στους 26°C αλλά την μείωσαν σημαντικά στους 29, 4°C και επίσης παρατήρησαν ότι και η μειωμένη φωτοπερίοδος μείωσε σημαντικά την ανοχή της σειράς τομάτας 1169 στην απομόνωση LB-6 ανεξάρτητα της θερμοκρασίας. (Krausz, J. P, Thurston, H. D. 1975) .

Η ανοχή φυτών πατάτας έχει εκφραστεί πιο συχνά σε υψηλό φάσμα φωτός (2000 ft-c) από ότι σε χαμηλό φάσμα φωτός (1300 ft-c) στους 24 °C και 28°C. (Sequeira 1969)

4) Εδαφική υγρασία:

Υψηλή εδαφική υγρασία οφειλόμενη είτε σε ισχυρές βροχοπτώσεις είτε σε υψηλό οριζοντα νερού συνήθως ωφελούν την εξάπλωση και ανάπτυξη της βακτηριακής μάρανσης

Η επιβίωση του παθογόνου είναι μεγαλύτερη σε υγρά αλλά καλά στραγγιζόμενα εδάφη, και επηρεάζεται σημαντικά από την εναλλαγή της υψηλής εδαφικής υγρασίας (πλημμύρα) και της χαμηλής εδαφικής υγρασίας (ξηρασία) Αυτό το συμπέρασμα έχει τεκμηριωθεί από αρκετές μελέτες κάτω από συνθήκες ελεγχόμενης εδαφικής υγρασίας (Nesmith et all. 1985)

Η εδαφική υγρασία επηρεάζει σημαντικά την αναπαραγωγή και επιβίωση του *Ralstonia solanacearum* σε μη αποστειρωμένα εδάφη, ανεξαρτήτως εδαφικού τύπου αποικίες αυξήθηκαν μέσα σε 7 έως 10 ημέρες της εισαγωγής μέσα στο έδαφος στις υψηλότερες εδαφικές υγρασίες -1bar αλλά δεν αυξήθηκε σε πιο στεγνά εδάφη από -5 έως -15bars.

Σύμφωνα με τον (Moffet et all 1983) ερευνήθηκε πια είναι η πιο αρεστή εδαφική υγρασία για επιβίωση σε δυο ανασταλτικά και δυο συμβάλλοντα εδάφη της Βόρειας Καρολίνας των ΗΠΑ με εδαφική υγρασία από $-0,5$ έως -1 bar για τον βιότυπο 2 και 3.

Τα αποτελέσματα σε πηλώδες, αργιλλοπηλώδες και αργιλλοαμμώδες έδαφος σε συνθήκες εδαφικής υγρασίας από $-0,003$, $-0,05$ και $-0,15$ Kpa απέδειξαν ότι ο πληθυσμός του βιότυπου 2 φάνηκε να μειώνεται πιο γρήγορα από ότι ο πληθυσμός του βιότυπου 3.

Ο ρυθμός της μείωσης του πληθυσμού του κάθε βιοτύπου από $-0,003$ και $-0,05$ Kpa ήταν μεγαλύτερος σε αργιλλοπηλώδες από ότι σε αργιλλοαμμώδες και σε όλες τις εναλλαγές της εδαφικής πίεσης ήταν μεγαλύτερη στα αργιλλοπηλώδες και αργιλλοαμμώδες από ότι στα πηλώδες εδάφη. Περαιτέρω ο ρυθμός του πληθυσμού μειώθηκε και στους δυο βιοτύπους σε πιο στεγνά εδαφικά μείγματα.

Παρόλη την μείωση αυτή αποδείχθη επίσης ότι εδάφη όπου επανήλθε η εδαφική υγρασία κατά την διάρκεια των χειρισμών στα επίπεδα κατά την έναρξη του πειράματος περιείχαν γενικά υψηλότερους αριθμούς βιώσιμων παθογόνων από ότι τα εδάφη που είχαν υψηλότερη εδαφική υγρασία.

Γι αυτό λοιπόν δεδομένου του ότι η πίεση παρέμεινε συνεχής μερικές φυλές του *Ralstonia solanacearum* σε συγκεκριμένα εδάφη δεν είναι ευαίσθητες σε στεγνές εδαφικές συνθήκες. Κάτω από φυσικές συνθήκες οι μικροοργανισμοί του εδάφους υποβάλλονται στο στρες της εναλλαγής υγρού και ξηρού περιβάλλοντος.

Ξηρές συνθήκες είναι ένας παράγων που συμβάλει στην μείωση του αριθμού του *Ralstonia solanacearum* σε χέρσα /ακαλλιέργητα εδάφη. (Sequeira 1962)

5) Πληθυσμός Νηματώδων:

Είναι γνωστή η "συνεργασία" μεταξύ του *Ralstonia solanacearum* και του νηματώδη *Meloidogyne spp.* (γνωστού για την δημιουργία κόμπων στις ρίζες των φυτών.) σε μια ποικιλία ξενιστών. (Sunaina etall 1989) , (Kelman 1953)

Η μάρανση των φυτών προκαλούμενη από την ασθένεια της βακτηριακής μάρανσης έχει αποδειχθεί πως συσχετίζεται και τα συμπτώματα προσβολής είναι πιο έντονα και ανάλογα με το ποσοστό των πληγών που δημιουργούν οι νηματώδεις στις ρίζες των φυτών.

Επίσης ο νηματώδης αυτός μπορεί να ενεργήσει με τέτοιο τρόπο ώστε οι ιστοί των φυτών να γίνονται πιο κατάλληλοι για αποικιοποίηση των βακτηρίων. Αναγνωρίζοντας λοιπόν την συνεργασία αυτών των δυο παθογόνων θα πρέπει να λαμβάνονται και τα ανάλογα μέτρα φυτοπροστασίας σε μια καλλιέργεια και για τους φυτοπαθογόνους οργανισμούς. (Jatala et all 1988)

ΟΙΚΟΛΟΓΙΑ-ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ *Ralstonia solanacearum*:

Από το 1992 ένας αυξημένος αριθμός εξάπλωσης της βακτηριακής μάρανσης (*Ralstonia solanacearum*) φυλής 3, βιότυπου 2 (Hayward) έχει αναφερθεί σε αρκετές χώρες της ευρωπαϊκής ένωσης όπως το Βέλγιο, Γαλλία, Ολλανδία και Αγγλία.

Η μεγαλύτερη έξαρση παρατηρήθηκε στην Ολλανδία το έτος 1995 κυρίως σε σποροπαραγωγικές καλλιέργειες πατάτας. Σε χώρες όπου είχε μεγαλύτερα ποσοστά μόλυνσης, το βακτήριο εμφανίστηκε στα επιφανειακά ύδατα και ζιζάνια όπως το *Solanum dulcamara*. Σε αρκετές χώρες είχαμε επίσης καλλιέργειες τομάτας που είχαν μολυνθεί σε υψηλό ποσοστό.

Η επιβίωση της φυλής 3 του *Ralstonia solanacearum* που αναπτύσσεται σε χαμηλές θερμοκρασίες χαρακτηρίστηκε από την ικανότητα προσαρμογής της συγκεκριμένης φυλής και σε πιο εύκρατα κλίματα (σε υψηλά πεδία στους τροπικούς) όπου επικρατούν πιο υψηλές θερμοκρασίες από τις συνηθισμένες (Janse Bulletin-Depp. 1996)

Για πρώτη φορά ανιχνεύθηκε η παρουσία του βακτηρίου *Ralstonia solanacearum* φυλής 3, βιοτύπου 2 (Hayward) σε ποτιστικούς ταμιευτήρες καθώς και σε μολυσμένες περιοχές της Αιγύπτου.

Κανένα ζιζάνιο ξενιστής δεν βρέθηκε πουθενά κοντά στους ταμιευτήρες και τα κανάλια. Το βακτήριο δεν είχε ανιχνευθεί πουθενά αλλού στην περιοχή της ερήμου. Οι πληθυσμοί που ανιχνεύθηκαν στα μολυσμένα ύδατα έφθαναν και τις 106 CFU/lit ύδατος. (Farag et all 1999)

Από το 1996 διεξήχθησαν πειράματα στην Ολλανδία για να μελετηθεί η οικολογία και επιδημιολογία του παθογόνου. Τα αποτελέσματα μετά από 3 χρόνια ερευνάς (Beuningen et all 1999) , (Wenneker 1999) πάνω στην δυναμική του πληθυσμού του *Ralstonia solanacearum* φυλής 3, βιότυπου 2 (Hayward) σε επιφανειακά ύδατα της Ολλανδίας σε

διάστημα 2 ετών κατά τους θερινούς μήνες αυξανόταν έως και 106 CFU/lit. νερού. Παρατηρήθηκε επίσης ότι ο πληθυσμός αυξανόταν όταν η θερμοκρασία του νερού έφθανε και ξεπερνούσε τους 15°C (την άνοιξη) .

Επίσης χαρακτηρίστηκε ως καινούργιος ξενιστής το ζιζάνιο *Urtica dioica* το οποίο σε πειράματα σε θερμοκήπια κατά το ίδιο έτος και σε υψηλές θερμοκρασίες (25°C) απεδείχθη άριστος ξενιστής του *Ralstonia solanacearum*

Κατά το έτος 1998 είχαμε έξαρση της βακτηριακής μάρανσης στην Ευρώπη σε καλλιέργειες φυτών πατάτας και ερευνήθηκε ο ρόλος των αρδευτικών υδάτων και του ζιζανίου *Solanum dulcamara* ξενιστή του *Ralstonia solanacearum*. (Elphistone 1998) .

Απεδείχθη λοιπόν ότι το βακτήριο επιζούσε στα επιφανειακά ύδατα καθώς και στο ριζικό σύστημα του *Solanum dulcamara* που εμβαπτιζόταν στα ύδατα από όπου και μολυνόταν.

Σε ζιζάνια του ίδιου είδους που δεν είχαν επαφή με τα ύδατα δεν ανιχνεύθηκε παρουσία του βακτηρίου. Τους καλοκαιρινούς μήνες ο πληθυσμός του *Ralstonia solanacearum* έφθανε και τις 106 CFU/lit ύδατος.

Πειράματα επίσης τα οποία έγιναν σε θερμοκήπια σε φυτά πατάτας τα οποία μολύνθηκαν τεχνητά μέσω του αρδευόμενου ύδατος στα φυτά αυτά ο πληθυσμός που ανιχνεύθηκε έφθασε έως τα 106 CFU/φυτό.

Επίσης παρατηρήθηκε ότι για να μολυνθούν φυτάρια ηλικίας ενός μηνός του ζιζανίου *Solanum dulcamara* έπρεπε ο πληθυσμός του βακτηρίου *Ralstonia solanacearum* να ξεπεράσει τα 106 CFU/φυτό.

Σε πειράματα για την βιολογική καταπολέμηση των ζιζανίων *Solanum dulcamara* και *Urtica dioica* με το *Biochon* (*Chondrosteren purpurem*) τα αποτελέσματα ήταν ανεπιτυχή. (Dijk et all 1999)

Επίσης σε έρευνες που έγιναν σε καλλιέργειες φυτών καπνού, τομάτας, πατάτας, και μπανάνας στις Ινδίες όπου είχαμε συμπτώματα της ασθένειας της βακτηριακής μάρανσης ανιχνεύθηκε το βακτήριο *Ralstonia solanacearum* σε ζιζάνια κοντά στις καλλιέργειες που είχαν το ρόλο του ξενιστή και ήταν τα: *Cestrum diurhum*, *Datura metel*, *Croton sparsiflorus*, *Solanum indicum* και *Physalis minima*. (Chatterjee et all 1997)

Επίσης έχει διαπιστωθεί ότι το βακτήριο *Ralstonia solanacearum* της φυλής 1 (Hayward) μπορεί να επιβιώσει στην ριζόσφαιρα καθώς και μέσα στο ριζικό σύστημα ζιζανίων έως και 6 μήνες.

Τα ζιζάνια αυτά είναι: *Solanum nigrum*, *Solanum anguivi*, *Solanum torvum*, *Solanum xanthocarpum*, *Croton bonpladianum*, *Eyphobia hirta*, *Colocasia esculenta*, *Portulaca oleraceae*, *Phyllanthus niruri* και *Parthenium hysterophorus*. (Shamahar et all 1998)

6) Καταπολέμηση

Τα ακόλουθα μέτρα συστήνονται για την καταπολέμηση των βακτηρίων:

1. Εξαγωγή και καταστροφή των ασθενών φυτών αμέσως με την εμφάνιση υπόπτων συμπτωμάτων. Το μέτρο είναι αποτελεσματικό μόνο αν ο αριθμός των ασθενών φυτών είναι μικρός.
2. Φύτευση υγιών φυτών που προέρχονται από αμόλυντα σπορεία.
3. Αμειψισπορα 5-7 ετών και καταπολέμηση των ζιζανίων.
4. Απολύμανση εδάφους και καλή αποστράγγιση.
5. Το νερό ποτίσματος να μην περνάει από προσβεβλημένες καλλιέργειες
6. Χρήση ποικιλιών με αντοχή στην ασθένεια (π. χ. Venus, Kewada, Rodade, Scorpio, Redlander, Rosita, Caribo, Durable, Shinburo) . Πρέπει να εξετάζεται η συμπεριφορά των ποικιλιών αυτών στα στελέχη του παθογόνου που επικρατούν σε κάθε περιοχή καθώς και στις τοπικές περιβαλλοντικές συνθήκες.

Επίσης για την αντιμετώπιση της ασθένειας έχει αναφερθεί ο εμβολιασμός των φυτών σε ανθεκτικά υποκείμενα του γένους *Solanum* (Matsuzoe et al., 1993) .

Τα τελευταία χρόνια διεξάγεται έρευνα για την ανάπτυξη μεθόδων βιολογικής καταπολέμησης της ασθένειας με την χρησιμοποίηση διαφόρων ανταγωνιστικών βακτηρίων (Χ. Γ. Παναγόπουλος 2000)

ΜΕΡΟΣ ΔΕΥΤΕΡΟ

Μελέτες δοκιμών ανίχνευσης και ταυτοποίησης του βακτηρίου *Ralstonia solanacearum* σε φυτά τομάτας ποικιλίας Contessa.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Β

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Σκοπός της παρούσας πειραματικής μελέτης είναι η μελέτη των διαφόρων εργαστηριακών μεθόδων ανίχνευσης και ταυτοποίησης του βακτηρίου *Ralstonia solanacearum* και ο έλεγχος της ευαισθησίας ανίχνευσης του κατώτερου πληθυσμού που μπορεί να ανιχνευθεί από φυτικούς ιστούς τομάτας με σκοπό τον πιο γρήγορο και αξιόπιστο συνδυασμό των εργαστηριακών μεθόδων για ανίχνευση και ταυτοποίηση του παθογόνου.

ΥΛΙΚΑ-ΜΕΘΟΔΟΙ

Τα αντιδραστήρια και υλικά που χρησιμοποιήθηκαν κατά την διαδικασία της πειραματικής μελέτης καθώς και οι μέθοδοι διάγνωσης ήταν του Εργαστηρίου Βακτηριολογίας του Μπενάκειου Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου (Μ. Φ. Ι.) .

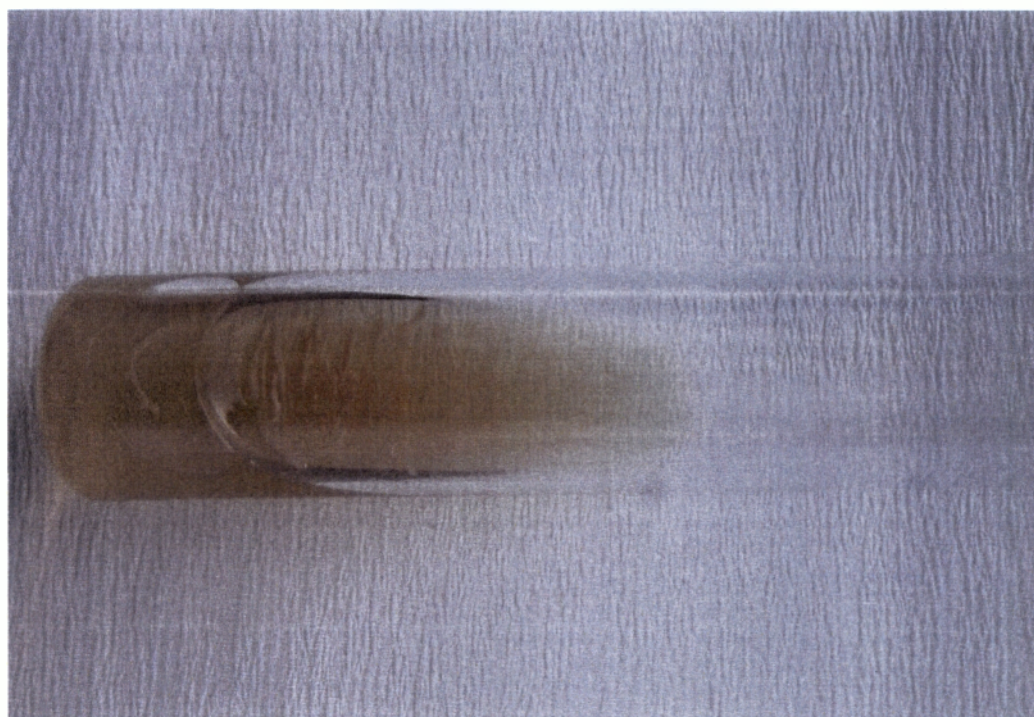
1) Καλλιέργειες βακτηρίων

Οι απομονώσεις του βακτηρίου *Ralstonia solanacearum* που χρησιμοποιήθηκαν προέρχονται από την συλλογή του Μπενάκειου Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου (Μ. Φ. Ι.) και αναφέρεται παρακάτω ο αριθμός της συλλογής ξενιστής από τον οποίο απομονώθηκαν η περιοχή και η ποικιλία φυτού.

Αφού ανοίχθηκαν οι αμπούλες όπου βρισκόταν λυοφιλιωμένα τα βακτήρια της κάθε απομόνωσης έγινε προσθήκη αποστειρωμένου, απεσταγμένου νερού (100μl) και με βακτηριολογική βελόνα μεταφέρθηκε το αιώρημα βακτηρίων και εξαπλώθηκε γραμμικά σε θρεπτικό υλικό NAG, σε τρυβλία Petri σε ειδικό χώρο συσκευής διοχέτευσης αποστειρωμένου αέρα (Laminar air flow) . Μετά την ανάπτυξη αποικιών μεταφέρθηκαν μεμονωμένες αποικίες σε θρεπτικό υλικό NAG σε δοκιμαστικούς σωλήνες. Έτσι αποκτήθηκαν νωπές καλλιέργειες του βακτηρίου (εικ8) .

Πίνακας 1. Κατάλογος καλλιεργειών

Καλλιέργεια	ΞΕΝΙΣΤΗΣ	ΠΕΡΙΟΧΗ	ΠΟΙΚΙΛΙΑ
BPIC 804	<i>Lycopersicum esculentum</i>	Λακωνία	Ace
BPIC 806	<i>Lycopersicum esculentum</i>	Λακωνία	Ace
BPIC 811	<i>Lycopersicum esculentum</i>	Λακωνία	Ace
BPIC 813	<i>Lycopersicum esculentum</i>	Λακωνία	Ace
BPIC 814	<i>Lycopersicum esculentum</i>	Λακωνία	Ace
BPIC 820	<i>Lycopersicum esculentum</i>	Λακωνία	Ace
BPIC 821	<i>Lycopersicum esculentum</i>	Λακωνία	Ace
BPIC 828	<i>Lycopersicum esculentum</i>	Ηλεία	Antonio
BPIC 829	<i>Lycopersicum esculentum</i>	Ηλεία	Antonio
BPIC 830	<i>Lycopersicum esculentum</i>	Ηλεία	Antonio
BPIC 831	<i>Lycopersicum esculentum</i>	Ηλεία	Antonio
BPIC 832	<i>Lycopersicum esculentum</i>	Ηλεία	Antonio
BPIC 1037	<i>Lycopersicum esculentum</i>	Λακωνία	Ace
BPIC 1038	<i>Lycopersicum esculentum</i>	Λακωνία	Ace
BPIC 1039	<i>Lycopersicum esculentum</i>	Λακωνία	Ace
BPIC 1040	<i>Lycopersicum esculentum</i>	Λακωνία	Ace
BPIC 2101	<i>Lycopersicum esculentum</i>	Μεσσηνία	Ace
BPIC 2102	<i>Lycopersicum esculentum</i>	Μεσσηνία	Ace
BPIC 825	<i>Lycopersicum esculentum</i>	Μεσσηνία	
Τομάτα Πατρών		Καλάβρυτα	



(Εικ. 8.) Καλλιέργεια του βακτηρίου *Ralstonia solanacearum* σε δοκιμαστικό σωλήνα με υλικό N. A. G. (παραγωγή καστανής χρωστικής)

2) Συνθήκες ανάπτυξης των φυτών

Ο σπόρος των φυτών τομάτας ήταν φυτουγειονομικά ελεγμένος και φυτεύτηκε εντός θερμοκηπίου σε σπορείο με συνθήκες θερμοκρασίες 23-25°C και φωτοπερίοδο 16 ωρών. Τα νεαρά φυτά μετά από δυο περίπου εβδομάδες μεταφυτεύτηκαν σε πλαστικά ποτήρια νερού (με οπές από κάτω ώστε να διευκολύνεται η στράγγιση) τα οποία περιείχαν αποστειρωμένο μίγμα χώματος και τύρφης και ποτίζονταν (έτσι ώστε να έχουν ένα ικανοποιητικό επίπεδο υγρασίας του εδάφους) ανά τακτά χρονικά διαστήματα (περίπου ανά 2-3 ημέρες) .

Τα φυτά στηρίχθηκαν με την βοήθεια λεπτών ξύλων έτσι ώστε να αναπτυχθεί ο βλαστός και να διευκολυνθεί η διαδικασία της τεχνητής μόλυνσης.

3) Τεχνητές μολύνσεις

Οι τεχνητές μολύνσεις πραγματοποιήθηκαν σε δύο εποχές, τον Ιούνιο και Σεπτέμβριο, με φυτά τομάτας ηλικίας 3 εβδομάδων. Για κάθε απομόνωση μολύνθηκαν αντιστοίχως δυο φυτά ποικιλίας Contessa ίδιας ηλικίας και ανάπτυξης έτσι στο σύνολο των 20 απομονώσεων είχαμε 40 φυτά μολυσμένα και δύο φυτά αρνητικοί μάρτυρες, φυτά που μολύνθηκαν με αποστειρωμένο, απεσταγμένο νερό (AAN) .

Τα αποτελέσματα ελήφθησαν εντός 2 εβδομάδων, διατήρησης των φυτών σε θερμοκρασία 28°C και φωτοπερίοδο 16h.

Για τις τεχνητές μολύνσεις, χρησιμοποιήθηκαν καλλιέργειες βακτηρίων 24h, σε δοκιμαστικούς σωλήνες. Σε κάθε σωλήνα προστέθηκαν 2ml AAN και από το αιώρημα προστέθηκε σταγόνα (5μl) επί του στελέχους των φυταρίων τομάτας μεταξύ κοτυληδόνων και πρώτου φύλλου. Με αποστειρωμένο νυστέρι έγινε ελαφρώς διαγώνια τομή του βλαστού, ξεκινώντας από την σταγόνα. Η τομή καλύφθηκε μετά με αποστειρωμένη βαζελίνη και τα φυτά διατηρήθηκαν στο θερμοκήπιο (28°C) .

4) Δοκιμές σε θρεπτικά υλικά

Τα θρεπτικά υλικά είναι τα θρεπτικά υποστρώματα στα οποία αναπτύσσονται υπό ασηπτικές συνθήκες τα φυτοπαθογόνα βακτήρια. Διακρίνονται, σε εκλεκτικά που επιτρέπουν την ανάπτυξη ορισμένων μόνο βακτηρίων και σε μη εκλεκτικά που επιτρέπουν την ανάπτυξη σχεδόν όλων των βακτηρίων. Ενδιάμεση κατηγορία, θρεπτικών υλικών είναι τα ημικλεκτικά. Η εξάπλωση των αιωρημάτων βακτηρίων επί των θρεπτικών υλικών έγινε με δύο μεθόδους με σκοπό την ανάπτυξη μεμονωμένων αποικιών:

α) Γραμμική εξάπλωση (Streaking) : Η εργασία εξάπλωσης αιωρήματος βακτηρίων με γραμμική διασπορά σε τεμνόμενες γραμμές που γίνονται με βελόνα μεταφυτεύσεως (loop) πάνω στην επιφάνεια στερεού θρεπτικού υποστρώματος, μέσα σε τρυβλίο Petri.

β) Μαζική εξάπλωση (Plating) : Η εργασία εξαπλώσεως διαδοχικών αραιώσεων αιωρήματος βακτηρίων που γίνεται με υάλινη ράβδο πάνω στην επιφάνεια στερεού θρεπτικού υποστρώματος μέσου μέσα σε τρυβλίο Petri.

Με τη διαδικασία της μαζικής εξαπλώσεως (Plating) διαδοχικών αραιώσεων του μολύσματος εξετάστηκε πάνω σε διάφορα υλικά η ανάκτηση (recovery) αποικιών με μέτρηση του αριθμού τους (CFU (Coloring Forming Units) και παρατηρήθηκε η μορφολογία των αποικιών.

Τα υλικά που δοκιμάστηκαν ήταν τα ακόλουθα:

α) **NA+cyc** (Nutrient Agar +cycloheximide) , β) **NAS+cyc** (Nutrient Sucrose Agar +cycloheximide) , γ) **NAD+cyc** (Nutrient Dextrose Agar+ cycloheximide) , δ) **SMSA**, ε) **mSMSA**, στ) **SPA**, ζ) **YPGA**

5) Μέθοδος χρώσης GRAM:

Η μέθοδος χρώσης κατά Gram χρησιμοποιήθηκε πρώτη φορά από τον Δανό Christian Gram το 1884 και βασίζεται στην διαφορετική χρώση που παίρνουν τα διάφορα είδη βακτηρίων μετά από την επίδραση ειδικής χρωστικής λόγω της διαφορετικής χημικής σύστασης του κυτταρικού τοιχώματος βακτηριακού κυττάρου.

Η μέθοδος διαχωρίζει τα βακτήρια σε δυο ομάδες τα αρνητικά κατά (-Gram) και τα θετικά κατά (+Gram) .

Διαδικασία χρώσης:

Η χρώση έγινε σύμφωνα με την διαδικασία που εφαρμόζεται στο Εργαστήριο Βακτηριολογίας του ΜΦΙ.

- Παίρνουμε αντικειμενοφόρες πλάκες πάνω στις οποίες εξαπλώνουμε μία σταγόνα αιωρήματος του βακτηρίου. Αφήνουμε να στεγνώσει το αιώρημα και προσηλώνουμε το αιώρημα στις αντικειμενοφόρες πλάκες με διέλευση για μικρό χρονικό διάστημα πάνω από ήπια φλόγα έτσι ώστε να προσκολληθεί το αιώρημα πάνω στην πλάκα.

- Τοποθετούμε πάνω στην πλάκα διάλυμα Carbomethyl Violet για διάστημα τουλάχιστον 1min ξεπλένουμε την κάθε αντικειμενοφόρο πλάκα. Μετά απορρίπτεται η χρωστική με τίναγμα της πλάκας και το υπόλοιπο της χρωστικής απομακρύνεται με διάλυμα Ιωδίνης.

- Προσθέτουμε ακολούθως διάλυμα ιωδίνης και αφήνουμε να δράσει για τουλάχιστον 1 min.

- Τέλος ξεπλένουμε τις πλάκες με αιθυλική αλκοόλη, μέχρι απομακρύνσεως της ιωδίνης.

Οι πλάκες παρατηρούνται στο μικροσκόπιο αντιθέσεως φάσεως με φακό αντικειμενικό 100X ώστε να ελεγχθεί η παρουσία κυττάρων και ακολούθως με διερχόμενο φωτισμό για διαπίστωση χρώσης των κυττάρων.

Θετικά χαρακτηρίστηκαν τα δείγματα στα οποία τα κύτταρα είχαν κυανό χρωματισμό, ενώ αρνητικά χαρακτηρίστηκαν τα δείγματα στα οποία δεν παρατηρείται κυανή χρώση.

6) Μέθοδος χρώσης μαστιγίων:

Η χρώση βασίστηκε στην μέθοδο "Cesares-Gill's" μετά την οποία έγινε η παρατήρηση των μαστιγίων στο μικροσκόπιο.

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν:

Plimmer's mordant, Kikpatrick's fixative προσηλωτικό, Carbol fushin (αραιό) . (Παράρτημα1)

Διαδικασία χρώσης:

Η χρώση έγινε σύμφωνα με τη διαδικασία που εφαρμόζεται στο Εργαστήριο Βακτηριολογίας του ΜΦΙ.

- 1) Παρασκευάστηκε, προσεκτικά βακτηριακό αιώρημα πρόσφατης καλλιέργειας, φροντίζοντας να μην γίνει ισχυρή ανάδευση και καταστραφούν τα μαστίγια.

- 2) Σε μια όσο το δυνατόν καθαρή αντικειμενοφόρο πλάκα, εναποτέθηκε σταγόνα αιωρήματος στο ένα άκρο της πλάκα που τοποθετήθηκε σε

κάθετη θέση με το μέρος της σταγόνας προς τα πάνω. Έτσι η σταγόνα κύλησε αργά προς το άλλο άκρο και αφέθηκε να στεγνώσει σε θερμοκρασία δωματίου.

3) Εφαρμόστηκε προσηλωτικό Kickpatrik's fixative για 5 min ώστε να προσηλωθούν τα κύτταρα στην πλάκα.

4) Έγινε πλήρης έκπλυση του προσηλωτικού με απιονισμένο νερό.

5) Εφαρμόστηκε το Plimmer's mordant (χρωστική) και αφέθηκε να δράσει για 5 min.

6) Εκπλύθηκε με νερό βρύσης.

7) Εφαρμόστηκε το Carbol fushin για 2 min

8) Εκπλένεται και αφήνεται να στεγνώσει σε θερμοκρασία δωματίου.

Ακολούθησε μικροσκοπική παρατήρηση με ελαιοκαταδυτικό φακό (Ph3, 100X) αντίθεσης φάσεως (διαφραγμα3) . Τα μαστίγια αποτελούν βασικό ταξινομικό χαρακτήρα για τα βακτήρια. Σημασία έχει αριθμός τους και ο τρόπος έκφυσης από το κυτταρικό τοίχωμα.

7) Μέθοδος παραγωγής οξειδάσης:

Παίρνουμε βακτηριακή ανάπτυξη υπό ασηπτικές συνθήκες εντός Laminar flow με βακτηριακή βελόνη λευκόχρυσου (100p) από τους δοκιμαστικούς σωλήνες και την. Θέτουμε σε διηθητικό χαρτί εμποτισμένο με 1% αντιδραστηρίου οξειδάσης. Σε περίπτωση θετικής αντίδρασης εμφανίζεται στα όρια της βακτηριακής καλλιέργειας μπλε χρωματισμός εντός 10sec.

8) Μέθοδος παραγωγής φθορίζουσας χρωστικής:

Ποσότητα βακτηριακής ανάπτυξης (ηλικίας 24h) εξαπλώθηκε πάνω σε τρυβλία με υλικό Kings B (πάρρημα θρεπτικών υλικών) ακτινωτά και σε απόσταση η μία καλλιέργεια από την άλλη. Μετά από 24-48h επώασης, ελέγχεται η παραγωγή διαχεόμενης φθορίζουσας χρωστικής με έκθεση των τρυβλίων σε υπεριώδες φως (254 nm και 360nm) .

9) Δοκιμή Sudan Black:

Είναι η μέθοδος με την οποία μπορούμε να παρατηρήσουμε με βαφή την παρουσία ή μη σουδανοφυλικών εγκλείστων (PHB gramules) .

•Παίρνουμε αντικειμενοφόρες πλάκες πάνω στις οποίες εξαπλώνουμε το αιώρημα του βακτηρίου που αναπτύχθηκε επί υλικού που περιέχει σάκχαρο (πχ. NAD) . Αφήνουμε να στεγνώσει το αιώρημα για 1 min

και το προσηλώνουμε περνώντας αντικειμενοφόρες πλάκες ελαφρώς για μικρό χρονικό διάστημα πάνω από ήπια φλόγα.

Η χρώση έγινε ως ακολούθως:

1) Χρώση με διάλυμα 1% Sudan black (σε 70%αιθανόλη) επί 10min.

2) Απόρριψη, πλύση με νερό και μετά με ξυλόλη.

3) Χρώση με 0, 5%υδατικό διάλυμα σαφραϊνίνης επί 10 sec.

4) Απόρριψη, πλύση με νερό.

Εξετάστηκαν οι πλάκες σε φωτομικροσκόπιο με ελαιοκαταδυτικό φακό αντίθετης φάσης (pH3) και κλίμακα μεγένθυσης 100X και σε διερχόμενο φώς.

Θετική χρώση: παρουσία μαύρων-σκούρων μπλέ εγκλείστων μέσα στα κύτταρα που βάφονται ρόζ.

10) Δοκιμές χρησιμοποίησης σακχάρων-αλκοολών-οργανικών οξέων

Το *Ralstonia solanacearum* (Rs) διαχωρίζεται σε βιοποικιλίες βάσει της ικανότητας του να παράγει οξύ από τρεις εξοζοαλκοόλες και τρία σάκχαρα (Hayward 1964&1994) . Ελέγχθηκε η παραγωγή οξέος από τις αναφερόμενες οργανικές ουσίες στον παρακάτω πίνακα, με χρήση των απομονώσεων του Rs.

Πίνακας2. Παραγωγή οξέος από βιοποικιλίες του Rs

Βιοποικιλία					
Οργανική ουσία	1	2	3	4	5
Μαλτόζη	-	+	+	-	+
Λακτόζη	-	+	+	-	+
Κελλοβιόζη	-	+	+	-	+
Μαννιτόλη	-	-	+	+	+
Σορβιτόλη	-	-	+	+	-
Δουλκιτόλη	-	-	+	+	+

Με πρόσθετες δοκιμές η βιοποικιλία 2 μπορεί να διαφοροποιηθεί σε υποφαινότυπους (Hayward 1994)

Πίνακας 3. Χαρακτηριστικά υποφαινότυπων βιοποικιλιών

Δοκιμή	Βιοποικιλία2	Βιοποικιλία2-A	Βιοποικιλία2-T
Χρήση τρεαλόζης	-	+	+
Χρήση ινοσιτόλης	+	-	+
Χρήση D-ριβόζης	-	-	+
Πηκτινολυτική δράση	Μικρή	μικρή	μεγάλη

11) ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ ΦΥΤΩΝ

α) Αντίδραση υπερευαισθησίας καπνού

Η παραγωγή αντίδρασης υπερευαισθησίας (Lozano&Sequeira, 1970) από τις καλλιέργειες του Rs, ελέγχθηκε με ένεση αιωρήματος (10^7 - 10^8 CFU/ml) στο μεσόφυλλο, φύλλων καπνού. Αποτελέσματα ελήφθησαν μετά από 24h, επώασης των φυτών (28°C).

β) Δοκιμή παθογένειας φυτών τομάτας

Η δοκιμή παθογένειας είναι μια δοκιμή τεχνητής μόλυνσης (κεφ 1. 3) σε φυτά τομάτας με συγκεκριμένο τρόπο (κεφ 1. 3. 1) για τον έλεγχο παθογένειας των απομονώσεων, αλλά και για την απευθείας μόλυνση με εκχυλίσματα φυτών που περιέχουν το παθογόνο. Ο έλεγχος της παθογένειας των απομονώσεων του Rs έγινε σε φυτάρια τομάτας ποικιλίας Contessa.

Πίνακας 4. Αντίδραση φυτών στην μόλυνση από το Rs

Αντίδραση φυτών	Φυλή		
	1	2	3
Ντομάτας	Μαρασμός	Μη αντίδραση	Μαρασμός
Μελιτζάνας	Μαρασμός	Μη αντίδραση	Μη αντίδραση
Καπνού	Νέκρωση (48h) και μαρασμός 7-8 ημέρες	HR (12-24h)	Χλώρωση (2-8 ημέρες)

12) ΟΡΟΛΟΓΙΚΕΣ Η ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ:

Τα φυτοπαθογόνα βακτήρια όπως το *Ralstonia Solanacearum* έχουν την ιδιότητα να προκαλούν την δημιουργία αντισωμάτων όταν εισάγονται σε ένα ζωικό οργανισμό, (λειτουργούν ως αντιγόνα.)

Παίρνοντας λοιπόν το αίμα των ζώων αυτών που περιέχει αντισώματα έχουμε τον αντιορό του βακτηρίου τον οποίο μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε για την εργαστηριακή του διάγνωση.

Η ανοσολογική μέθοδος που μελετήθηκε ήταν η μέθοδος ανοσοφθορισμού (IF) , που αποτελεί τη σπουδαιότερη ανοσολογική μέθοδο ανίχνευσης των βακτηρίων.

ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΝΟΣΟΦΘΟΡΙΣΜΟΥ (IMUNOFLUORESENCE)

Χρησιμοποιείται αντιορός για *Ralstonia Solanacearum* κατά προτίμηση για φυλή 3 βιοποικιλία 2. Ο τίτλος προσδιορίζεται σε αιώρημα 10⁶ κυττάρων ανά ml από το ομόλογο στέλεχος *Ralstonia Solanacearum* με κατάλληλη αραιώση συμπλόκου ισοθειανικής φθορειαίνης (FITC) (ΠΡΟΣΑΡΤΗΜΑ2) , σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Ο πρωτογενής αντιορός πρέπει να έχει τίτλο IF τουλάχιστον 1: 2000.

Χρησιμοποιούνται πολυφατνιακές αντικειμενοφόρες πλάκες μικροσκοπίου με 10 κατά προτίμηση φατνία διαμέτρου τουλάχιστον 6mm. Σε κάθε αντικειμενοφόρο πλάκα περιλαμβάνεται μάρτυρας συμπλόκου FITC (ΠΡΟΣΑΡΤΗΜΑ2) . Αν τυχόν στο μάρτυρα FITC παρατηρηθούν θετικά κύτταρα η δοκιμή θα πρέπει να επαναλαμβάνεται συμπεριλαμβάνοντας και το μάρτυρα PBS.

Παρασκευάζονται ξεχωριστά ως θετικοί μάρτυρες αντικειμενοφόροι με αιώρημα 10⁶ κυττάρων ανά ml από στέλεχος *Ralstonia Solanacearum* της κατάλληλης φυλής/βιοποικιλίας που ερευνούμε. Σε κάθε σειρά δοκιμών χρησιμοποιείται μια αντικειμενοφόρος.

Παρασκευάζονται δεκαπλές αραιώσεις δηλαδή 1/10, 1/100, 1/1000 του αιωρήματος του ιζήματος σε ρυθμιστικό διάλυμα του ιζήματος. Σε μια σειρά φατνίων φέρεται μετρημένος με σιφώνιο συγκεκριμένος όγκος (15ml είναι αρκετός για φατνία με διάμετρο 6mm) του αιωρήματος του ιζήματος σε κάθε αραιώση.

Η άλλη σειρά μπορεί να χρησιμοποιείται για ένα δεύτερο δείγμα.

Το περιεχόμενο των φατνίων αφήνεται να ξηρανθεί. Τα βακτηριακά κύτταρα στην αντικειμενοφόρο πλάκα μπορούν να προσηλωθούν με θέρμανση με χαμηλά φλόγα ή με 95% αλκοόλη.

Διαδικασία IF

1) Οι αντικειμενοφόροι που έχουν τοποθετημένες και προσηλωμένες τις αραιώσεις εκχυλίσματος ιστών (δείγματος) τοποθετούνται πάνω σε ένυγρο απορροφητικό χαρτί. Τα φατνία δοκιμής καλύπτονται με την αραιώση εργασίας του αντιορού. Ο όγκος του χρησιμοποιημένου στα φατνία αντιορού πρέπει να είναι ισοδύναμος με τον όγκο του χρησιμοποιημένου εκχυλίσματος.

2) Οι αντικειμενοφόροι τοποθετούνται σε υγρό θάλαμο κάτω από ένα κάλυμμα και επωάζονται για 30 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

3) Ο αντιορός απομακρύνθηκε με ένα ελαφρό τίναγμα από την αντικειμενοφόρο και οι αντικειμενοφόροι ξεπλύθηκαν προσεκτικά με ρυθμιστικό διάλυμα IF.

Πλύση επί 5 λεπτά με ρυθμιστικό διάλυμα TWEEN-IG και ακολούθως επί 5 λεπτά σε ρυθμιστικό διάλυμα IF (ΠΡΟΣΑΡΤΗΜΑ2)

Η περίσσεια του υγρού απομακρύνεται προσεκτικά.

4) Οι αντικειμενοφόροι τοποθετούνται πάνω σε ένυγρο απορροφητικό χαρτί.

Τα φατνία δοκιμής και το φατνίο του FITC καλύπτονται με την αραιώση του συμπλόκου του FITC που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό του τίτλου. Ο όγκος του χρησιμοποιημένου στα φατνία συμπλόκου πρέπει να είναι ο ίδιος με τον όγκο του αντιορού.

5) Οι αντικειμενοφόροι τοποθετούνται κάτω από ένα κάλυμμα και επωάζονται για 30 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

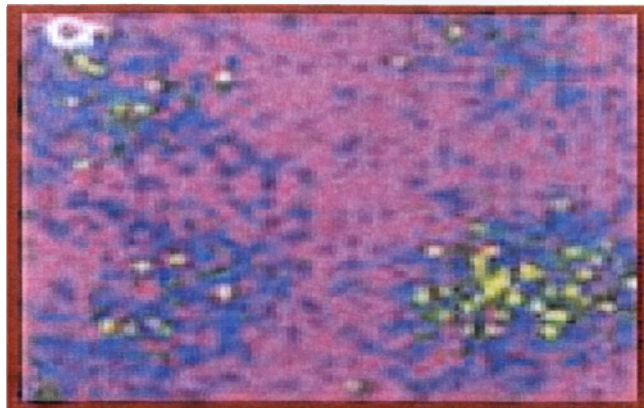
6) Το σύμπλοκο FITC τινάχθηκε μακριά από την αντικειμενοφόρο και οι αντικειμενοφόροι ξεπλύθηκαν και πλένονται όπως προηγουμένως (βλέπε 3) . Η περίσσεια του νερού απομακρύνθηκε προσεκτικά.

7) Σε κάθε φατνίο φέρονται με σιφώνιο 5-10μl φωσφορικού ρυθμιστικού διαλύματος γλυκερίνης 0, 1M (ΠΡΟΣΑΡΤΗΜΑ2) και τα φατνία καλύπτονται με καλυπτήρα.

Μικροσκοπική εξέταση

Οι αντικειμενοφόροι δοκιμής εξετάστηκαν σε μικροσκόπιο φθορισμού με φίλτρα κατάλληλα για την διέγερση του FITC, με ελαιοκαταδυτικό φακό και με μεγένθυση 500-1000X. Τα φατνία εξετάστηκαν κατά μήκος δυο καθέτων διαμέτρων και κατά την περίμετρο τους.

Πρώτα ελέγχεται η αντικειμενοφόρος του θετικού μάρτυρα. Τα κύτταρα πρέπει να είναι πλήρως χρωσμένα με λαμπρό φωτισμό. (Εικ. 9)

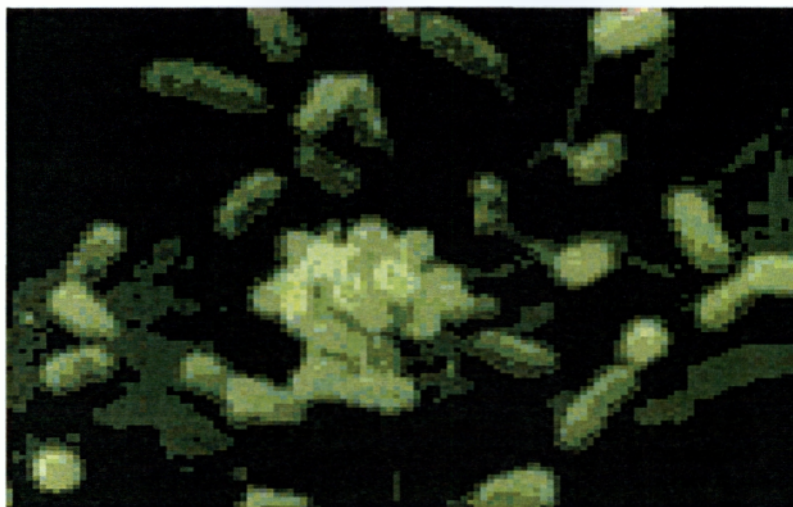


(Εικ. 9) Φθορίζοντα κύτταρα σε μεγένθυση

Ελέγχεται κατ' αρχάς ότι δεν υπάρχουν φθορίζοντα κύτταρα στα φατνία των μαρτύρων του FITC διότι αν υπάρχουν δείχνει μη ειδική σύζευξη του συμπλόκου, αυτοφθορισμό ή επιμόλυνση.

Εξετάζεται αν υπάρχουν φθορίζοντα κύτταρα με την χαρακτηριστική μορφολογία του *Ralstonia solanacearum* στα φατνία δοκιμής (Εικ. 10)

Η ένταση του φθορισμού πρέπει να είναι ίδια με εκείνη του θετικού μάρτυρα με ίδια αραιώση αντιορού. Κύτταρα με ατελή χρώση ή με ασθενή φθορισμό δεν πρέπει να λαμβάνονται υπόψη εκτός και αν υπάρχουν πολλά τέτοια.



(Εικ. 10) Φθορίζοντα κύτταρα του *Ralstonia solanacearum*

13) ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

ΔΟΚΙΜΗ PCR

(βασίζεται στην εργασία Seal et al., 1993)

Η μέθοδος βασίζεται στην αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης γνωστή ως PCR η οποία επιτυγχάνεται με τον ενζυματικό πολλαπλασιασμό ορισμένων τμημάτων του DNA μέσα από επανειλημμένους κύκλους αποδιάταξης και διαχωρισμού του DNA σε μονόκλωνες αλυσίδες και στη συνέχεια πολυμερισμού τους. Η τεχνική στηρίζεται στην δυνατότητα πολλαπλασιασμού του DNA χρησιμοποιώντας εκκινητές (primers) τμήματα δηλαδή μονόκλωνου DNA συνήθως μεγέθους 15-20 νουκλεοτιδίων τα οποία είναι συμπληρωματικά και απαραίτητα για να αρχίσει την αντιγραφή της αλυσίδας DNA με την παρουσία του ενζύμου της πολυμεράσης.

Για την εφαρμογή της μεθόδου παρασκευάσθηκε αιώρημα 10^6 κυττάρων ανά ml από στέλεχος *Ralstonia solanacearum* φυλής 3, βιοποικιλίας 2 ως θετικός μάρτυρας. Τα βήματα που ακολουθήθηκαν ήταν:

1) 100ml του αιωρήματος του ιζήματος φέρονται σε σιφώνιο σε ένα μικροφιαλίδιο. Εναλλακτικά 90 μl του αιωρήματος μεταφέρονται σε μικροφιαλίδιο περιέχον 10ml NaOH 0, 5M. Το περιεχόμενο του φιαλιδίου ανακατεύεται αναποδογυρίζοντας επανειλημμένα πάνω κάτω το μικροφιαλίδιο.

2) Το φιαλίδιο θερμαίνεται για 4 λεπτά στους 100 °C και κατόπιν απομακρύνεται αμέσως πάνω σε πάγο.

3) Παρασκευάζονται δυο τουλάχιστον δεκαδικές αραιώσεις 1/10 και 1/100 η περισσότερες αν θεωρηθεί απαραίτητο σε αποστειρωμένο απεσταγμένο η υπερκάθαρο νερό (UPW) .

4) Παρασκευάζεται το μείγμα αντίδρασης PCR (ΠΡΟΣΑΡΤΗΜΑ3) προσθέτοντας σε αποστειρωμένο φιαλίδιο τα παρακάτω συστατικά με την ακόλουθη σειρά:

Πίνακας5. Σύνθεση μίγματος PCR

	Για όγκο αντίδρασης 50μl	
Συστατικό	Ποσότητα	Τελική συγκέντρωση
Αποστειρωμένο απεσταγμένο ή UPW	30, 8μl-33, 8μl	-
10χρυσμιστικό διάλυμα PCR	5, 0μl	1x
d-ATP	1, 0μl	0, 2mM
d-CTP	1, 0μl	0, 2mM
d-GTP	1, 0μl	0, 2mM
d-TTP	1, 0μl	0, 2mM
Εκκινητής OLI-1 (20μM)	2, 5μl	1, 0μM
Εκκινητής Y-2 (20 μM)	2, 5μl	1, 0μM
Ταq πολυμεράσης (5U/μl)	0, 2μl	1, 0U
Συνολικός όγκος	45-48μl	

Τα φιαλίδια με το μείγμα αντίδρασης της PCR διατηρούνται σε πάγο.
Σημείωση: Κατά την διάρκεια παρασκευής του δείγματος καθώς και των υπολοίπων εργασιών για τη δοκιμή PCR πρέπει να χρησιμοποιούνται ογκομετρικά ακροστόμια (pipette tips) με φίλτρο.

5) Εφαρμογή PCR

5. 1) Τα φιαλίδια με το βρασμένο μείγμα και τον θετικό μάρτυρα υποβάλλονται σε φυγοκέντρηση.

Προστίθενται με την καθορισμένη σειρά 2-5μl του η των δειγμάτων, υδατικού μάρτυρα και θετικού μάρτυρα στα φιαλίδια με το μείγμα αντίδρασης της PCR.

Τα φιαλίδια τοποθετούνται στο θερμικό μπλοκ στην μονάδα θέρμανσης του θερμικού κυκλοποιητή DNA. (Ο θερμικός κυκλοποιητής που χρησιμοποιούμε είναι Perkin Elmer 9600)

5. 2) Ακολουθείται το εξής πρόγραμμα:

1 κύκλος από:

i) 2 λεπτά στους 96 °C: Μετουσίωση του αρχικού DNA

50 κύκλοι από:

ii) 20 δευτερόλεπτα στους 94 °C: μετουσίωση

iii) 20 δευτερόλεπτα στους 68 °C: προσκόλληση εκκινητών

iv) 30 δευτερόλεπτα στους 72 °C: επέκταση αντιγράφου

1 κύκλος από:

v) 10 λεπτά στους 72 °C: περαιτέρω επέκταση

1 κύκλος συνιστάμενος σε:

vi) διατήρηση στους 4 °C

5. 3) Τα φιαλίδια απομακρύνονται από τον θερμικό κυκλοποιητή και εάν το το προϊόν της PCR δεν αναλυθεί τα φιαλίδια τα αποθηκεύουμε στους 4 °C για χρήση την ίδια μέρα ή στους -18 °C για αργότερα.

Ανάλυση του προϊόντος της PCR:

Τα τμήματα DNA της PCR ανιχνεύονται με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης και χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο

1) Παρασκευάζεται κατάλληλη πηκτή αгарόζης βράζοντας ποσότητα αгарόζης σε τρεις οξικό ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (TAE) .

2) Η τηγμένη αгарόζη ψύχεται στους 50-60 °C, χύνεται στο καλούπι της μονάδας ηλεκτροφόρησης και εισάγεται η κτένα. Η πηκτή αφήνεται να στερεοποιηθεί.

3) Απομακρύνεται η κτένα. Η πηκτή βυθίζεται σε TAE έτσι ώστε ίσα ίσα να καλύπτεται (2-3mm) από το ρυθμιστικό διάλυμα.

4) 3μl ρυθμιστικού διαλύματος φόρτωσης φέρονται πάνω σε παραφίλμ. Προστίθενται 12μl του προϊόντος PCR από τα δείγματα το θετικό μάρτυρα ή τον υδατικό μάρτυρα και αναμιγνύεται με ελαφρά αναρρόφηση στο ογκομετρικό ακροστόμιο πριν από την φόρτιση στην πηκτή. Οι αναφερόμενοι όγκοι μπορούν να τροποποιηθούν προκειμένου να προσαρμοστούν στην χωρητικότητα των φατνίων στην πηκτή αгарόζης

5) Η φόρτωση γίνεται με προσοχή στα φατνία της πηκτής. Σε ένα τουλάχιστον φατνίο φέρεται για λόγους αναφοράς κατάλληλος ιχνηθέτης DNA.

6) Συνδέονται τα καλώδια στη συσκευή ηλεκτροφόρησης και την πηγή της τροφοδοσίας. Εφαρμόζονται τάση 5-8 V/cm μέχρις όπου το μέτωπο του ιχνηλάτη δείκτη φθάσει στο 1cm από το άκρο της πηκτής.

7) Διακόπτεται η τροφοδοσία ρεύματος. Τα καλώδια αποσυνδέονται από την μονάδα ηλεκτροφόρησης, απομακρύνεται με προσοχή η πηκτή και εμβαπτίζεται σε βρωμιούχο αιθίδιο για 30-45 λεπτά.

8) Ακολουθεί αποχρωματισμός σε απεσταγμένο νερό για 10-15 λεπτά.

9) Τα συντεθειμένα τμήματα DNA εμφανίζονται με έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία. Το προϊόν PCR του *Ralstonia solanacearum* με εκκινητές OLI-1 και Υ-2 έχει μήκος 288bp. Συγκρίνεται σε σχέση με τον ιχνηθέτη DNA και τον θετικό μάρτυρα, ο δε υδατικός μάρτυρας πρέπει να είναι αρνητικός αν όχι επαναλαμβάνουμε την δοκιμή.

10) Η πηκτή φωτογραφίζεται με φιλμ 3000ASA.

ΜΕΡΟΣ ΤΡΙΤΟ

Αποτελέσματα των δοκιμών ανίχνευσης και ταυτοποίησης του βακτηρίου *Ralstonia solanacearum* σε φυτά τομάτας ποικιλίας Contessa.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Γ

1) Αποτελέσματα τεχνητών μολύνσεων φυτών τομάτας

Η καταγραφή των συμπτωμάτων έγινε για χρονική διάρκεια 15 ημερών καθώς τα αποτελέσματα ήρθαν γρήγορα με σαφή και έντονα συμπτώματα στα φυτά. Αναλυτικά σε σύνολο 42 φυτών έχουμε ως εξής:

• Σε 4 ημέρες έντονα συμπτώματα μαρασμού είχαν και τα δυο φυτά εκ των απομονώσεων 804, 811, 829, 2101 (Εικ. 11) από την απομόνωση 2102 το ένα φυτό τομάτας επίσης σε 4 ημέρες το άλλο ξεράθηκε προφανώς λόγω μεγάλης ζημιάς στα αγγεία του βλαστού η οποία προήλθε λόγω της τομής της μόλυνσης με το αιώρημα του βακτηρίου.



(Εικ. 11) Τεχνητή μόλυνση φυταρίου τομάτας (ποικιλίας Contessa) με Rs (BPIIC 2101) με συμπτώματα μαρασμού (δεξιά) , (αριστερά αρνητικός μάρτυρας) .

• Σε 7 ημέρες έντονα συμπτώματα μαρασμού είχαν και τα δυο φυτά εκ των απομονώσεων 806, 813, 820, 821, 825, 829, 830, 831, 832, 1037, 1038, 1039, 1040, δείγμα τομάτας Πατρών και τέλος

- Σε 9 ημέρες έντονα συμπτώματα μαρασμού είχαν και τα δυο φυτά εκ των απομονώσεων 814.

Με την εμφάνιση των συμπτωμάτων τα φυτά απομακρύνονταν από το θερμοκήπιο με σκοπό την ταυτοποίηση του παθογόνου εργαστηριακά έτσι ώστε να αποδειχθεί ότι η εκδήλωση των συμπτωμάτων οφείλεται στο βακτήριο. Ελήφθησαν απομονώσεις από τα φυτά που μολύνθηκαν με την παρακάτω διαδικασία:

- Σε τρυβλία Petri τοποθετήθηκαν ασηπτικά αποσταγμένες αποστειρωμένες σταγόνες νερού με την βοήθεια πιπέτας Pasteur. Εν συνεχεία με την βοήθεια νυστεριού λαμβάνονταν κυκλικά τεμάχια βλαστού από σημεία υψηλότερα από το σημείο μόλυνσης για να δούμε αν εξαπλώθηκε το βακτήριο από το σημείο από όπου κάναμε την μόλυνση.

- Πήραμε επίσης κυκλικά τεμάχια πολύ υψηλότερα από το σημείο μόλυνσης του βλαστού και συγκεκριμένα λίγο πάνω από το πρώτο φύλλο για να δούμε αν πράγματι υπήρξε μεταφορά του βακτηρίου και ο μαρασμός προήλθε από την ασθένεια και όχι λόγω της τομής του βλαστού.

Τα τρυβλία διατηρούνταν ακίνητα για χρονικό διάστημα 15 λεπτών έτσι ώστε να πραγματοποιηθεί διάχυση του βακτηρίων εφόσον υπάρχουν στο νερό.

Τα φυτά τοποθετούνται μεμονωμένα σε πλαστικές σακούλες και τοποθετούνται στο ψυγείο. Με την πάροδο των 15 λεπτών τα τρυβλία μεταφέρονταν στο Laminar air flow όπου γινόταν η γραμμική εξάπλωση του αιωρήματος πάνω (streaking) σε θρεπτικό υλικό N. A. D. με την βοήθεια βακτηριακής βελόνης (Loop) (Εικ. 12) .

Τα τρυβλία τοποθετούνταν σε επωαστικό θάλαμο με σταθερή θερμοκρασία 28 °C όπου και παρέμεναν για διάστημα περίπου 4 ημερών.

Εν συνεχεία τα τρυβλία εξετάζονταν για ύπαρξη αποικιών του βακτηρίου σε στερεοσκόπιο. Από τα τρυβλία στα οποία παρατηρείτο ανάπτυξη του βακτηρίου λαμβάνονταν αποικίες, με την Loop, και τοποθετούνταν για ανάπτυξη σε δοκιμαστικούς σωλήνες οι οποίοι περιέχουν θρεπτικό υλικό N. A. G. και τοποθετούνταν σε επωαστικό θάλαμο με θερμοκρασία 28 °C για διάστημα 48 ωρών.



(Εικ. 12) Γραμμική εξάπλωση (streaking) απομόνωσης Rs σε τρυβλίο Petri με υλικό N. A. D. +cyc

2) Εκλεκτικά μη εκλεκτικά υλικά (μορφολογία αποικιών) / Ευαισθησία υλικών

Η χρήση των θρεπτικών υλικών όπως προείπαμε είναι αναγκαία και χρήσιμη διότι μας δίνει σημαντικά στοιχεία όπως τον αριθμό και το μέγεθος των αποικιών αλλά και διαφορετικά μορφολογικά στοιχεία που μπορούμε να χρησιμοποιούμε για την ταυτοποίηση βακτηριών άρα λοιπόν και της βακτηριακής μάρανσης.

Τα αποτελέσματα που ελήφθησαν για τα διάφορα υλικά, και τις διάφορες αραιώσεις παρουσιάζονται στον πίνακα.

Πίνακας 6. Ανάκτηση Rs σε διάφορα υλικά (3ημ.)

Θρεπτικό Υλικό	Αραιώσεις		
	-6	-7	-8
NA+cyc	60	5	ΔΕ
NAD+cyc	47	4	3 (μικρές)
NAS+cyc	53	6	2
YPGA+cyc	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ
SPA	43	9	ΔΕ
SMSA	53	5	2
mSMSA	50	3	ΔΕ

Βλέπουμε στον πίνακα ότι μετά από 3 ημέρες επώαση όλα τα υλικά μας έδωσαν αποτελέσματα εκτός του YPGA+cyc καθώς και στις αραιώσεις -8 τα υλικά NA+cyc και SPA δεν έδωσαν αποτελέσματα ενώ το NAD+cyc παρά πολύ μικρές αποικίες εμφανή μόνο με μεγενθυτικό φακό.

Η μορφολογία των αποικιών ήταν η εξής:

- **NA+cyc:** Λευκές διαφανείς με ομαλό περιθώριο στρογγυλές διαμέτρου 1mm
- **NAD+cyc:** Λευκές ματ με λείο περιθώριο ανάπτυξης διαμέτρου 1-2mm (παρατηρήθηκε σε τρυβλία με μεγαλύτερη υγρασία οι αποικίες με υπερυψωμένο κέντρο και ανάγλυφο περίγραμμα) .
- **NAS+cyc:** Λευκοκκίτρινες διαφανείς με ομαλό περίγραμμα στρογγυλές διαμέτρου 0, 5mm
- **SPA:** Αποικίες λευκές γαλακτώδεις διαφανείς με ανάγλυφο περίγραμμα διαμέτρου 2mm.
- **SMSA:** Πορφυρού κέντρου με εσωτερικές ραβδώσεις με γαλακτώδους χροιάς λευκές επίπεδες αποικίες διαμέτρου 1-2mm.
- **mSMSA:** Πορφυρού κέντρου με εσωτερικές ραβδώσεις με γαλακτώδους χροιάς λευκές επίπεδες αποικίες διαμέτρου 0, 6-1mm.
- **YPGA:** Δεν είχαμε εμφανή αποτελέσματα.

Μετά το διάστημα 6 ημερών είχαμε τα εξής αποτελέσματα:

•Βλέπουμε ότι στις 6 ημέρες όλα τα υλικά μας έδωσαν αποτελέσματα εκτός του YPGA που μας έδωσε πολύ λίγο εμφανή αριθμό αποικιών.

Πίνακας7. Ανάκτηση Rs σε διάφορα υλικά (6ημ.)

Θρεπτικό Υλικό	Αραιώσεις		
	-6	-7	-8
NA+cyc	60	5	-
NAD+cyc	51	8	-
NAS+cyc	59	6	-
YPGA+cyc	9	-	-
SPA	46	9	-
SMSA	53	5	-
mSMSA	51	3	-

Η διαμόρφωση των αποικιών ήταν η εξής:

•**NA+cyc:** Λευκές διαφανείς με ομαλό περιθώριο στρογγυλές διαμέτρου 1mm

•**NAD+cyc:** Λευκές ματ με λείο περιθώριο ανάπτυξης διαμέτρου 2mm

•**NAS+cyc:** Λευκοκίτρινες διαφανείς με ομαλό περίγραμμα στρογγυλές διαμέτρου 1mm

•**SPA:** Αποικίες λευκές γαλακτώδεις διαφανείς με ανάγλυφο περίγραμμα διαμέτρου 2mm.

•**SMSA:** Πορφυρού κέντρου με εσωτερικές ραβδώσεις με γαλακτώδεις χροιάς λευκές επίπεδες αποικίες διαμέτρου 1-3mm.

•**mSMSA:** Πορφυρού κέντρου με εσωτερικές ραβδώσεις με γαλακτώδεις χροιάς λευκές επίπεδες αποικίες διαμέτρου 0, 8-1, 2mm.

•**YPGA:** Αποικίες με μικρή ανάπτυξη μεγέθους έως 1mm υπόλευκες με τάση μεταχρωματισμού προς καστανό κέντρο.

(Μετά από 10 ημέρες οι αποικίες γίνονται καστανές 1-2mm με υπερυψωμένο κέντρο) .

Για να βρούμε λοιπόν την ευαισθησία των υλικών θα βρούμε τον βαθμό ευαισθησίας τους και θα βρούμε τον μέσο ορό για την κάθε υποδεκαπλάσια αραιώση και θα τους συγκρίνουμε (για το υλικό YPGA λόγω του ότι δεν μας έδωσε αποτελέσματα στις αραιώσεις 10^{-7} και 10^{-8} πήραμε από πιο μικρές αραιώσεις από 10^{-5} έως και 10^{-6} αφού μόνο μέχρι εκεί μας έδωσε αποτελέσματα) .

•**NA+cyc:**

Σε αραιώση 10^{-6}	για ποσότητα	100μl	έχουμε 60 CFU
10^{-6}		1000μl	600 CFU
10^{-6}		1000μl	6×10^2 CFU
10^0		1000μl	<u>6×10^8 CFU/ml</u>

•**NAD+cyc:**

Σε αραιώση 10^{-6}	για ποσότητα	100μl	έχουμε 49 CFU
10^{-6}		1000μl	490 CFU
10^{-6}		1000μl	$4,9 \times 10^2$ CFU
10^0		1000μl	<u>$4,9 \times 10^8$ CFU/ml</u>

•**NAS+cyc:**

Σε αραιώση 10^{-6}	για ποσότητα	100μl	έχουμε 56 CFU
10^{-6}		1000μl	560 CFU
10^{-6}		1000μl	$5,6 \times 10^2$ CFU
10^0		1000μl	<u>$5,6 \times 10^8$ CFU/ml</u>

•**SMSA:**

Σε αραιώση 10^{-6}	για ποσότητα	100μl	έχουμε 53 CFU
10^{-6}		1000μl	530 CFU
10^{-6}		1000μl	$5,3 \times 10^2$ CFU
10^0		1000μl	<u>$5,3 \times 10^8$ CFU/ml</u>

•**mSMSA:**

Σε αραιώση 10^{-6}	για ποσότητα	100μl	έχουμε 51 CFU
10^{-6}		1000μl	510 CFU
10^{-6}		1000μl	$5,1 \times 10^2$ CFU
10^0		1000μl	<u>$5,1 \times 10^8$ CFU/ml</u>

•SPA:

Σε αραιώση 10^{-6}	για ποσότητα	100μl	έχουμε 44 CFU
10^{-6}		1000μl	440 CFU
10^{-6}		1000μl	4, 4x10² CFU
10^0		1000μl	<u>4, 4x10⁸ CFU/ml</u>

•YPGA:

Σε αραιώση 10^{-5}	για ποσότητα	100μl	έχουμε 77 CFU
10^{-5}		1000μl	770 CFU
10^{-5}		1000μl	7, 7x10² CFU
10^0		1000μl	<u>0, 77x10⁸ CFU/ml</u>

Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα θα έχουμε με αύξουσα σειρά βάση τον αριθμό αποικιών που έδειξαν άρα και την ευαισθησία τους:

- 1) NA+cyc: 6×10^8 CFU/ml
- 2) NAS+cyc: $5, 6 \times 10^8$ CFU/ml
- 3) SMSA: $5, 3 \times 10^8$ CFU/ml
- 4) mSMSA: $5, 1 \times 10^8$ CFU/ml
- 5) NAD+cyc: $4, 9 \times 10^8$ CFU/ml
- 6) SPA: $4, 4 \times 10^8$ CFU/ml
- 7) YPGA: $0, 77 \times 10^8$ CFU/ml

Γραμμική εξάπλωση (streaking) :

Τα αποτελέσματα από την ανάπτυξη, αποικιών του Rs επί διαφόρων θρεπτικών υλικών, ύστερα από γραμμική εξάπλωση (streaking) , παρουσιάζονται στον πίνακα 8.

Πίνακας8. Ανάπτυξη αποικιών Rs σε διάφορα υλικά (4ημ.)

Θρεπτικά Υλικά							
Απομονώσεις	NA+cyc	NAD+cyc	NAS+cyc	SMSA	YPGA	SPA	mSMSA
BPIC 804	+	+	+	+	+(10d)	+	+
BPIC 806	+	+	+	+	+	+	+
BPIC 811	+	+	+	+	+	+	+
BPIC 813	+	+	+	+	+	+	+
BPIC 814	+	+	+	+	+(10d)	+	+
BPIC 820	+	+	+	+	+	+	+
BPIC 821	+	+	+	+	+	+	+
BPIC 825	+	+	+	+	+(10d)	+	+
BPIC 828	+	+	+	+	+(10d)	+	+
BPIC 829	+	+	+	+	+	+	+
BPIC 830	+	+	+	+	+	+	+
BPIC 831	+	+	+	+	+	+	+
BPIC 832	+	+	+	+	+	+	+
BPIC 1037	+	+	+	+	+	+	+
BPIC 1038	+	+	+	+	+	+	+
BPIC 1039	+	+	+	+	+	+	+
BPIC 1040	+	+	+	+	+	+	+
BPIC 2101	+	+	+	+	+	+	+
BPIC 2102	+	+	+	+	+(10d)	+	+
Τομάτα Πατρών	+	+	+	+	+	+	+

Βλέπουμε λοιπόν ότι όλα τα υλικά είχαν θετικό αποτέλεσμα ως προς την ανάπτυξη του βακτηρίου εκτός μερικών απομονώσεων στο υλικό YPGA οι οποίες άργησαν αλλά τελικά μας έδωσαν αποτέλεσμα εντός 10 ημερών.

Οι αποικίες που δημιουργήθηκαν ήταν χαρακτηριστικές για το κάθε υλικό και ίδιες με αυτές που προαναφέρθηκαν ύστερα από μαζική εξάπλωση.

3) Αποτελέσματα χρώσης GRAM:

Σε όλα τα δείγματα είχαμε αρνητική χρώση άρα όλα τα δείγματα είναι αρνητικά κατά (-Gram) . (πινακας 9)

Πίνακας 9. Αποτελέσματα χρώσης κατά Gram, απομονώσεων του Rs

Απομονώσεις	Φακός Ph3 (ελαιοκαταδυτικός) διάφραγμα 3	Φακός Ph3 (ελαιοκαταδυτικός) διάφραγμα J
BPIC 804	Παρατηρείται κυανή χρωστική	Δεν παρατηρείται ίχνος κυττάρων (αρνητικό)
BPIC 806	Παρατηρείται κυανή χρωστική	Δεν παρατηρείται ίχνος κυττάρων (αρνητικό)
BPIC 811	Παρατηρείται κυανή χρωστική	Δεν παρατηρείται ίχνος κυττάρων (αρνητικό)
BPIC 813	Παρατηρείται κυανή χρωστική	Δεν παρατηρείται ίχνος κυττάρων (αρνητικό)
BPIC 814	Παρατηρείται κυανή χρωστική	Δεν παρατηρείται ίχνος κυττάρων (αρνητικό)
BPIC 820	Παρατηρείται κυανή χρωστική	Δεν παρατηρείται ίχνος κυττάρων (αρνητικό)
BPIC 821	Παρατηρείται κυανή χρωστική	Δεν παρατηρείται ίχνος κυττάρων (αρνητικό)
BPIC 825	Παρατηρείται κυανή χρωστική	Δεν παρατηρείται ίχνος κυττάρων (αρνητικό)
BPIC 828	Παρατηρείται κυανή χρωστική	Δεν παρατηρείται ίχνος κυττάρων (αρνητικό)
BPIC 829	Παρατηρείται κυανή χρωστική	Δεν παρατηρείται ίχνος κυττάρων (αρνητικό)
BPIC 830	Παρατηρείται κυανή χρωστική	Δεν παρατηρείται ίχνος κυττάρων (αρνητικό)
BPIC 831	Παρατηρείται κυανή χρωστική	Δεν παρατηρείται ίχνος κυττάρων (αρνητικό)
BPIC 832	Παρατηρείται κυανή χρωστική	Δεν παρατηρείται ίχνος κυττάρων (αρνητικό)
BPIC 1037	Παρατηρείται κυανή χρωστική	Δεν παρατηρείται ίχνος κυττάρων (αρνητικό)
BPIC 1038	Παρατηρείται κυανή χρωστική	Δεν παρατηρείται ίχνος κυττάρων (αρνητικό)
BPIC 1039	Παρατηρείται κυανή χρωστική	Δεν παρατηρείται ίχνος κυττάρων (αρνητικό)
BPIC 1040	Παρατηρείται κυανή χρωστική	Δεν παρατηρείται ίχνος κυττάρων (αρνητικό)
BPIC 2101	Παρατηρείται κυανή χρωστική	Δεν παρατηρείται ίχνος κυττάρων (αρνητικό)
BPIC 2102	Παρατηρείται κυανή χρωστική	Δεν παρατηρείται ίχνος κυττάρων (αρνητικό)
Τομάτα Πατρών	Παρατηρείται κυανή χρωστική	Δεν παρατηρείται ίχνος κυττάρων (αρνητικό)

4) Αποτελέσματα γρώσης μαστίγιων:

Πίνακας 10. Αποτελέσματα χρώσης μαστίγιων απομονώσεων του Rs

Απομονώσεις	Φακός Ph3 (ελαιοκαταδυτικός) διάφραγμα 3
BPIC 804	Παρατηρείται κυανή χρώση/λοφότριχα βακτήρια
BPIC 806	Παρατηρείται κυανή χρώση/λοφότριχα βακτήρια
BPIC 811	Παρατηρείται κυανή χρώση/λοφότριχα βακτήρια
BPIC 813	Παρατηρείται κυανή χρώση/λοφότριχα βακτήρια
BPIC 814	Παρατηρείται κυανή χρώση/λοφότριχα βακτήρια
BPIC 820	Παρατηρείται κυανή χρώση/λοφότριχα βακτήρια
BPIC 821	Παρατηρείται κυανή χρώση/λοφότριχα βακτήρια
BPIC 825	Παρατηρείται κυανή χρώση/λοφότριχα βακτήρια
BPIC 828	Παρατηρείται κυανή χρώση/λοφότριχα βακτήρια
BPIC 829	Παρατηρείται κυανή χρώση/λοφότριχα βακτήρια
BPIC 830	Παρατηρείται κυανή χρώση/λοφότριχα βακτήρια
BPIC 831	Παρατηρείται κυανή χρώση/λοφότριχα βακτήρια
BPIC 832	Παρατηρείται κυανή χρώση/λοφότριχα βακτήρια
BPIC 1037	Παρατηρείται κυανή χρώση/λοφότριχα βακτήρια
BPIC 1038	Παρατηρείται κυανή χρώση/λοφότριχα βακτήρια
BPIC 1039	Παρατηρείται κυανή χρώση/λοφότριχα βακτήρια
BPIC 1040	Παρατηρείται κυανή χρώση/λοφότριχα βακτήρια
BPIC 2101	Παρατηρείται κυανή χρώση/λοφότριχα βακτήρια
BPIC 2102	Παρατηρείται κυανή χρώση/λοφότριχα βακτήρια
Τομάτα Πατρών	Παρατηρείται κυανή χρώση/λοφότριχα βακτήρια

Παρατηρήθηκε κυανή χρώση βακτηρίων, μαστίγια στους πόλους με μορφή θυσάνου συνεπώς πρόκειται περί λοφότριχων βακτηρίων.

5) Αποτελέσματα παραγωγής οξειδάσης:

Πίνακας 11. Αποτελέσματα παραγωγής οξειδάσης

Απομονώσεις	Παραγωγή Οξειδάσης
BPIC 804	+
BPIC 806	+
BPIC 811	+
BPIC 813	+
BPIC 814	+
BPIC 820	+
BPIC 821	+
BPIC 825	+
BPIC 828	+
BPIC 829	+
BPIC 830	+
BPIC 831	+
BPIC 832	+
BPIC 1037	+
BPIC 1038	+
BPIC 1039	+
BPIC 1040	+
BPIC 2101	+
BPIC 2102	+
Τομάτα Πατρών	+

Όλες οι απομονώσεις είχαν θετικό αποτέλεσμα.

6) Αποτελέσματα παραγωγής φθορίζουσας χρωστικής:

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα 12.

Πίνακας 12. Παραγωγή φθορίζουσας χρωστικής

Απομονώσεις	Παραγωγή Φθορίζουσας Χρωστικής
BPIC 804	-
BPIC 806	-
BPIC 811	-
BPIC 813	-
BPIC 814	-
BPIC 820	-
BPIC 821	-
BPIC 825	-
BPIC 828	-
BPIC 829	-
BPIC 830	-
BPIC 831	-
BPIC 832	-
BPIC 1037	-
BPIC 1038	-
BPIC 1039	-
BPIC 1040	-
BPIC 2101	-
BPIC 2102	-
Τομάτα Πατρών	-

Όλες οι απομονώσεις είχαν αρνητικό αποτέλεσμα.

7) Αποτελέσματα χρώσης με Sudan Black:

Πίνακας 13. Αποτελέσματα παρουσίας σουδανοφιλικών εγκλείστων

Απομονώσεις	Φακός Rh3 (ελαιοκαταδυτικός) διάφραγμα 3
BPIC 804	Παρατήρηση μαύρων εγκλείστων/κύτταρο ροζ χρώση
BPIC 806	Παρατήρηση μαύρων εγκλείστων/κύτταρο ροζ χρώση
BPIC 811	Παρατήρηση μαύρων εγκλείστων/κύτταρο ροζ χρώση
BPIC 813	Παρατήρηση μαύρων εγκλείστων/κύτταρο ροζ χρώση
BPIC 814	Παρατήρηση μαύρων εγκλείστων/κύτταρο ροζ χρώση
BPIC 820	Παρατήρηση μαύρων εγκλείστων/κύτταρο ροζ χρώση
BPIC 821	Παρατήρηση μαύρων εγκλείστων/κύτταρο ροζ χρώση
BPIC 825	Παρατήρηση μαύρων εγκλείστων/κύτταρο ροζ χρώση
BPIC 828	Παρατήρηση μαύρων εγκλείστων/κύτταρο ροζ χρώση
BPIC 829	Παρατήρηση μαύρων εγκλείστων/κύτταρο ροζ χρώση
BPIC 830	Παρατήρηση μαύρων εγκλείστων/κύτταρο ροζ χρώση
BPIC 831	Παρατήρηση μαύρων εγκλείστων/κύτταρο ροζ χρώση
BPIC 832	Παρατήρηση μαύρων εγκλείστων/κύτταρο ροζ χρώση
BPIC 1037	Παρατήρηση μαύρων εγκλείστων/κύτταρο ροζ χρώση
BPIC 1038	Παρατήρηση μαύρων εγκλείστων/κύτταρο ροζ χρώση
BPIC 1039	Παρατήρηση μαύρων εγκλείστων/κύτταρο ροζ χρώση
BPIC 1040	Παρατήρηση μαύρων εγκλείστων/κύτταρο ροζ χρώση
BPIC 2101	Παρατήρηση μαύρων εγκλείστων/κύτταρο ροζ χρώση
BPIC 2102	Παρατήρηση μαύρων εγκλείστων/κύτταρο ροζ χρώση
Τομάτα Πατρών	Παρατήρηση μαύρων εγκλείστων/κύτταρο ροζ χρώση

Όλες οι απομονώσεις είχαν θετικό αποτέλεσμα δηλαδή έδειξαν την παραγωγή σουδανοφιλικών εγκλείστων.

8) Βιοχημικοί χαρακτήρες του βακτηρίου

Χρώση σακχάρων, αλκοολών και ορτανικών οξέων

Πίνακας 14. Παραγωγή οξέος από οργανικές ενώσεις

Απομονώσεις	Μαλτόζη	Λακτόζη	Κελλοβιόζη	Μαννιτόλη	Σορβιτόλη	Δουλκιτόλη
BPIC 804	+	+	+	-	-	-
BPIC 806	+	+	+	-	-	-
BPIC 811	+	+	+	-	-	-
BPIC 813	+	+	+	-	-	-
BPIC 814	+	+	+	-	-	-
BPIC 820	+	+	+	-	-	-
BPIC 821	+	+	+	-	-	-
BPIC 825	+	+	+	-	-	-
BPIC 828	+	+	+	-	-	-
BPIC 829	+	+	+	-	-	-
BPIC 830	+	+	+	-	-	-
BPIC 831	+	+	+	-	-	-
BPIC 832	+	+	+	-	-	-
BPIC 1037	+	+	+	-	-	-
BPIC 1038	+	+	+	-	-	-
BPIC 1039	+	+	+	-	-	-
BPIC 1040	+	+	+	-	-	-
BPIC 2101	+	+	+	-	-	-
BPIC 2102	+	+	+	-	-	-
Τομάτα Πατρών	+	+	+	-	-	-

Πίνακας 15. Χρησιμοποίηση σακχάρων από τις απομονώσεις του Rs

Χρησιμοποίηση σακχάρων		
Απομονώσεις	Τρεαλόζη	D-ριβόζη
BPIC 804	+	-
BPIC 806	+	-
BPIC 811	+	-
BPIC 813	+	-
BPIC 814	+	-
BPIC 820	+	-
BPIC 821	+	-
BPIC 825	+	-
BPIC 828	+	-
BPIC 829	+	-
BPIC 830	+	-
BPIC 831	+	-
BPIC 832	+	-
BPIC 1037	+	-
BPIC 1038	+	-
BPIC 1039	+	-
BPIC 1040	+	-
BPIC 2101	+	-
BPIC 2102	+	-
Τομάτα Πατρών	+	-

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που βλέπουμε στον πίνακα όλες οι απομονώσεις μας έδωσαν τα ίδια αποτελέσματα άρα έχουμε θετική αντίδραση με τα τρία σάκχαρα ενώ έχουμε αρνητική αντίδραση με τις τρεις εξοζοαλκοόλες σύμφωνα λοιπόν με τον (Hayward 1964) όλες οι απομονώσεις κατατάσσονται στην βιοποικιλία 2 και στον υποφαινότυπο 2-A λόγω της θετικής αντίδρασης μόνο με την τρεαλόζη.

9) ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΙΣ ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑΣ

α) Αντίδραση υπερευαισθησίας καπνού 24h

Τα αποτελέσματα για αντίδραση υπερευαισθησίας καπνού εντός 24h ήταν όλα αρνητικά.

β) Μόλυνση Φυτών καπνού (48h)

Τα αποτελέσματα που είχαμε ήταν χλώρωση των φυτών σε διάστημα 3-5 ημερών.

γ) Δοκιμή παθογένειας σε φυτά τομάτας

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η ίδια που ακολουθήσαμε στο (κεφ 1. 3) δηλαδή τεχνητή μόλυνση με σχισμή, παρατήρηση αποτελεσμάτων απομόνωση και ταυτοποίηση αποικιών πάνω σε τρυβλία με θρεπτικό υπόστρωμα (Nad+cyc με γραμμική εξάπλωση) για παρατήρηση αποικιών και απομόνωσης των (κεφ 1. 4) καθώς και η διαδικασία μεθόδου ανοσοφθορισμού για ταυτοποίηση των απομονώσεων (κεφ Β) . Τα αποτελέσματα που είχαμε ήταν μάρανση σε όλα τα φυτά, στην εξάπλωση πάνω σε υλικά είχαμε χαρακτηριστικές αποικίες *Ralstonia solanacearum* και στην μέθοδο ανοσοφθορισμού παρατηρήθηκαν θετική χρώση σε όλα τα δείγματα.

Πίνακας 16. Αποτελέσματα παθογένειας σε φυτά τομάτας και ανίχνευση του Rs με απομόνωση και IF

Απομονώσεις	Παθογένεια φυτών τομάτας (Contessa)	NAD+cys (Γραμμική εξαπλωση)	IF (Ανοσοφθορισμός)
BPIC 804	+	+	+
BPIC 806	+	+	+
BPIC 811	+	+	+
BPIC 813	+	+	+
BPIC 814	+	+	+
BPIC 820	+	+	+
BPIC 821	+	+	+
BPIC 825	+	+	+
BPIC 828	+	+	+
BPIC 829	+	+	+
BPIC 830	+	+	+
BPIC 831	+	+	+
BPIC 832	+	+	+
BPIC 1037	+	+	+
BPIC 1038	+	+	+
BPIC 1039	+	+	+
BPIC 1040	+	+	+
BPIC 2101	+	+	+
BPIC 2102	+	+	+
Τομάτα Πατρών	+	+	+

10) Ορολογικές δοκιμές

Πίνακας. 17. Αποτελέσματα δοκιμής IF, ανίχνευσης του Rs

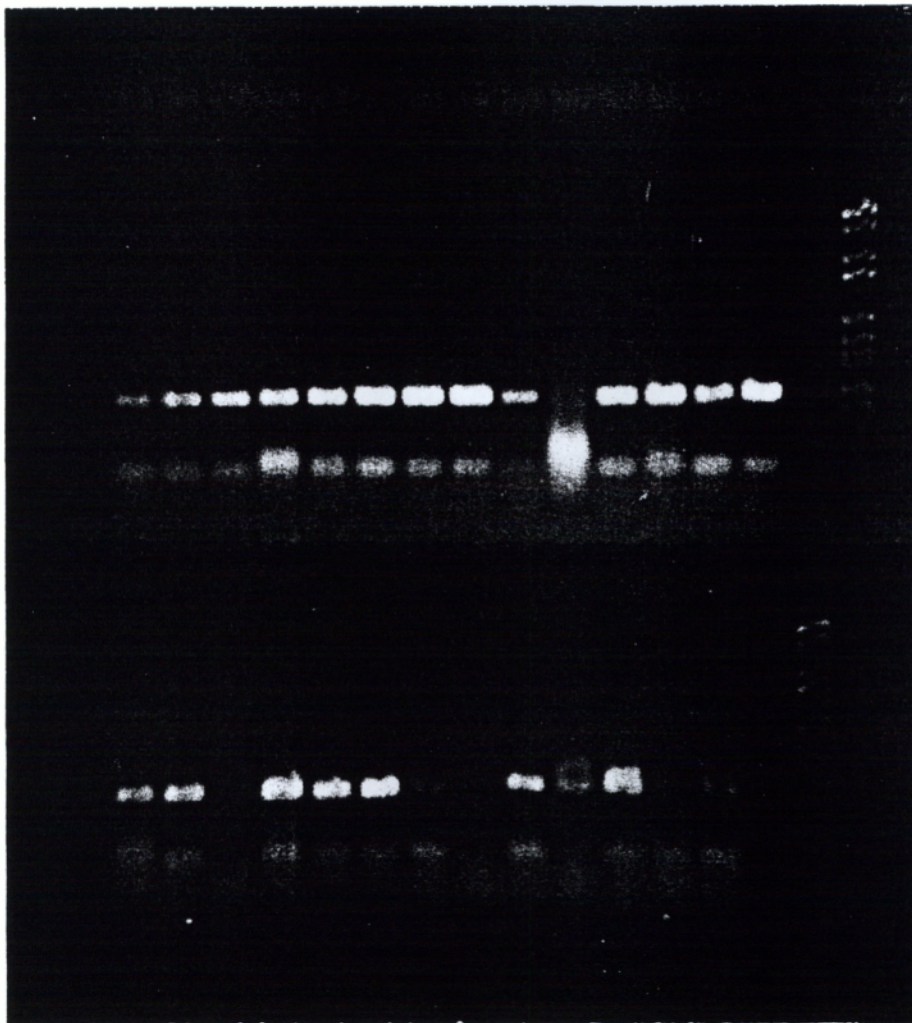
Απομονώσεις	Θετικός μάρτυρας	Αραιώση1/10	Αραιώση1/100	Αραιώση1/1000
BPIC 804	+	+	+	+
BPIC 806	+	+	+	+
BPIC 811	+	+	+	+
BPIC 813	+	+	+	+
BPIC 814	+	+	+	+
BPIC 820	+	+	+	+
BPIC 821	+	+	+	+
BPIC 825	+	+	+	+
BPIC 828	+	+	+	+
BPIC 829	+	+	+	+
BPIC 830	+	+	+	+
BPIC 831	+	+	+	+
BPIC 832	+	+	+	+
BPIC 1037	+	+	+	+
BPIC 1038	+	+	+	+
BPIC 1039	+	+	+	+
BPIC 1040	+	+	+	+
BPIC 2101	+	+	+	+
BPIC 2102	+	+	+	+
Τομάτα Πατρών	+	+	+	+

Παρατηρήθηκαν σε όλες τις αντικειμενοφόρες πλάκες με τις διαδοχικές αραιώσεις και σε όλους τους θετικούς μάρτυρες που υπήρχαν σε κάθε πλάκα με εμφανή παρουσία βακτήρια με ίδια χαρακτηριστική μορφή στην ίδια ένταση συνεπώς σε όλα τα δείγματα των απομονώσεων (πίνακας) έχουμε θετική παρουσία του φυτοπαθογόνου βακτηρίου *Ralstonia solanacearum* σύμφωνα με τη δοκιμή IF.

11) Αποτελέσματα μοριακών δοκιμών

ΔΟΚΙΜΗ PCR

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18



19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35

Όπως βλέπουμε παραπάνω πρόκειται για φωτογραφία η οποία έχει ληφθεί από ηχητή αгарόζης με το προϊόν της PCR των απομονώσεων του *Ralstonia solanacearum* μεγέθους 288bp. Το αποτέλεσμα για την ανίχνευση όλων των απομονώσεων πλην των (BRIC829, ΤΠ) είναι θετικό καθώς και η ταυτοποίηση ότι πρόκειται πράγματι για το βακτήριο *Ralstonia solanacearum* είναι θετική, τέλος ο υδατικός μας μάρτυρας είναι αρνητικός άρα τα αποτελέσματα της μεθόδου είναι έγκυρα. (Πίνακας. 18.) .

Πίνακας. 18. Αποτελέσματα δοκιμής PCR		
Θέση Φωτογραφίας	Απομονώσεις	Αποτελέσματα
1	Νερό	-
2	Νερό	-
3	BPIC 804	+
4	BPIC 806	+
5	BPIC 811	+
6	BPIC 813	+
7	BPIC 814	+
8	BPIC 820	+
9	BPIC 821	+
10	BPIC 825	+
11	BPIC 828	+ (ισχνό σήμα)
12	BPIC 829	-
13	BPIC1037	+
14	BPIC1038	+
15	BPIC1039	+
16	BPIC1040	+
17	Κενό	-
18	DNA MARKER	
19	Νερό	-
20	Νερό	-
21	BPIC2101	+
22	BPIC2102	+
23	ΤΠ	-
24	BPIC830	+
25	BPIC830	+
26	BPIC830	+
27	BPIC831	+ (ισχνό σήμα)
28	BPIC831	+ (ισχνό σήμα)
29	BPIC831	+
30	BPIC832	+ (ισχνό σήμα)
31	BPIC832	+
32	BPIC831	+ (ισχνό σήμα)
33	ΤΠ	+ (ισχνό σήμα)
34	Κενό	-
35	DNA MARKER	

Ανίχνευση και ταυτοποίηση του *Ralstonia solanacearum* από υψηλότερο σημείο βλαστού

Όπως είχαμε προαναφέρει υπήρχε και μια μελέτη κατά πόσο υπήρξε μεταφορά του βακτηρίου εντός του βλαστού των φυτών της κάθε απομόνωσης. Γι αυτό κάναμε και μια ακολουθία δοκιμών πάνω σε θρεπτικά υλικά (γραμμική εξάπλωση σε mSMA) , μέθοδο ανοσοφθορισμού (IF) , PCR, HR24h/ HR48 (μέθοδος υπερευαισθησίας καπνού σε 24 ώρες και 48) , , παθογένεια φυτών τομάτας.

Συνεχίσαμε λοιπόν το πείραμα μας και επαναλάβαμε τις δοκιμές από το σημείο μόλυνσης και από το υψηλότερο σημείο. Στο πίνακα που ακολουθεί βλέπουμε τα αποτελέσματα εάν ήταν θετικά η αρνητικά σε όλα τα φυτά και για τα δυο σημεία και με όλες τις μεθόδους που προείπαμε.

Σχετικά με τον πίνακα που ακολουθεί τα αποτελέσματα αναφέρονται και στα δυο φυτά που έχουμε μολύνει ανά απομόνωση και από υψηλότερο/χαμηλότερο σημείο. Τα διπλά πρόσημα εκφράζουν ανά απομόνωση όχι τα φυτά αλλά τα αποτελέσματα ανά χαμηλότερο-ψηλότερο σημείο μόλυνσης συγκεντρωτικά από τα φυτά της κάθε απομόνωσης καθώς ο διπλός αριθμός μολύνσεως έγινε ώστε να εξασφαλίσουμε αποτελέσματα μηδενίζοντας την πιθανότητα της μη προσβολής και του ανθρωπίνου λάθους.

Τέλος πρέπει να αναφέρουμε ότι χρονικά οι δοκιμές γίνονταν όταν τα φυτά απομακρύνονταν από το θερμοκήπιο άρα είχαν διαφορετικά χρονικά περιθώρια καθώς η ασθένεια είχε διαφορετική εκδήλωση ανά απομόνωση και φυτό. (Πίνακας. 19) .

Πίνακας. 19. Αποτελέσματα ανίχνευσης Rs από δύο σημεία του φυτού τομάτας

Απομονώσεις	Streaking	mSMA	HR24h	HR48h	IF	PCR	Παθογένεια φυτών τομάτας
BPIC 804	+	+	- -	+ +	++	++	+ +
BPIC 806	+	+	- -	+ +	++	++	+ +
BPIC 811	+	+	- -	+ +	++	++	+ +
BPIC 813	+	+	- -	+ +	++	++	+ +
BPIC 814	+	+	- -	+ +	++	++	+ +
BPIC 820	+	+	- -	+ +	++	++	+ +
BPIC 821	+	+	- -	+ +	++	++	+ +
BPIC 825	+	+	- -	+ +	++	++	+ +
BPIC 828	+	+	- -	+ +	++	++	+ +
BPIC 829	+	+	- -	+ +	++	++	+ +
BPIC 830	+	+	- -	+ +	++	++	+ +
BPIC 831	+	+	- -	+ +	++	++	+ +
BPIC 832	+	+	- -	+ +	++	++	+ +
BPIC 1037	+	+	- -	+ +	++	++	+ +
BPIC 1038	+	+	- -	+ +	++	++	+ +
BPIC 1039	+	+	- -	+ +	++	++	+ +
BPIC 1040	+	+	- -	+ +	++	++	+ +
BPIC 2101	+	+	- -	+ +	++	++	+ +
BPIC 2102	+	+	- -	+ +	++	++	+ +
Τομάτα Πατρών	+	+	- -	+ +	++	++	+ +

ΜΕΡΟΣ ΤΕΤΑΡΤΟ

**Συζητήσεις/Γενικά Συμπεράσματα μελετών δοκιμών
ανίχνευσης και ταυτοποίησης του βακτηρίου *Ralstonia*
solanacearum σε φυτά τομάτας ποικιλίας Contessa.**

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Δ

1) Συμπεράσματα:

• Στην μελέτη αυτή εξετάστηκαν διάφορες δοκιμές για την ανίχνευση και ταυτοποίηση του βακτηρίου της μάρανσης της τομάτας *Ralstonia solanacearum* από φυτά τομάτας ποικιλίας Contessa.

Οι απομονώσεις από τα φυτά στις εργαστηριακές μεθόδους μας έδωσαν τα εξής αποτελέσματα τα οποία εξακριβώθηκαν σε όλες τις απομονώσεις:

Καλή ανάπτυξη πάνω στα θρεπτικά υποστρώματα, αρνητική χρώση κατά Gram, παρατηρήθηκαν λοφώδη μαστίγια, θετικά στην παραγωγή οξειδάσης αρνητικά στην παραγωγή φθορίζουσας χρωστικής, παρατηρήθηκαν σουδανοφιλικά έγκλειστα, κατατάχθηκαν ως βιότυπος 2 φυλής 3 αρνητικά στην ευαισθησία καπνού εντός 24h θετικό εντός 48h, με παθογένεια σε φυτά τομάτας, θετικό στην μέθοδο ανοσοφθορισμού, και θετικά στην PCR.

Πίνακας 20. Συγκεντρωτικά αποτελέσματα δοκιμών

Απομ νώσεις	Θρεπ. υλικά	Gram	Χρώση μαστιγίων	Οξειδά ση	Φθορ. Χρω στική	Σουδαν. εγκλει στ.	Κατάταξη βιοτύπου	Hr24h	Hr48h	Παθ. τομ.	IF	PCR
BPIC804	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+
BPIC806	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+
BPIC811	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+
BPIC813	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+
BPIC814	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+
BPIC820	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+
BPIC821	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+
BPIC825	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+
BPIC828	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+
BPIC829	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+
BPIC830	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+
BPIC831	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+
BPIC1037	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+
BPIC1038	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+
BPIC1039	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+
PIC1040	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+
BPIC2101	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+
BPIC2102	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+
Τομ. Πατρ.	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+

2) Συζητήσεις/συμπεράσματα μελέτης

- Σε σχέση με το σημείο μόλυνσης είδαμε ότι το βακτήριο ανιχνεύτηκε και ταυτοποιήθηκε σε υψηλότερα σημεία των φυτών άρα είχαμε μετακίνηση του βακτηρίου εντός των ιστών.

Χρονικά λοιπόν πιο έντονα συμπτώματα συνεπώς και παθογένεια είχαν οι απομονώσεις 804, 811, 829, 2101, 2102 εντός 4 ημερών.

Ακολούθησαν οι απομονώσεις 806, 813, 820, 821, 825, 829, 830, 831, 832, 1037, 1038, 1039, 1040, τομάτα Πατρών όπου εκδηλώθηκαν εντός 7 ημερών.

Τέλος ακολούθησε η απομόνωση 814 εντός 9 ημερών

- Από τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης διαπιστώθηκε ότι το βακτήριο *Ralstonia solanacearum* μπορεί να ανιχνευθεί με διάφορες δοκιμές. Η πλέον αξιόπιστη διαδικασία πρέπει να συνδυάζει περισσότερες της μίας μεθόδους όπως:

α) Μία ταχεία μέθοδο αρχικής ανίχνευσης όπως είναι η δοκιμή IF ή η δοκιμή PCR.

β) Μια δοκιμή ταχείας απομόνωσης

γ) Δοκιμές ταυτοποίησης (Παθογένεια, IF, κ. α.)

Η ταχεία και αξιόπιστη διάγνωση είναι επιτακτική για την διευκόλυνση του εμπορίου φθαρτών προϊόντων, όπως η πατάτα και η τομάτα καθώς και για τους προβλεπόμενους από την κοινοτική νομοθεσία ελέγχους τόσο εντός της χώρας, όσο και επί των εισαγομένων προϊόντων. Οι έλεγχοι αυτοί επεκτείνονται πέραν των ως άνω φυτών, σε άλλους ξενιστές (μελιτζάνα, κ. α.) σε ζιζάνια και επιφανειακά νερά.

Παράρτημα θρεπτικών υλικών για την απομόνωση και καλλιέργεια της *Ralstonia solanacearum*

S. P. A.

Για διατήρηση *Ralstonia solanacearum*

Sucrose (B. D. H., Ltd Laboratory reagent)	20gr
Peptone (oxid, Ltd, London)	5. gr
Dipotassium hydrogen phosphate (K_2HPO_4)	0. 5gr
Crystalline magn. Sulphate ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0. 25 gr
Agar	20.. gr
Distilled water	1000. cc
PH: 7. 2 – 7. 4 (with 40% NaOH)	

N. A. - Difco

Nutrient Agar – Difco

Nutrient broth (Difco)	0. 8 %
Bacto – Agar (Difco)	2%

N. A. - Oxoid

Nutrient Agar – Oxoid

Nutrient broth (oxid)	1. 3 %
Agar (Technical N° 3) (oxid)	1. 2 %

N. A. D. - Oxoid

Nutrient Agar – Dextrose

Nutrient Broth	1. 3 %
Agar Teghical No 3	1. 2 %
Dextrose.....	8%

N. A. G.

Nutrient Glycerol – Agar – Difco

Nutrient broth (Difco)	0.8 %
Glycerol	2%
Agar..... (Difco)	2%

N. A. S.

(Nutrient Sucrose Agar) – Difco

Nutrient broth..... (Difco)	0.8 %
Sucrose	5%
Bacto – Agar..... (Difco)	2%

Y. P. G. A.

Yeast extract (Difco)	0.5 %
Peptone (Difco)	0.5 %
Glucose	1 %
Agar..... (Difco)	1.5 %
H ₂ O...	100 ml

King's B

Παραγωγή φθορίζουσας στο UV

Proteose peptone N° 3 (Difco)	2%
Glycerol.....	1%
K ₂ HPO ₄	0.15 %
MgSO ₄ . 7H ₂ O.....	0.15 %
Agar.. (Difco)	2. %

PH: 7.2

ΚΥΚΛΟΞΕΑΜΙΔΗ

Cycloheximide (SIGMA) από *Streptomyces griseus* αναλογία 2% σε απεσταγμένο νερό

S. M. S. A.

Για το *Ralstonia Solanacearum*

Cosamino acids (Difco)1 gr
Bacto peptone (Difco)10 gr
Γλυκερίνη..... 5 ml
Agar (Difco) 15 gr

PH: 6.5

Μετά την αποστείρωση προστίθεται:

		K. A. SIGMA	STOCK	ANA 100 ml
Crystal violet	5 mg / lit	(C-3886)	50 mg / 10 ml	100 µl / 100 ml
Θετική πολυμιξίνη Β	100 mg / lit	(P-4932)	1000 mg / 10 ml	100 µl / 100 ml
Bacitracin	25 mg / lit	(B-0125)	250 mg / 10 ml	100 µl / 100 ml
Chloramphenicol	5 mg / lit	(C-3175)	50 mg / 10 ml	100 µl / 100 ml
Penicillin G	0.5 mg / lit	(P-3032)	5 mg / 10 ml	100 µl / 100 ml
Άλατα Τετραζολίου (T. T. C.)	50 mg / lit	(T-8877)	500 mg / 10 ml	100 µl / 100 ml

m. S. M. S. A.

Για το *Ralstonia solanacearum*

Πρόκειται περί της ίδιας συνταγής με αυτή του S. M. S. A με διαφοροποίηση στην Bacitracin όπου έχουμε 30mg/lit αντί για 25mg/lit όπου έχουμε στο S. M. S. A.

ΠΡΟΣΑΡΤΗΜΑ1
Υλικό παραγωγής σουδανοφιλικών εγκλείστων

A

NH ₄ H ₂ PO ₄	0. 05%
MgSO ₄ . 7H ₂ O.....	0. 02 %
KCl.....	0. 02%
Glucose.....	5..... %

B

NH ₄ H ₂ PO ₄	0. 1.... %
KCl.....	0. 02 %
MgSO ₄ . 7H ₂ O.....	0. 02 %
B. Hydroxybutyric acid.....	0, 05%

PH: για (B) 6, 8

Υλικά χρώσης μαστινίων

Χρησιμοποιούμενα αντιδραστήρια και παρασκευή αυτών.

a) Χρωστική PLIMMER'S

Αυτή συνίσταται από:

Tannic acid	20 γραμ.
AlCl ₃ 6H ₂ O	36 γραμ.
ZnCl ₂	20 γραμ.
Basic fuchsin	3 γραμ.
Ethanol (60%)	80 κυβ. εκατ.

Λιώνουμε τα στερεά συστατικά μαζί σε ένα γουδί και προσθέτουμε την αλκοόλη και ανακινούμε μέχρι πλήρους διαλύσεως αυτών. Πριν χρησιμοποιηθεί σύμφωνα με αυτόν τον τρόπο η παρασκευασθείσα χρωστική, αραιώνουμε με νερό (απεσταγμένο) σε αναλογία 1 μέρος χρωστικής σε 4 μέρη νερού και διηθούμε 2-3 φορές με φίλτρο WATHMAN N^o 4.

- β) Προσηλωτικό KIRKPATRICK'S.
Αυτό έχει την παρακάτω σύνθεση:

Απόλυτος αλκοόλη	60	κυβ. εκατ.
Χλωροφόρμιο	30	κυβ. εκατ.
Formaldehyde (40%) διάλυμα	10	κυβ. εκατ.

- γ) CARBOL – FUCHSIN (αραιά)

Αραιώνουμε την CARBOL – FUCHSIN, STRONG 15 φορές μέσα σε απεσταγμένο νερό.

ΠΡΟΣΑΡΤΗΜΑ2
Υλικά για την δοκιμή IF

Ρυθμιστικό διάλυμα IF: φυσιολογικός ορός με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων 10mM (PBS) , pH7, 2.

Το εν λόγω ρυθμιστικό διάλυμα χρησιμοποιείται για την αραιώση των αντιορών.

Na ₂ HPO ₄ 12H ₂ O.....	2, 7g
NaH ₂ PO ₄ 2H ₂ O.....	0, 4g
NaCl.....	8, 0g
Αποσταγμένο νερό.....	1lt

Διαλύονται τα συστατικά και ελέγχεται η τιμή του pH. Κατανέμονται κατάλληλες ποσότητες ανάλογα με τις ανάγκες.

Το διάλυμα αποστειρώνεται σε αυτόκαστο στους 121°C επί 15 λεπτά.

Ρυθμιστικό διάλυμα IF-TWEEN

Το εν λόγω ρυθμιστικό διάλυμα χρησιμοποιείται για το πλύσιμο των πλακών. Προστίθεται 0, 1%Tween20 στο ρυθμιστικό διάλυμα IF.

0, 1M φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα γλυκερίνης, pH 7, 6

Αυτό το ρυθμιστικό διάλυμα χρησιμοποιείται ως ρευστό προσήλωσης στα φατνία της πλάκας της IF για την ενίσχυση του φθορισμού.

Na ₂ HPO ₄ 12H ₂ O.....	3, 2g
NaH ₂ PO ₄ 2H ₂ O.....	0, 15g
Γλυκερίνη.....	50ml
Αποσταγμένο νερό.....	100ml

Αντιορός *Ralstonia solanacearum*

Πολυκλωνικό αντίσωμα από κουνέλι από την συλλογή του Μ. Φ. Ι. αραιωμένο σε αναλογία 1: 800 με PBS (0, 01M) .

F. I. T. C.

F. I. T. C. Conjugate (SIGMA) Αραιώση 1: 50 με PBS (0, 01M)

ΠΡΟΣΑΡΤΗΜΑ3
Υλικά για την δοκιμή PCR

Ακολουθία ολιγονουκλεοτιδίων εκκινήτων:

Εκκινήτης OLI-1

5'GGGGGTAGCTTGCTACCTGCC-3'

Εκκινήτης Y-2

5'CCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGT-3'

Βιβλιογραφία

- Beuningen, Janse, Kempenaau Beuningen Verdel, Wenneket European Journal of Plant Pathology 1999 105: 3, 307-315 25 ref.
- Chatterjee, Mukherjee, Khatra Journal of Interacademia 1997 1: 1, 97-99: 7 ref.
- Dijk, Wenneket, Groenereld, Kempenaar Report Resesarch Institute for Agrobiolology and soil fertility 1999 No 100, 29pp8 ref.
- Elphistone, Stanford, Stead Bulletin depp. 1998, 28: 1-2, 93-94
- Farag, Stead, Janse Journal of phytopathology 1999, 147: 7-8, 485-487: 10ref.
- Granada, Sequeira 1983 Survival of *Ralstonia solanacearum* at low temperatures Fitopatologia 18: 22-24
- Hayward A.C. (1964) . J. Appl. Bact. 27 (2) , 265-277.
- Hayward A.C. (1994) . Bacterial wilt: The disease and its causative agent, *Pseudomonas solanacearum*, by A.C. Hayward, G.L. Hartman, 1994, 123-133.
- Janse Bulletin-Depp. 1996 26: 3-4, 679-695: 109 ref
- Jatala, Martin, Mendoza 1988 Role of nematodes in disease expression of *Ralstonia solanacearum* and strategies for screening and breeding for combined resistance Ref. 61, pp. 35-37
- Kelman 1953 The bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum* NC Agric. Exp. Sta. Tech. Bull. 99. 194pp.
- Krausz, Thrurston 1975 Breakdown of resistance to *Ralstonia solanacearum* in tomato. Phytopathology 65: 1272-74
- Moffet, Gilles, Wood, 1983 Survival of *Ralstonia solanacearum* biovars 2, 3 in soil Soil Biol. Biochem 15: 587-91
- Nesmith, Jenkins 1985 Influence of antagonists and controlled matric potential on the survival of *Ralstonia solanacearum* in 4 Carolina soils. Phytopathology 75: 1182-87.
- Seneviratne 1988 Soil survival of *Ralstonia solanacearum*_ref. 61 pp. 85-91

- Seneviratne 1988, Ono, 1983 Ecological studies on the bacterial wilt of tobacco, caused by *Ralstonia solanacearum* Bull. Okayama Tob. Exp. Stn. 42: 139-47
- Sequeira 1962 Control of bacterial wilt of banana by crop rotation and fallowing. Trop. Agric. (Trinidad) 39: 211-217
- Sequeira, rowe1969 Selection of *Solanum phureja* resistance to *Ralstonia solanacearum*. Potato J. 46: 451-62
- Shamahar, Chakraborty, Kanjilal, Journal of Mycopathological Research 1998 36: 2, 51-58: 18 ref.
- Sunaina. Kishore, Shekhawat1989 Latent survival of *Ralstonia solanacearum* in potato tubers and weeds Pflanzenkr. Pflanzenschutz 96: 361-64
- Tung, Rasco, Vander, Zaag, Schmiedidche. 1990 Resistance to *Ralstonia solanacearum* in potatoe II. Euphytica 45: 211-15
- Wenneker, Verdel, Janse, Icmpeenaar University-Gent 1999, 64: 36, 573-582 20ref.
- Αλιβιζάτος, Α. Σ., Π. Γλυνός, Χ. Καραφλα, Σ. Δρακούλης. 1994. Διαπίστωση του βακτηρίου *Pseudomonas solanacearum* σε δείγματα κονδύλων πατάτας εισαγωγής από Αίγυπτο. 7^ο Πανελλήνιο Φυτοπαθολογικό Συνέδριο, Αθήνα 8-10 Νοεμβρίου 1994
- Ελληνική Φυτοπαθολογική Εταιρία (1984) . Λεξικό φυτοπαθολογικών όρων. Αθήνα
- Παναγόπουλος Χ. Γ. (2000) Ασθένειες κηπευτικών καλλιεργειών'κεφ2 σελ113-117