

Βιολογία

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ  
ΚΑΛΑΜΑΤΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΩΝ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ

ΜΕΛΕΤΗ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ ΤΟΜΑΤΑΣ  
ΚΑΙ ΑΛΛΩΝ ΦΥΤΩΝ ΤΗΣ ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΣ *Solanaceae*  
ΣΤΟ ΒΑΚΤΗΡΙΟ *Ralstonia (Pseudomonas) solanacearum*

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ  
ΚΟΥΚΟΓΙΑΝΝΗ ΒΑΣΙΛΕΙΟΥ

ΕΙΣΗΓΗΤΗΣ : ΜΑΝΩΛΟΠΟΥΛΟΥ ΕΛΕΝΗ

ΚΑΛΑΜΑΤΑ 2001

Η παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε κατά την διάρκεια της πρακτικής μου άσκησης στο Εργαστήριο Βακτηριολογίας του Τμήματος Φυτοπαθολογίας του Μπενακείου Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου.

Ευχαριστώ τον Δρα.Αλιβιζάτο Αθανάσιο βακτηριολόγο Προϊστάμενο του Εργαστηρίου Βακτηριολογίας, ιευθυντή του Μ.Φ.Ι. και επιστημονικό επιβλέποντα στην πρακτική μου άσκηση.Χάρη στην καθοδήγηση του ήταν δυνατή η διεξαγωγή των πειραματικών δοκιμών,διαφόρων επιστημονικών μεθόδων που εφαρμόστηκαν καθώς και ο σωστός έλεγχος των αποτελεσμάτων.Επίσης τον ευχαριστώ για τις υποδείξεις του στη σύνταξη της παρούσης μελέτης.

Παράλληλα θα ήθελα να ευχαριστήσω την κ.Μανωλοπούλου Ελένη,Προϊστάμενο του τμήματος Φ.Π. εισηγήτρια της παρούσης πτυχιακής μελέτης,για την πολύτιμη συμβολή της στην τελική διαμόρφωση της ,την σύνταξη του κειμένου και την παροχή πληροφοριών σχετικά με το θέμα.

Ευχαριστώ επίσης τον κ.Γλυνό Παρασκευά ,τεχνολόγο γεωπόνο,για την βοήθεια και τις συμβουλές του στην διεξαγωγή των πειραματικών δοκιμών και στην εξαγωγή και επεξεργασία των αποτελεσμάτων.

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

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

### ΜΕΡΟΣ ΠΡΩΤΟ

#### Το *Ralstonia solanacearum* ως φυτοπαθογόνο

	Σελίδα
1.1 Γενικά	6
1.2 Ιστορική αναδρομή	6
1.3 Μορφολογία-Συνθήκες ανάπτυξης	7
1.4 Χαρακτηριστικά Ελληνικών απομονώσεων	9
1.5 Συμπτώματα-Ζημιές	9
1.6 Μέθοδοι αντιμετώπισης	11

### ΜΕΡΟΣ ΔΕΥΤΕΡΟ

#### 1. Μελέτη επίδρασης διαφόρων συγκεντρώσεων του βακτηρίου *Ralstonia solanacearum* στην εκδήλωση συμπτωμάτων και ασθένειας σε φυτά τομάτας ποικιλίας AR-100

1.1 Περίληψη	14
1.2 Υλικά-Μέθοδοι	14
1.2.1. Συνθήκες ανάπτυξης των φυτών	15
1.2.2 Λήψη αιωρήματος βακτηρίου	15
1.2.3 Τεχνητές μολύνσεις	17
1.2.3.1 Μόλυνση με σχισμή	18
1.2.3.2 Μόλυνση σε τομή μίσχου στελέχους	18
1.2.3.3. Μόλυνση με ένεση αιωρήματος (injection)	18

1.3 Αποτελέσματα	19
1.4 Συμπεράσματα	27

## **2. Μελέτη ανθεκτικότητας φυτών τομάτας διαφορετικών ποικιλιών στο *Ralstonia solanacearum***

2.1 Περίληψη	30
2.2 Υλικά-Μέθοδοι	30
2.2.1. Συνθήκες ανάπτυξης των φυτών	30
2.2.2 Λήψη αιωρήματος βακτηρίου	31
2.2.3 Τεχνητές μολύνσεις	32
2.3 Αποτελέσματα	33
2.4 Συμπεράσματα	35

## **3. Μελέτη ανθεκτικότητας δέκα ποικιλιών φυτών πατάτας στο *Ralstonia solanacearum***

3.1 Περίληψη	38
3.2 Υλικά-Μέθοδοι	38
3.2.1. Συνθήκες ανάπτυξης των φυτών	38
3.2.2 Λήψη αιωρήματος βακτηρίου	39
3.2.3 Τεχνητές μολύνσεις	40
3.3 Αποτελέσματα	40
3.4 Συμπεράσματα	43

**4.Μελέτη ανθεκτικότητας φυτών της Οικογένειας Solanaceae**  
**στο *Ralstonia solanacearum***

4.1 Περίληψη	45
4.2 Υλικά-Μέθοδοι	45
4.2.1. Συνθήκες ανάπτυξης των φυτών	45
4.2.2 Λήψη αιωρήματος βακτηρίου	46
4.2.3 Τεχνητές μολύνσεις	47
4.3 Αποτελέσματα	48
4.4 Συμπεράσματα	50
<b>ΓΕΝΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b>	<b>51</b>
<b>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΥΛΙΚΩΝ</b>	<b>53</b>
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b>	<b>55</b>

## **ΜΕΡΟΣ ΠΡΩΤΟ**

Το *Ralstonia solanacearum* ως φυτοπαθογόνο

## 1.ΓΕΝΙΚΑ

Το βακτήριο *Ralstonia solanacearum* προκαλεί στην τομάτα την ασθένεια “βακτηριακή μάρανση” (Bacterial wilt) και στην πατάτα την ασθένεια “καστανή σήψη” (Brown rot). Η ασθένεια επισημάνθηκε για πρώτη φορά στις Η.Π.Α. από τον Burrill το 1890 σε κονδύλους πατάτας. Είναι η πιο σοβαρή βακτηριακή ασθένεια στις τροπικές και υποτροπικές περιοχές και γενικότερα σε περιοχές γεωγραφικού πλάτους από 40<sup>0</sup>B έως 40<sup>0</sup>N. Ευνοείται ιδιαίτερα σε αλκαλικά εδάφη και περιοχές με μεγάλο βροχομετρικό ύψος ομοιόμορφα κατανεμημένο καθ όλη τη διάρκεια του έτους (Kolman 1953). Στελέχη της φυλής 3 του βακτηρίου προκαλούν την ασθένεια στην τομάτα και στην πατάτα στην Ευρώπη. Το βακτήριο προσβάλλει πολλά είδη φυτών τα οποία ανήκουν σε πάνω από 150 οικογένειες.

## 2.ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ

Υπάρχουν συνεχείς και αυξανόμενες ενδείξεις και στοιχεία σύμφωνα με τα οποία το *Ralstonia solanacearum* είναι αρχαίο ομοιογενές είδος στη γεωλογική ιστορία ως φυτοπαθογόνο των προγόνων των σημερινών φυτών, το οποίο ελάχιστα συνδέεται με άλλα φυτοπαθογόνα βακτήρια ακόμα και του είδους του. Απομονώσεις του βακτηρίου δείχνουν ότι είναι προϊόν μίας μακράς εξέλιξης η οποία πραγματοποιήθηκε ανεξάρτητα σε διαφορετικές γεωγραφικά περιοχές σε όλο τον κόσμο. Από μελέτες διακοσίων διαφορετικών απομονώσεων (Cook & Sequeira 1980) έγινε γνωστό ότι διαχωρίζονται γεωγραφικά σε δύο διαφορετικούς πληθυσμούς του παλαιού και νέου κόσμου.

Η παράλληλη εξέλιξη διαφορετικών απομονώσεων σε δυο περιοχές στη Musa(Ασία) και Helikona(Καραϊβική) είχε ως αποτέλεσμα την δημιουργία απομονώσεων υψηλής παθογένειας στη μπανάνα. Τρεις απομονώσεις που ελήφθησαν από φυτά πατάτας σε όλο τον κόσμο βρέθηκε ότι είχαν κοινή καταγωγή από την Ινδονησία.

Απομονώσεις του βακτηρίου έχουν εντοπισθεί σε παρθένα εδάφη πλήττοντας γηγενή φυτά σε λιβάδια της κεντρικής Αμερικής , Φλώριδας ,Ινδονησίας γεγονός που δείχνει ότι το βακτήριο προϋπήρχε σε αυτές τις περιοχές για αιώνες.

### **3.ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ-ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ**

Το παθογόνο έχει πολλά είδη φυτών ξενιστών τα οποία ανήκουν σε διαφορετικές οικογένειες. Από την οικογένεια Solanaceae προσβάλλει την πατάτα, τομάτα, καπνό, μελιτζάνα, πιπεριά και από την οικογ. Musaceae την μπανάνα καθώς επίσης και μέλη των οικογ. Compositae-Leguminosae. Υπάρχουν τρεις φυλές του *Ralstonia solanacearum* (Buddenhagen 1962) βάση της παθογένειας τους σε φυτά ξενιστές. Οι απομονώσεις της φυλής 1 έχουν μεγάλο εύρος ξενιστών και προσβάλλουν τη τομάτα, καπνό, σολανώδη καθώς και την διπλοειδή μπανάνα ενώ απομονώσεις της φυλής 2 προσβάλλουν την τριπλοειδή μπανάνα. Οι απομονώσεις της φυλής 3 έχουν μικρότερο εύρος ξενιστών από της 1<sup>ης</sup> προσβάλλοντας τα Σολανώδη αλλά δεν είναι υψηλής παθογένειας εκτός από την τομάτα, πατάτα. Μεταγενέστερα διαπιστώθηκε η ύπαρξη 4<sup>ης</sup> φυλής (Heetal 1983) απομονώσεις της οποίας προσβάλλουν τη μουριά και εμφανίζει μειωμένη παθογένεια στη τομάτα, πατάτα, μελιτζάνα ενώ δεν προσβάλλει τον καπνό.



Βάση φυσιολογικών και βιοχημικών χαρακτηριστικών (Hayward 1964) τα στελέχη του βακτηρίου κατατάχθηκαν σε τέσσερις βιότυπους ενώ μεταγενέστερα προστέθηκε και ένας πέμπτος για τις απομονώσεις που ανήκουν στη τέταρτη φυλή.(Heetal 1983).

Το βακτήριο είναι αερόβιο,κινείται με ένα έως τέσσερα πολικά μαστίγια και είναι αρνητικό κατά Gram.Παράγει οξειδάση και σε θρεπτικό υπόστρωμα σχηματίζει υπόλευκες επίπεδες κυκλικές αποικίες.Έχει ελάχιστη θερμοκρασία ανάπτυξης 10<sup>0</sup>C,μέγιστη 41<sup>0</sup>C και άριστη 35<sup>0</sup>-37<sup>0</sup>C.

Στην Ελλάδα η ασθένεια περιγράφηκε για πρώτη φορά στην περιφέρεια της Αμφίσσης το 1951 (Ζάχος 1962) και το παθογόνο βακτήριο απομονώθηκε για πρώτη φορά στην Ελλάδα από τον Ζάχο(1957) από κονδύλους πατάτας στην περιοχή της Μεσσήνης και σε φυτά πατάτας από τον Αυλώνα.Στην Κρήτη καταγράφηκαν συμπτώματα της ασθένειας από τον κ.Μαλαθράκη σε φυτά τομάτας όπως και στη Βοιωτία από τους κ.Παναγόπουλο-Ψαλλίδα στις αρχές της δεκαετίας του 70.(Ψαλλίδας 1989)

Στην πατάτα και τομάτα η βακτηριακή μάρανση δεν θεωρείτο σοβαρή φυτοπαθολογική ασθένεια μέχρι το 1984 οπότε και συνέβη ένα σοβαρό περιστατικό σε φυτά τομάτας και μελιτζάνας τα οποία καλλιεργούντο στη Λακωνία στην ύπαιθρο καθώς επίσης και σε φυτά τομάτας στην περιοχή της Ηλίας τα οποία καλλιεργούντο σε θερμοκήπια.(Ψαλλίδας 1989)

#### **4.ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΕΛΛΗΝΙΚΩΝ ΑΠΟΜΟΝΩΣΕΩΝ**

Οι Ελληνικές απομονώσεις ανήκουν στη φυλή 3(Buddenhagen-Kelman) και στο βιότυπο 2(Hayward).Ο καθορισμός της φυλής βασίστηκε στην παθογένεια των Ελληνικών απομονώσεων στα φυτά.Ο βιότυπος προσδιορίστηκε με τη χρησιμοποίηση του βακτηριοφάγου B 1114 P(Hayward 1964)(Psallidas 1989).

Οι Ελληνικές απομονώσεις έχουν περιορισμένο κύκλο ξενιστών και προσβάλλουν κυρίως την πατάτα,τομάτα,μελιτζάνα. Το κόστος των ζημιών στα παραπάνω Σολανώδη είναι αρκετά μεγάλο και συνεχώς αυξανόμενο διότι συνοδεύεται συνήθως από την ολοκληρωτική απώλεια της παραγωγής, και την αδυναμία επαναχρησιμοποίησης του μολυσμένου εδάφους και απαγόρευση ή αυστηρώς περιορισμός στη διάθεση μολυσμένων προϊόντων.

#### **5.ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΑ-ZΗΜΙΕΣ**

Τα προσβεβλημένα φυτά εμφανίζουν απώλεια σπαργής στα φύλλα με τη μορφή ελαφρού μαρασμού,ο οποίος με την πάροδο των ημερών γενικεύεται σε όλο το φυτό και γίνεται εμφανής κυρίως κατά τις θερμότερες ώρες της ημέρας.Σύντομα ο μαρασμός γίνεται καθολικός και το φυτό ξεραίνεται.Σε κάποιες περιπτώσεις φυτών παρατηρείται καστανός μεταχρωματισμός των αγγείων του ξύλου ο οποίος,σε φυτά κυρίως τομάτας,καλύπτει όλο το βλαστό.Αντίθετα σε φυτά μελιτζάνας ο μεταχρωματισμός περιορίζεται στη βάση του βλαστού.Η γενικευμένη μάρανση και η απουσία των ελκών διαφοροποιεί στην τομάτα τη βακτηριακή μάρανση από το βακτηριακό έλκος.

Το μεταφέρεται σε αμόλυντες περιοχές κυρίως με μολυσμένους κονδύλους πατάτας,μολυσμένα φυτά τομάτας και μολυσμένα

επιφανειακά ύδατα. Η διασπορά του παθογόνου γίνεται με τα εργαλεία τεμαχισμού των κονδύλων. Μεταφορά του παθογόνου γίνεται επίσης μέσω του νερού ποτίσματος κυρίως σε υπαίθριες καλλιέργειες οι οποίες ποτίζονται με αυλάκια. Τέλος με έντομα του εδάφους τα οποία προκαλούν πληγές στο ριζικό σύστημα των φυτών. Η υψηλή ατμοσφαιρική υγρασία αυξάνει το βαθμό διάδοσης του παθογόνου όπως επίσης η υψηλή εδαφική θερμοκρασία στις ρίζες των φυτών ευνοεί τον πολλαπλασιασμό του. Το βακτήριο μπορεί να διαιωνίζεται σε αγρούς μέσω του ριζικού συστήματος φυτών (κυρίως ζιζανίων) τα οποία είναι φυσικοί ξενιστές του και μπορεί να μην εμφανίζουν συμπτώματα. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το *Solanum dulcamara* το οποίο αναπτύσσεται στις όχθες ποταμών και μεταδίδει το βακτήριο μέσω του νερού από το ριζικό του σύστημα. Κατά την διάρκεια πειραμάτων σε ποταμούς της Ολλανδίας (WENNEKER, VERDEL, KEMPENAR, JANSE 1995) διαπιστώθηκε ότι υψηλότερες συγκεντρώσεις του βακτηρίου (κοντα σε όχθες ποταμών όπου ευδοκμεί το *Solanum dulcamara*) καταγράφονται κατά την διάρκεια του καλοκαιριού. Τον χειμώνα και νωρίς την άνοιξη οι πληθυσμοί είναι εξαιρετικά χαμηλοί. Μια ραγδαία αλλά ανεξήγητη αύξηση των πληθυσμών παρατηρείται όταν η θερμοκρασία του νερού ξεπεράσει την άνοιξη τους 15<sup>0</sup> C. (Wenneker ,Verdel ,Kempenaar ,Janse 1999)

Στα φυτά πατάτας το πρώτο ορατό σημάδι της ασθένειας είναι η μάρανση των φύλλων στην κορυφή του φυτού κατά τις θερμές ώρες της ημέρας η οποία εξαφανίζεται κατά τις νυχτερινές ώρες. Στη συνέχεια προκαλείται καθολικός μαρασμός και η ξήρανση του φυτού. Ένας εκτεταμένος καφέ μεταχρωματισμός των αγγείων του ξύλου μπορεί να εμφανιστεί με μορφή γραμμών ή ζωνών κατά μήκος του βλαστού οι οποίες ξεκινούν από τη βάση του φυτού. Αν ο βλαστός κοπεί κάθετα

εξέρχεται λευκή βακτηριακή εξίδρωση η οποία είναι περισσότερη αν πιστεΐ.Μολυσμένα φυτά πατάτας με εμφανή εξωτερικά συμπτώματα είναι δυνατό να παράγουν τόσο μολυσμένους όσο και μη μολυσμένους κονδύλους.

Στους κονδύλους ένα πρώτο σύμπτωμα της ασθένειας είναι η καστανή νέκρωση της εντεριώνης που γίνεται ορατή κόβοντας τον κόνδυλο δια μέσου του σημείου πρόσφυσης του με το στολώνιο.Αργότερα ένα πηκτό λευκό υγρό εξέρχεται αυτού.Η νεκρωτική περιοχή,χρώματος συνήθως καφέ,μπορεί να εξαπλωθεί στο παρέγχυμα έως 0,5cm από την κάθε πλευρά του δακτυλίου.Τα παραπάνω συμπτώματα εμφανίζουν κάποια παραλλακτικότητα η οποία εξαρτάται κυρίως από την ποικιλία καθώς και από την απομόνωση του βακτηρίου.

## **6.ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗΣ**

Προληπτικά συνίσταται η φύτευση υγιών κονδύλων ή φυτών από αμόλυντα σπορεία.Στην περίπτωση της πατάτας να αποφεύγεται ο τεμαχισμός των κονδύλων και αν δεν είναι δυνατή να γίνεται απολύμανση των εργαλείων κοπής.Επίσης πρέπει να γίνεται έλεγχος του νερού άρδευσης καθώς επίσης και η καλή αποστράγγιση του εδάφους.Ακόμη προτείνεται η αμειψισπορά παράλληλα με ηλιοαπολύμανση ή χημική απολύμανση σε ύποπτες περιοχές.

Η καταπολέμηση της ασθένειας μετά την εμφάνιση συμπτωμάτων είναι δύσκολη έως αδύνατη.Γίνεται εξαγωγή των προσβεβλημένων φυτών έτσι ώστε να μην μεταδοθεί η ασθένεια και στα υγιή φυτά.Αν ο αριθμός των προσβεβλημένων φυτών είναι μικρός περιορίζεται η εξάπλωση της ασθένειας,στην αντίθετη περίπτωση τα συμπτώματα γενικεύονται σε όλη την καλλιέργεια.

Ανθεκτικές ποικιλίες φυτών,παρόλο που έχουν βρεθεί,δεν μπορούν να λύσουν το πρόβλημα εξαιτίας των πολλών και διαφορετικών απομονώσεων του

βακτηρίου.Ακόμη δημιουργείται πρόβλημα στην επαναχρησιμοποίηση ενός αγρού στον οποίο έχει διαπιστωθεί η ύπαρξη του βακτηρίου.Πρόσφατες πειραματικές μελέτες (Pradhanang,Elphinstone 2000) έδειξαν ότι μεγάλοι πληθυσμοί του βακτηρίου μετρήθηκαν σε αγρό του Nepal (1995) δυο χρόνια μετά την τεχνητή μόλυνση φυτών σε αυτόν και αφού είχε προηγηθεί επιφανειακή απολύμανση. Επίσης ενώ έχει βρεθεί ένας μεγάλος αριθμός μικροοργανισμών οι οποίοι αναστέλλουν ή περιορίζουν την ανάπτυξη του βακτηρίου εργαστηριακά,δεν έχουν δώσει θετικά αποτελέσματα στον αγρό. Τα τελευταία χρόνια μέσο ερευνών και της Γενετικής Μηχανικής (FREY ,PRIOR ,TRIGALET ,MARIE 1990) βρέθηκε ότι είναι δυνατός ο βιολογικός έλεγχος του *Ralstonia solanacearum* χρησιμοποιώντας μη παθογόνες γενετικά τροποποιημένες απομονώσεις.Τρεις ισχυρά παθογόνες απομονώσεις του *Ralstonia solanacearum* μεταφέρθηκαν σε μη παθογόνες απομονώσεις.(TRIGALET, TRIGALET-DEMERY 1990).Οι απόγονοι αυτών δοκιμάστηκαν για τον έλεγχο της Βακτηριακής μάρανσης σε φυτά τομάτας (ποικ. Floradel) σε θερμοκήπιο.Με τεχνητή μόλυνση στη ρίζα των φυτών βρέθηκε ότι έπληξαν το βλαστό των φυτών αλλά η μόλυνση δεν έφτασε στα φρούτα και δεν μειώθηκε η παραγωγή.Οι παραπάνω μολύνσεις φυτών στον αγρό είχαν ως αποτέλεσμα την σημαντική μείωση της παραγωγής.

Επίσης ανταγωνιστικά βακτήρια του *Ralstonia solanacearum* (*Pseudomonas fluorescens* ,*Bacillus spp.*) δοκιμάστηκαν για τον περιορισμό της ανάπτυξης του (TRIGALET 1989) αλλά είχαν περιορισμένη επιτυχία στον αγρό.

## **ΜΕΡΟΣ ΔΕΥΤΕΡΟ**

### **1. Μελέτη ανθεκτικότητας φυτών τομάτας ποικιλίας AR-100 στο *Ralstonia solanacearum*.**

## **1.1 ΠΕΡΙΛΗΨΗ**

Σκοπός της παρούσης πειραματικής μελέτης είναι ο έλεγχος και η καταγραφή της ανθεκτικότητας φυτών τομάτας ποικ. AR-100 στο βακτήριο *Ralstonia solanacearum*. Πραγματοποιήθηκαν τεχνητές μολύνσεις φυτών με τρεις διαφορετικές Ελληνικές απομονώσεις του βακτηρίου. Οι απομονώσεις αυτές προέρχονται από την συλλογή του Μπενακειού Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου (Μ.Φ.Ι.) και είναι οι εξής BPIC 1037, BPIC 828, BPIC 821.

Οι τεχνητές μολύνσεις έγιναν σε δυο διαφορετικές ηλικίες των φυτών, με τρεις διαφορετικούς τρόπους μόλυνσης (σχισμή, τομή φύλλου, ένεση αιωρήματος) και με τρεις συγκεντρώσεις αιωρήματος βακτηρίου (C.F.U.). Στη συνέχεια λαμβάνονταν καθημερινές μετρήσεις παθογένειας-εκδήλωσης της ασθένειας στα φυτά επί χρονικό διάστημα σαρανταπέντε ημερών.

## **1.2 ΥΛΙΚΑ-ΜΕΘΟΔΟΙ**

Τα αντιδραστήρια και υλικά που χρησιμοποιήθηκαν κατά την διαδικασία της πειραματικής μελέτης παρασκευάστηκαν στο Εργαστήριο Βακτηριολογίας του Μ.Φ.Ι. Στο ίδιο εργαστήριο ανήκουν και τα όργανα που χρησιμοποιήθηκαν κατά την διαδικασία των δοκιμών.

### **1.2.1 Συνθήκες ανάπτυξης των φυτών.**

Ο σπόρος των φυτών αφού υπέστη φυτουγειονομικό καθώς και έλεγχο βλαστικότητας (90%) φυτεύτηκε σε σπορείο εντός θερμοκηπίου με θερμοκρασία 23-25<sup>o</sup> C και φωτοπερίοδο 16 ωρών. Τα νεαρά φυτά μετά από 16 ημέρες μεταφυτεύτηκαν σε πλαστικά ποτήρια νερού τα οποία περιείχαν αποστειρωμένο χώμα (κομπόστα) και ποτίζονταν καθημερινά με ποσότητα νερού 33ml. Τα φυτά στηρίχθηκαν με την βοήθεια λεπτών ξύλων έτσι ώστε να αναπτυχθεί κατακόρυφα ο βλαστός και να διευκολυνθεί η διαδικασία της τεχνητής μόλυνσης. Στα φυτά χορηγήθηκε σύνθετο υγρό λίπασμα (Complezal 8-8-8) κάθε επτά ημέρες σε αραιώση 3ml υγρού λιπάσματος /1000ml νερού και ποσότητα διαλύματος περίπου 11ml ανά φυτό.

### **1.2.2. Λήψη αιωρήματος βακτηρίου**

Σε αποστειρωμένο φιαλίδιο μπιζού τοποθετούνται 2ml αποστειρωμένου και απεσταγμένου νερού με την βοήθεια σιφωνίου των 5ml σε ειδικό χώρο συσκευής διοχέτευσης αποστειρωμένου αέρα (Laminar air flow). Στη συνέχεια με βακτηριολογική βελόνη (loop) λαμβάνεται μικρή ποσότητα μολύσματος (inoculum) από καλλιέργεια 48 ωρών σε δοκιμαστικό σωλήνα που περιέχει θρεπτικό υλικό N.A.D. Το μόλυσμα μεταφέρεται ,υπο ασηπτικές συνθήκες στο φιαλίδιο μπιζού και στη συνέχεια αναμειγνύεται σε συσκευή ανάδευσης (vortex). Στη συνέχεια πραγματοποιούνται διαδοχικές αραιώσεις σε αποστειρωμένα πλαστικά φιαλίδια του 1ml (Eppendorfs):



**Αραίωση 1/10:** Λαμβάνονται με πιπέτα (pipette) των 200μl,100μl υγρού αιωρήματος βακτηρίου από το φιαλίδιο μπιζού και προστίθενται σε erpendorf που περιέχει 900 μl απιονισμένου-αποστειρωμένο νερό.

**Αραίωση 1/100:** Λαμβάνεται ποσότητα 100 μl από το πρώτο erpendorf και εναποτίθεται σε 900 μl απιονισμένου-αποστειρωμένου νερού σε ένα δεύτερο.

**Αραίωση 1/1000:** Με τον προαναφερθέντα τρόπο.

**Αραίωση 1/10000** Με τον προαναφερθέντα τρόπο.

Εν συνεχεία με την βοήθεια πιπέτας (40μl) τοποθετούνται 5μl αιωρήματος κάθε αραίωσης σε αντικειμενοφόρο πλάκα και αφού καλυφθεί με καλυπτρίδα (8.18mm) τοποθετούνται στην τράπεζα μικροσκοπίου για καταμέτρηση κυττάρων βακτηρίου.Βάση αυτού προκύπτουν οι παρακάτω συγκεντρώσεις για κάθε μια αραίωση κάθε απομόνωσης:

Αραίωση	BPIC 1037	BPIC 828	BPIC 821
Πυκνό αιώρημα	$1,87 \cdot 10^8$	$1,04 \cdot 10^8$	$1,1 \cdot 10^7$
-1	$1,87 \cdot 10^7$	$1,04 \cdot 10^7$	$1,1 \cdot 10^6$
-2	$1,87 \cdot 10^6$	$1,04 \cdot 10^6$	$1,1 \cdot 10^5$
-3	$1,87 \cdot 10^5$	$1,04 \cdot 10^5$	$1,1 \cdot 10^4$
-4	$1,87 \cdot 10^4$	$1,04 \cdot 10^4$	$1,1 \cdot 10^3$

Οι προαναφερθείσες συγκεντρώσεις βασίζονται σε οπτική καταμέτρηση και περιλαμβάνουν και νεκρά κύτταρα βακτηρίου.Εξαιτίας αυτού πραγματοποιείται και εξάπλωση (plating) αιωρήματος βακτηρίου με στόχο την

ανάπτυξη καλλιεργειών για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των ζώντων κυττάρων του βακτηρίου.

Ποσότητα 100μl (από κάθε απομόνωση-συγκέντρωση) τοποθετείται σε τρυβλίο Petri που περιέχει θρεπτικό υλικό N.A.D. και με την βοήθεια γυάλινης τριγωνικής ράβδου εξαπλώνεται ασηπτικά έτσι ώστε να καλύψει όλη την επιφάνεια του τρυβλίου. Έπειτα τα τρυβλία τοποθετούνται σε επωαστικό θάλαμο σε θερμοκρασία 28<sup>0</sup>C για χρονικό διάστημα τεσσάρων ημερών.

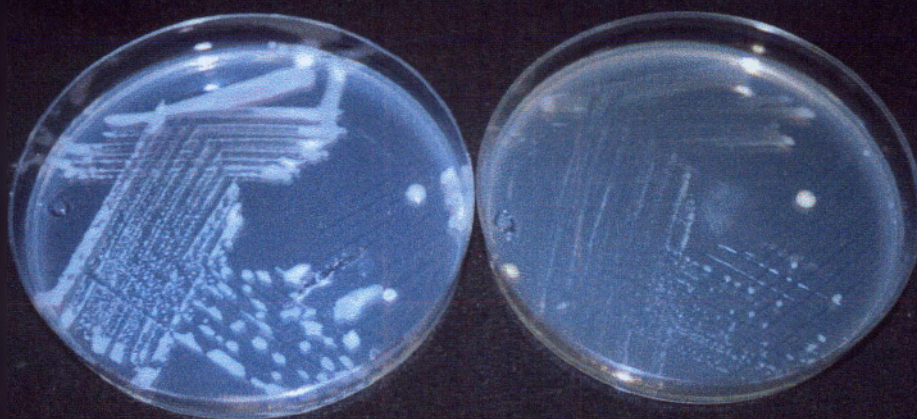
Κατόπιν αφού έχουν αναπτυχθεί οι αποικίες του βακτηρίου καταμετρούνται με την βοήθεια στερεοσκοπίου. Με αυτόν τον τρόπο προκύπτει ο αριθμός των ζώντων κυττάρων βακτηρίου που αντιστοιχεί στη δόση μόλυσματος ανά φυτό (5μl):

Αραίωση	BPIC 1037	BPIC 828	BPIC 821
Πυκνό αιώρημα	$6,5 \cdot 10^5$	$8,8 \cdot 10^5$	$3 \cdot 10^4$
-1	$6,5 \cdot 10^4$	$8,8 \cdot 10^4$	$3 \cdot 10^3$
-2	$6,5 \cdot 10^3$	$8,8 \cdot 10^3$	$3 \cdot 10^2$
-3	$6,5 \cdot 10^2$	$8,8 \cdot 10^2$	$3,3 \cdot 10$
-4	$6,5 \cdot 10$	$8,8 \cdot 10$	3

### 1.2.3. Τεχνητές μολύνσεις

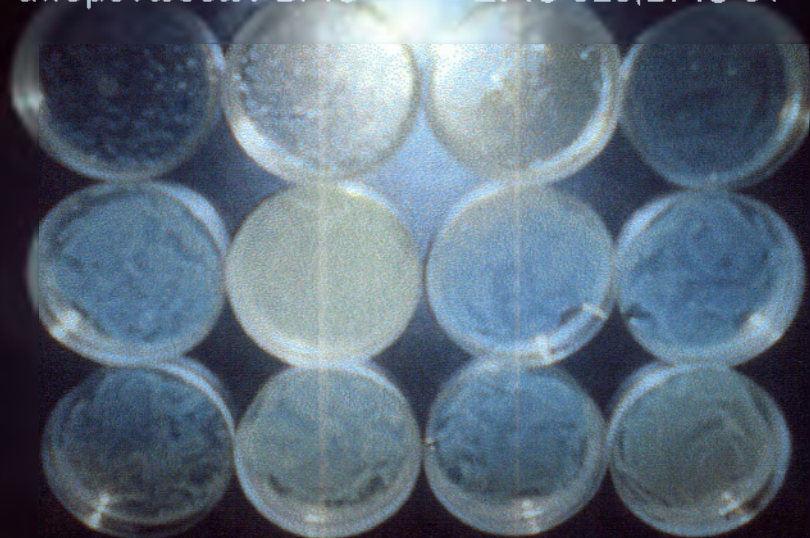
Το πρώτο μέρος των μολύνσεων πραγματοποιήθηκε σε φυτά ηλικίας 34 ημερών και σταδίου ανάπτυξης δευτέρου φύλλου, ενώ το δεύτερο σε φυτά ηλικίας 44 ημερών και σταδίου ανάπτυξης τρίτου φύλλου. Πραγματοποιήθηκαν τρεις επαναλήψεις και ένας αρνητικός μάρτυρας κατά περίπτωση. Τα φυτά μολύνθηκαν με τρεις απομονώσεις του *Ralstonia solanacearum*, με τρεις διαφορετικούς τρόπους μόλυνσης, με τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις (ανά απομόνωση) και σε δυο διαφορετικές ηλικίες. Για τις μολύνσεις χρησιμοποιήθηκαν το πυκνό αιώρημα και οι αραιώσεις -1, -4 του παραπάνω πίνακα.

Striking αιωρήματος *Ralstonia Solanacearum*  
σε θρεπτικό υλικό N A D.



Εικ. 1.1

Plating αιωρήματος (διαφορετικών αραιώσεων)  
του βακτηρίου *Ralstonia solanacearum*  
απομονώσεων BPIC 828, BPIC 81



Εικ. 1.2

### **1.2.3.1 Μόλυνση με σχισμή**

Με την βοήθεια πιπέτας τοποθετούνται 5μl αιωρήματος βακτηρίου στο βλαστό του φυτού στο μεσογονάτιο διάστημα μεταξύ κοτυληδονόφυλλου και πρώτου κανονικού φύλλου.Εν συνεχεία με την βοήθεια νυστεριού πραγματοποιείται μια τομή στο βλαστό διαγώνια ως προς τον κατακόρυφο άξονα έτσι ώστε να ληθεί η συνέχεια των αγγείων του βλαστού και να διευκολυνθεί η είσοδος του βακτηρίου.Μετά την πάροδο λίγων λεπτών τοποθετείται στο σημείο επέμβασης βαζελίνη (με την βοήθεια σύριγγας)έτσι ώστε να αποφευχθεί η αφυδάτωση.

### **1.2.3.2 Μόλυνση με τομή φύλλου**

Με την βοήθεια νυστεριού πραγματοποιείται μια τομή κάθετα ως προς τον μίσχο του δευτέρου φύλλου (έτσι ώστε το αιώρημα να παραμείνει στο σημείο τομής έως ότου απορροφηθεί από το φυτό) σε απόσταση 0,5-1cm από την μασχάλη του φυτού.Στη συνέχεια με την πιπέττα τοποθετούνται 5μl αιωρήματος ανά φυτό και μετά από λίγα λεπτά το σημείο τομής καλύπτεται με βαζελίνη.

### **1.2.3.3 Μόλυνση με ένεση αιωρήματος (injection)**

Για τις μολύνσεις αυτού του είδους χρησιμοποιήθηκε σύριγγα 25μl.Μετά την απολύμανση της με οινόπνευμα λαμβάνονται 5μl αιωρήματος βακτηρίου και πραγματοποιείται μόλυνση μεταξύ κοτυληδονόφυλλου και πρώτου κανονικού φύλλου.Η σύριγγα μετά την είσοδο της στο βλαστό κινείται παράλληλα σε αυτόν διανύοντας διάστημα 3cm περίπου στο εσωτερικό του οπότε και απελευθερώνεται το αιώρημα στο φυτό σταδιακά ώστε όλη η

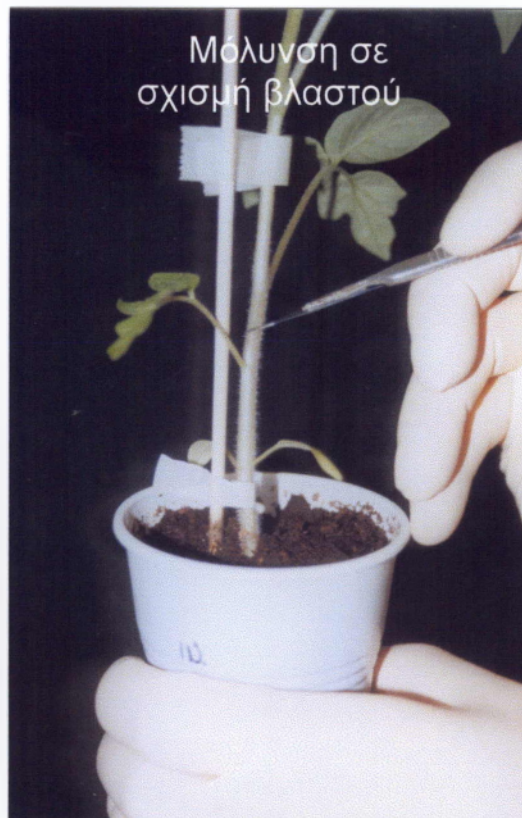
## Τεχνητές Μολύνσεις Φυτών Τομάτας



Εικ 2.1



Εικ 2.2



Εικ 2.3

ποσότητα να απορροφηθεί από το φυτό. Το σημείο εισόδου της βελόνας καλύπτεται τέλος με βαζελίνη έτσι ώστε, όπως και στις προηγούμενες περιπτώσεις, να αποφευχθεί η αφυδάτωση.

### **1.3 Αποτελέσματα**

Μετά την πραγματοποίηση των μολύνσεων τα φυτά τοποθετήθηκαν ανά 24 σε πλαστικούς δίσκους σε θάλαμο ελεγχόμενων συνθηκών. Για να αποφευχθεί η μεταφορά του μολύσματος μέσω του νερού τα φυτά ποτίζονταν με μικρές ποσότητες νερού και με την βοήθεια υδροβολέα. Η παρατήρηση και καταγραφή των συμπτωμάτων έγινε για χρονική διάρκεια 45 ημερών και συνοπτικά τα εξωτερικά αποτελέσματα έχουν ως εξής:

Σε σύνολο 162 τεχνητά μολυσμένων φυτών τομάτας:

- 25 φυτά εκδήλωσαν τα συμπτώματα της “βακτηριακής μάρανσης” τα οποία είχαν μολυνθεί με τις απομονώσεις BPIC 1037, BPIC 828.
- 38 φυτά δεν παρουσίασαν καμία επιπλοκή στην ανάπτυξη τους σε σχέση με τους αρνητικούς μάρτυρες.
- 45 φυτά παρουσίασαν διόγκωση του βλαστού στο σημείο μόλυνσης.
- 28 φυτά εμφάνισαν μειωμένη ανάπτυξη καθ’ ύψος σε σχέση με τους αρνητικούς μάρτυρες.
- 32 φυτά ανέπτυξαν μίσχους 2<sup>ου</sup> και 3<sup>ου</sup> φύλλου οι οποίοι είχαν διπλάσια διάμετρο σε σχέση με τους αρνητικούς μάρτυρες.
- 97 φυτά ανέπτυξαν μεγάλο αριθμό τυχαίων ριζών επί του στελέχους.
- 12 φυτά εμφάνισαν σχίσσιμο του βλαστού και αποξήρανση του κάτω από το σημείο μόλυνσης (τεχνητές μολύνσεις σχισμής βλαστού-ένεσης).

Συμπτώματα σε φυτά που μολύνθηκαν σε ηλικία 2ου φύλλου



Εικ 3.1

Συμπτώματα σε φυτά που μολύνθηκαν σε ηλικία 2ου φύλλου



Εικ 3.2

Μετά την πάροδο των 45 ημερών τα φυτά απομακρύνθηκαν 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 ανεξάρτητα αν έδειξαν η όχι συμπτώματα σύμφωνα με την παρακάτω διαδικασία.

Σε τρυβλία Petri τοποθετούνται ασηπτικά τρεις σταγόνες απεσταγμένου-αποστειρωμένου νερού με την βοήθεια πιπέτας Pasteur. Εν συνεχεία με την βοήθεια νυστεριού λαμβάνονται κυκλικά τεμάχια βλαστού αφενός από το σημείο της τεχνητής μόλυνσης και αφετέρου από την κορυφή του φυτού και τοποθετούνται στις δυο σταγόνες νερού. Τα τρυβλία διατηρούνται ακίνητα για χρονικό διάστημα 15' έτσι ώστε να πραγματοποιηθεί διάχυση των βακτηρίων, εφόσον υπάρχουν, στο νερό. Τα φυτά τοποθετούνται μεμονωμένα σε πλαστικές σακούλες και τοποθετούνται στο ψυγείο. Μετά την πάροδο των 15' τα τρυβλία μεταφέρονται στο Laminar air flow όπου γίνεται γραμμική εξάπλωση του αιωρήματος (streaking) σε θρεπτικό υλικό N.A.D με την βοήθεια βακτηριακής βελόνης (Loop). Τα τρυβλία τοποθετούνται σε επωαστικό θάλαμο θερμοκρασίας 27°C όπου και παραμένουν για διάστημα τεσσάρων ημερών.

Εν συνεχεία τα τρυβλία εξετάζονται για την ύπαρξη αποικιών του βακτηρίου στο στερεοσκόπιο. Από τα τρυβλία στα οποία παρατηρείται ανάπτυξη του βακτηρίου λαμβάνονται αποικίες, με την Loop, και τοποθετούνται για ανάπτυξη σε δοκιμαστικούς σωλήνες οι οποίοι περιέχουν θρεπτικό υλικό N.A.G. και τοποθετούνται σε επωαστικό θάλαμο για διάστημα 48 ωρών.

Έπειτα με την βοήθεια σιφωνίου (5ml) τοποθετούνται σε μικρά γυάλινα αποστειρωμένα δοχεία (μπιζού) 2ml αποστειρωμένου-απεσταγμένου νερού. Με την Loop λαμβάνεται μικρή ποσότητα καλλιέργειας βακτηρίου και διαλύεται στο νερό (μπιζού). Πραγματοποιούνται στη συνέχεια δυο διαδοχικές αραιώσεις του βακτηριακού αιωρήματος σε erpendorf.



Στη συνέχεια λαμβάνονται με πιπέτα 20μl αιωρήματος και τοποθετούνται σε πολυφατνιακές αντικειμενοφόρες πλάκες μικροσκοπίου για την ταυτοποίηση του βακτηρίου με την μέθοδο I.F. (δοκιμή ανοσοφθορισμού).Οι πλάκες αφήνονται να στεγνώσουν σε θερμαινόμενο θάλαμο θερμοκρασίας 35°C για διάστημα 10'.Ακολουθεί “προσήλωση” των κυττάρων (έτσι ώστε να επιτευχθεί προσκόλληση των κυττάρων του βακτηρίου στη πλάκα) με φλόγα.Προστίθεται εν συνεχεία αντιορός Rs (20μl ανά θέση) σε αναλογία 1:800 (αντιορός-PBS 0.01M).Ο ρόλος του αντιορού είναι η προσκόλληση του στα κύτταρα του βακτηρίου που βρίσκονται στη πλάκα.Οι πλάκες τοποθετούνται σε υγρό θάλαμο εντός επωαστικού θερμοκρασίας 25-27°C για μια ώρα.Ακολουθούν τρεις πεντάλεπτες πλύσεις των πλακών σε διάλυμα PBS(0.01M) μέσα σε γυάλινο δοχείο σε μαγνητικό αναδευτήρα.Οι πλάκες στη συνέχεια αφήνονται να στεγνώσουν σε θερμαινόμενο θάλαμο.Τοποθετούνται στη συνέχεια 20μl φθορίζουσας χρωστικής(σύμπλοκο ισοθειοκυανικής φθορικής F.I.T.C.) ανά θέση.Η χρωστική αυτή έχει την ιδιότητα να “προσκολλάται” στον αντιορό που είναι προσκολλημένος στα κύτταρα του βακτηρίου. Οι πλάκες τοποθετούνται σε υγρό θάλαμο εντός επωαστικού θαλάμου θερμοκρασίας 25-27°C για μια ώρα και στη συνέχεια ακολουθούν τρεις πεντάλεπτες πλύσεις των πλακών σε διάλυμα PBS(0.01M) μέσα σε γυάλινο δοχείο με μαγνητικό αναδευτήρα.Στη συνέχεια οι πλάκες στεγνώνουν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και σε σκοτεινό χώρο.

Τέλος οι αντικειμενοφόρες δοκιμής εξετάζονται σε μικροσκόπιο ανοσοφθορισμού με κατάλληλα φίλτρα για την διέγερση του F.I.T.C. ,με ελαιοκαταδυτικό φακό και με μεγέθυνση 400Xκαι 1000X.Τα φατνια εξετάζονται κατά μήκος δυο κάθετων διαμέτρων και κατά την περίμετρο τους.Αρχικά ελέγχεται η αντικειμενοφόρος του θετικού μάρτυρα.Στη συνέχεια εξετάζονται αν υπάρχουν φθορίζοντα κύτταρα με την χαρακτηριστική μορφολογία του *Ralstonia solanacearum* στα φατνια Η ένταση του φθορισμού πρέπει να είναι ίδια με εκείνη του θετικού μάρτυρα για σχετικά παρόμοιο

αριθμό κυττάρων/φατνίο. Μετά την ολοκλήρωση της μεθόδου τα αποτελέσματα για όλα τα τεχνητά μολυσμένα φυτά έχουν ως εξής:

ΠΙΝΑΚΑΣ 1: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

√/Α	Απομόνωση	CF.U.	Τρόπος μόλυνσης	Ηλικία	Μειμ αναπτύξη	Λιόγκωση βλ.	Σχίσμο βλ.	Κορυφή	Τομή	Plating	Striking	I.F.
	1037	10 <sup>7</sup>	ΣΧΙΣΜΗ	2 <sup>ο</sup> φύλλο	-	+	+	+	+	+	+	+
	1037	10 <sup>7</sup>	ΣΧΙΣΜΗ	2 <sup>ο</sup> φύλλο	-	+	-	+	+	+	+	+
	1037	10 <sup>7</sup>	ΣΧΙΣΜΗ	2 <sup>ο</sup> φύλλο	-	+	-	+	+	+	+	+
	1037	10 <sup>6</sup>	ΣΧΙΣΜΗ	2 <sup>ο</sup> φύλλο	-	+	-	+	+	+	+	+
	1037	10 <sup>6</sup>	ΣΧΙΣΜΗ	2 <sup>ο</sup> φύλλο	-	-	-	+	+	+	+	+
	1037	10 <sup>6</sup>	ΣΧΙΣΜΗ	2 <sup>ο</sup> φύλλο	-	+	-	+	+	+	+	+
	1037	10 <sup>4</sup>	ΣΧΙΣΜΗ	2 <sup>ο</sup> φύλλο	-	-	-	-	-	-	-	-
	1037	10 <sup>4</sup>	ΣΧΙΣΜΗ	2 <sup>ο</sup> φύλλο	-	-	-	+	+	+	+	+
	1037	10 <sup>4</sup>	ΣΧΙΣΜΗ	2 <sup>ο</sup> φύλλο	-	-	-	-	-	-	-	-
10	1037	10 <sup>7</sup>	ΤΟΜΗ ΦΥΛΛΟΥ	2 <sup>ο</sup> φύλλο	-	+	+	-	-	-	-	-
11	1037	10 <sup>7</sup>	ΤΟΜΗ ΦΥΛΛΟΥ	2 <sup>ο</sup> φύλλο	+	+	+	+	+	+	+	+
12	1037	10 <sup>7</sup>	ΤΟΜΗ ΦΥΛΛΟΥ	2 <sup>ο</sup> φύλλο	+	+	-	+	+	+	+	+
13	1037	10 <sup>6</sup>	ΤΟΜΗ ΦΥΛΛΟΥ	2 <sup>ο</sup> φύλλο	-	-	-	-	-	-	-	-
14	1037	10 <sup>6</sup>	ΤΟΜΗ ΦΥΛΛΟΥ	2 <sup>ο</sup> φύλλο	-	+	-	+	+	+	+	+
15	1037	10 <sup>6</sup>	ΤΟΜΗ ΦΥΛΛΟΥ	2 <sup>ο</sup> φύλλο	-	+	-	+	+	+	+	+
16	1037	10 <sup>4</sup>	ΤΟΜΗ ΦΥΛΛΟΥ	2 <sup>ο</sup> φύλλο	-	-	-	+	+	+	+	+
17	1037	10 <sup>4</sup>	ΤΟΜΗ ΦΥΛΛΟΥ	2 <sup>ο</sup> φύλλο	-	-	-	+	+	+	+	+
18	1037	10 <sup>4</sup>	ΤΟΜΗ ΦΥΛΛΟΥ	2 <sup>ο</sup> φύλλο	+	-	-	-	-	-	-	-
19	1037	10 <sup>7</sup>	INJECTION	2 <sup>ο</sup> φύλλο	+	+	-	+	+	+	+	+
20	1037	10 <sup>7</sup>	INJECTION	2 <sup>ο</sup> φύλλο	+	+	+	+	+	+	+	+
21	1037	10 <sup>7</sup>	INJECTION	2 <sup>ο</sup> φύλλο	-	+	+	+	+	+	+	+
22	1037	10 <sup>6</sup>	INJECTION	2 <sup>ο</sup> φύλλο	+	+	+	+	+	+	+	+
23	1037	10 <sup>6</sup>	INJECTION	2 <sup>ο</sup> φύλλο	+	+	-	+	+	+	+	+
24	1037	10 <sup>6</sup>	INJECTION	2 <sup>ο</sup> φύλλο	-	+	-	+	+	+	+	+
25	1037	10 <sup>4</sup>	INJECTION	2 <sup>ο</sup> φύλλο	-	+	-	+	+	+	+	+

JA	Απομόνωση	C.F.U	Τρόπος μόλυνσης	Ηλικία	Μεμ. αναπνοή	Αιόρρωση βλ.	Σχίσμο βλ.	Κορυφή	Τομή	Plating	Striking	I.F.
6	1037	10 <sup>4</sup>	INJECTION	2 <sup>ο</sup> φύλλο	-	+	-	+	+	+	+	+
7	1037	10 <sup>4</sup>	INJECTION	2 <sup>ο</sup> φύλλο	-	+	-	+	-	+	+	+
8	828	10 <sup>7</sup>	ΣΧΙΣΜΗ	2 <sup>ο</sup> φύλλο	+	+	-	+	+	+	+	+
9	828	10 <sup>7</sup>	ΣΧΙΣΜΗ	2 <sup>ο</sup> φύλλο	+	+	+	+	+	+	+	+
0	828	10 <sup>7</sup>	ΣΧΙΣΜΗ	2 <sup>ο</sup> φύλλο	-	+	-	+	+	+	+	+
2	828	10 <sup>6</sup>	ΣΧΙΣΜΗ	2 <sup>ο</sup> φύλλο	+	+	-	+	+	+	+	+
3	828	10 <sup>6</sup>	ΣΧΙΣΜΗ	2 <sup>ο</sup> φύλλο	+	+	-	+	+	+	+	+
4	828	10 <sup>6</sup>	ΣΧΙΣΜΗ	2 <sup>ο</sup> φύλλο	-	+	-	+	+	+	+	+
5	828	10 <sup>4</sup>	ΣΧΙΣΜΗ	2 <sup>ο</sup> φύλλο	-	-	-	+	-	+	+	+
6	828	10 <sup>4</sup>	ΣΧΙΣΜΗ	2 <sup>ο</sup> φύλλο	-	-	-	+	-	+	+	+
7	828	10 <sup>4</sup>	ΣΧΙΣΜΗ	2 <sup>ο</sup> φύλλο	-	-	-	+	-	+	+	+
8	828	10 <sup>7</sup>	ΤΟΜΗ ΦΥΛΛΟΥ	2 <sup>ο</sup> φύλλο	+	-	-	+	+	+	+	+
9	828	10 <sup>7</sup>	ΤΟΜΗ ΦΥΛΛΟΥ	2 <sup>ο</sup> φύλλο	+	+	-	+	-	+	+	+
10	828	10 <sup>7</sup>	ΤΟΜΗ ΦΥΛΛΟΥ	2 <sup>ο</sup> φύλλο	-	+	-	+	-	+	+	+
11	828	10 <sup>6</sup>	ΤΟΜΗ ΦΥΛΛΟΥ	2 <sup>ο</sup> φύλλο	-	-	-	+	-	+	+	+
12	828	10 <sup>6</sup>	ΤΟΜΗ ΦΥΛΛΟΥ	2 <sup>ο</sup> φύλλο	-	+	-	+	-	+	+	+
13	828	10 <sup>6</sup>	ΤΟΜΗ ΦΥΛΛΟΥ	2 <sup>ο</sup> φύλλο	-	-	-	+	-	+	+	+
14	828	10 <sup>6</sup>	ΤΟΜΗ ΦΥΛΛΟΥ	2 <sup>ο</sup> φύλλο	-	-	-	-	-	-	-	-
	828	10 <sup>4</sup>	ΤΟΜΗ ΦΥΛΛΟΥ	2 <sup>ο</sup> φύλλο	-	+	-	-	-	-	-	-
16	828	10 <sup>4</sup>	ΤΟΜΗ ΦΥΛΛΟΥ	2 <sup>ο</sup> φύλλο	-	-	-	-	-	-	-	-
17	828	10 <sup>4</sup>	ΤΟΜΗ ΦΥΛΛΟΥ	2 <sup>ο</sup> φύλλο	-	-	-	-	-	-	-	-
18	828	10 <sup>7</sup>	INJECTION	2 <sup>ο</sup> φύλλο	+	+	+	+	+	+	+	+
19	828	10 <sup>7</sup>	INJECTION	2 <sup>ο</sup> φύλλο	-	+	+	+	+	+	+	+
20	828	10 <sup>7</sup>	INJECTION	2 <sup>ο</sup> φύλλο	+	+	+	+	+	+	+	+
21	828	10 <sup>6</sup>	INJECTION	2 <sup>ο</sup> φύλλο	-	+	+	+	+	+	+	+
22	828	10 <sup>6</sup>	INJECTION	2 <sup>ο</sup> φύλλο	+	+	+	+	-	+	+	+
23	828	10 <sup>6</sup>	INJECTION	2 <sup>ο</sup> φύλλο	-	+	-	+	-	+	+	+
24	828	10 <sup>4</sup>	INJECTION	2 <sup>ο</sup> φύλλο	-	-	-	+	+	+	+	+
25	828	10 <sup>4</sup>	INJECTION	2 <sup>ο</sup> φύλλο	-	+	-	+	+	+	+	+
26	828	10 <sup>4</sup>	INJECTION	2 <sup>ο</sup> φύλλο	-	+	-	+	-	+	+	+
27	821	10 <sup>7</sup>	ΣΧΙΣΜΗ	2 <sup>ο</sup> φύλλο	-	-	-	-	-	-	-	-

VA	Απομόνωση	C.F.O	Τρόπος μόλυνσης	Ηλικία	Μέγμ αναπύξη	Διόγκωση βλ.	Εχτισμο βλ.	Κορυφή	Τομή	Plating	Striking	I.F.
8	821	10 <sup>7</sup>	ΣΧΙΣΜΗ	2 <sup>ο</sup> φύλλο	-	-	-	-	-	-	-	-
9	821	10 <sup>7</sup>	ΣΧΙΣΜΗ	2 <sup>ο</sup> φύλλο	-	-	-	-	-	-	-	-
0	821	10 <sup>6</sup>	ΣΧΙΣΜΗ	2 <sup>ο</sup> φύλλο	-	-	-	-	-	-	-	-
1	821	10 <sup>6</sup>	ΣΧΙΣΜΗ	2 <sup>ο</sup> φύλλο	-	-	-	-	-	-	-	-
2	821	10 <sup>6</sup>	ΣΧΙΣΜΗ	2 <sup>ο</sup> φύλλο	-	-	-	-	-	-	-	-
3	821	10 <sup>4</sup>	ΣΧΙΣΜΗ	2 <sup>ο</sup> φύλλο	-	-	-	-	-	-	-	-
4	821	10 <sup>4</sup>	ΣΧΙΣΜΗ	2 <sup>ο</sup> φύλλο	-	-	-	-	-	-	-	-
5	821	10 <sup>4</sup>	ΣΧΙΣΜΗ	2 <sup>ο</sup> φύλλο	-	-	-	-	-	-	-	-
6	821	10 <sup>7</sup>	ΤΟΜΗ ΦΥΛΛΟΥ	2 <sup>ο</sup> φύλλο	-	-	-	-	-	-	-	-
7	821	10 <sup>7</sup>	ΤΟΜΗ ΦΥΛΛΟΥ	2 <sup>ο</sup> φύλλο	-	-	-	-	-	-	-	-
8	821	10 <sup>7</sup>	ΤΟΜΗ ΦΥΛΛΟΥ	2 <sup>ο</sup> φύλλο	-	-	-	-	-	-	-	-
9	821	10 <sup>6</sup>	ΤΟΜΗ ΦΥΛΛΟΥ	2 <sup>ο</sup> φύλλο	-	-	-	-	-	-	-	-
0	821	10 <sup>6</sup>	ΤΟΜΗ ΦΥΛΛΟΥ	2 <sup>ο</sup> φύλλο	-	-	-	-	+	-	-	-
1	821	10 <sup>6</sup>	ΤΟΜΗ ΦΥΛΛΟΥ	2 <sup>ο</sup> φύλλο	-	-	-	-	-	-	-	-
2	821	10 <sup>4</sup>	ΤΟΜΗ ΦΥΛΛΟΥ	2 <sup>ο</sup> φύλλο	-	-	-	-	-	-	-	-
3	821	10 <sup>4</sup>	ΤΟΜΗ ΦΥΛΛΟΥ	2 <sup>ο</sup> φύλλο	-	-	-	-	-	-	-	-
4	821	10 <sup>4</sup>	ΤΟΜΗ ΦΥΛΛΟΥ	2 <sup>ο</sup> φύλλο	-	-	-	-	-	-	-	-
5	821	10 <sup>7</sup>	INJECTION	2 <sup>ο</sup> φύλλο	-	-	-	-	-	-	-	-
6	821	10 <sup>7</sup>	INJECTION	2 <sup>ο</sup> φύλλο	-	-	-	-	-	-	-	-
8	821	10 <sup>7</sup>	INJECTION	2 <sup>ο</sup> φύλλο	-	-	-	-	-	-	-	-
9	821	10 <sup>6</sup>	INJECTION	2 <sup>ο</sup> φύλλο	-	-	-	-	-	-	-	-
0	821	10 <sup>6</sup>	INJECTION	2 <sup>ο</sup> φύλλο	-	-	-	-	-	-	-	-
1	821	10 <sup>6</sup>	INJECTION	2 <sup>ο</sup> φύλλο	-	-	-	-	-	-	-	-
2	821	10 <sup>4</sup>	INJECTION	2 <sup>ο</sup> φύλλο	-	-	-	-	-	-	-	-
3	821	10 <sup>4</sup>	INJECTION	2 <sup>ο</sup> φύλλο	-	-	-	-	-	-	-	-
4	821	10 <sup>4</sup>	INJECTION	2 <sup>ο</sup> φύλλο	-	-	-	-	-	-	-	-
5	1037	10 <sup>7</sup>	ΣΧΙΣΜΗ	3 <sup>ο</sup> φύλλο	-	-	-	+	+	+	+	+
6	1037	10 <sup>7</sup>	ΣΧΙΣΜΗ	3 <sup>ο</sup> φύλλο	-	-	-	+	+	+	+	+
7	1037	10 <sup>7</sup>	ΣΧΙΣΜΗ	3 <sup>ο</sup> φύλλο	-	-	-	+	+	+	+	+
8	1037	10 <sup>6</sup>	ΣΧΙΣΜΗ	3 <sup>ο</sup> φύλλο	-	-	-	+	+	+	+	+
9	1037	10 <sup>6</sup>	ΣΧΙΣΜΗ	3 <sup>ο</sup> φύλλο	-	-	-	+	+	+	+	+

V/A	Απομόνωση	CFC	Τρόπος μόλυνσης	Ηλικία	Μειμ αναπτυξη	Διόγκωση βλ	Σχισμο βλ	Κορυφή	Τομή	Plating	Striking	I.F.
90	1037	10 <sup>6</sup>	ΣΧΙΣΜΗ	3 <sup>ο</sup> φύλλο	-	-	-	+	+	+	+	+
91	1037	10 <sup>4</sup>	ΣΧΙΣΜΗ	3 <sup>ο</sup> φύλλο	-	-	-	+	+	+	+	+
92	1037	10 <sup>4</sup>	ΣΧΙΣΜΗ	3 <sup>ο</sup> φύλλο	-	-	-	+	+	+	+	+
93	1037	10 <sup>4</sup>	ΣΧΙΣΜΗ	3 <sup>ο</sup> φύλλο	-	-	-	+	+	+	+	+
94	1037	10 <sup>7</sup>	ΤΟΜΗ ΦΥΛΛΟΥ	3 <sup>ο</sup> φύλλο	-	-	-	+	+	+	+	+
95	1037	10 <sup>7</sup>	ΤΟΜΗ ΦΥΛΛΟΥ	3 <sup>ο</sup> φύλλο	-	-	-	-	+	+	+	+
96	1037	10 <sup>7</sup>	ΤΟΜΗ ΦΥΛΛΟΥ	3 <sup>ο</sup> φύλλο	-	-	-	+	+	+	+	+
97	1037	10 <sup>6</sup>	ΤΟΜΗ ΦΥΛΛΟΥ	3 <sup>ο</sup> φύλλο	-	-	-	-	+	+	+	+
98	1037	10 <sup>6</sup>	ΤΟΜΗ ΦΥΛΛΟΥ	3 <sup>ο</sup> φύλλο	-	-	-	-	+	+	+	+
99	1037	10 <sup>6</sup>	ΤΟΜΗ ΦΥΛΛΟΥ	3 <sup>ο</sup> φύλλο	-	-	-	+	+	+	+	+
100	1037	10 <sup>4</sup>	ΤΟΜΗ ΦΥΛΛΟΥ	3 <sup>ο</sup> φύλλο	-	-	-	-	-	-	-	-
101	1037	10 <sup>4</sup>	ΤΟΜΗ ΦΥΛΛΟΥ	3 <sup>ο</sup> φύλλο	-	-	-	-	-	-	-	-
102	1037	10 <sup>4</sup>	ΤΟΜΗ ΦΥΛΛΟΥ	3 <sup>ο</sup> φύλλο	-	-	-	-	-	-	-	-
103	1037	10 <sup>7</sup>	INJECTION	3 <sup>ο</sup> φύλλο	+	+	-	-	+	+	+	+
104	1037	10 <sup>7</sup>	INJECTION	3 <sup>ο</sup> φύλλο	-	+	-	-	+	+	+	+
105	1037	10 <sup>7</sup>	INJECTION	3 <sup>ο</sup> φύλλο	+	+	-	-	+	+	+	+
106	1037	10 <sup>6</sup>	INJECTION	3 <sup>ο</sup> φύλλο	+	-	-	-	-	-	-	-
107	1037	10 <sup>6</sup>	INJECTION	3 <sup>ο</sup> φύλλο	+	-	-	-	+	+	+	+
108	1037	10 <sup>6</sup>	INJECTION	3 <sup>ο</sup> φύλλο	-	-	-	-	+	+	+	+
110	1037	10 <sup>4</sup>	INJECTION	3 <sup>ο</sup> φύλλο	+	-	-	-	+	+	+	+
111	1037	10 <sup>4</sup>	INJECTION	3 <sup>ο</sup> φύλλο	+	-	-	-	-	-	-	-
112	1037	10 <sup>4</sup>	INJECTION	3 <sup>ο</sup> φύλλο	-	-	-	-	-	-	-	-
113	828	10 <sup>7</sup>	ΣΧΙΣΜΗ	3 <sup>ο</sup> φύλλο	+	-	-	-	+	+	+	+
114	828	10 <sup>7</sup>	ΣΧΙΣΜΗ	3 <sup>ο</sup> φύλλο	+	+	-	-	+	+	+	+
115	828	10 <sup>7</sup>	ΣΧΙΣΜΗ	3 <sup>ο</sup> φύλλο	+	+	-	-	+	+	+	+
116	828	10 <sup>6</sup>	ΣΧΙΣΜΗ	3 <sup>ο</sup> φύλλο	-	+	-	-	+	+	+	+
117	828	10 <sup>6</sup>	ΣΧΙΣΜΗ	3 <sup>ο</sup> φύλλο	+	+	-	-	+	+	+	+
118	828	10 <sup>6</sup>	ΣΧΙΣΜΗ	3 <sup>ο</sup> φύλλο	-	+	-	-	+	+	+	+
119	828	10 <sup>4</sup>	ΣΧΙΣΜΗ	3 <sup>ο</sup> φύλλο	-	-	-	-	+	+	+	+
120	828	10 <sup>4</sup>	ΣΧΙΣΜΗ	3 <sup>ο</sup> φύλλο	+	-	-	-	+	+	+	+
121	828	10 <sup>4</sup>	ΣΧΙΣΜΗ	3 <sup>ο</sup> φύλλο	-	-	-	-	+	+	+	+

Α/Α	Απομόνωση	C.F.U	Τρόπος μόλυνσης	Ηλικία	Μειμ. αναπτύξη	Διόγκωση βλ.	Σχισμο βλ.	Κορυφή	Τομή	Plating	Striking	I.F.
122	828	10 <sup>7</sup>	ΤΟΜΗ ΦΥΛΛΟΥ	3 <sup>ο</sup> φύλλο	-	-	-	-	-	-	-	-
123	828	10 <sup>7</sup>	ΤΟΜΗ ΦΥΛΛΟΥ	3 <sup>ο</sup> φύλλο	-	-	-	-	+	+	+	+
124	828	10 <sup>7</sup>	ΤΟΜΗ ΦΥΛΛΟΥ	3 <sup>ο</sup> φύλλο	-	-	-	-	-	-	-	-
125	828	10 <sup>6</sup>	ΤΟΜΗ ΦΥΛΛΟΥ	3 <sup>ο</sup> φύλλο	-	-	-	-	+	+	+	+
126	828	10 <sup>6</sup>	ΤΟΜΗ ΦΥΛΛΟΥ	3 <sup>ο</sup> φύλλο	-	-	-	-	+	+	+	+
127	828	10 <sup>6</sup>	ΤΟΜΗ ΦΥΛΛΟΥ	3 <sup>ο</sup> φύλλο	-	-	-	-	+	+	+	+
28	828	10 <sup>4</sup>	ΤΟΜΗ ΦΥΛΛΟΥ	3 <sup>ο</sup> φύλλο	-	-	-	-	-	-	-	-
29	828	10 <sup>4</sup>	ΤΟΜΗ ΦΥΛΛΟΥ	3 <sup>ο</sup> φύλλο	-	-	-	-	-	-	-	-
30	828	10 <sup>4</sup>	ΤΟΜΗ ΦΥΛΛΟΥ	3 <sup>ο</sup> φύλλο	-	-	-	-	-	-	-	-
31	828	10 <sup>7</sup>	INJECTION	3 <sup>ο</sup> φύλλο	+	-	-	+	+	+	+	+
32	828	10 <sup>7</sup>	INJECTION	3 <sup>ο</sup> φύλλο	-	-	-	+	+	+	+	+
33	828	10 <sup>7</sup>	INJECTION	3 <sup>ο</sup> φύλλο	-	-	-	+	+	+	+	+
34	828	10 <sup>6</sup>	INJECTION	3 <sup>ο</sup> φύλλο	-	-	-	+	+	+	+	+
35	828	10 <sup>6</sup>	INJECTION	3 <sup>ο</sup> φύλλο	-	-	-	+	+	+	+	+
36	828	10 <sup>6</sup>	INJECTION	3 <sup>ο</sup> φύλλο	-	-	-	+	+	+	+	+
37	828	10 <sup>4</sup>	INJECTION	3 <sup>ο</sup> φύλλο	-	-	-	-	-	-	-	-
38	828	10 <sup>4</sup>	INJECTION	3 <sup>ο</sup> φύλλο	-	-	-	+	+	+	+	+
39	828	10 <sup>4</sup>	INJECTION	3 <sup>ο</sup> φύλλο	-	-	-	+	+	+	+	+
41	821	10 <sup>7</sup>	ΣΧΙΣΜΗ	3 <sup>ο</sup> φύλλο	-	-	-	+	+	+	+	+
42	821	10 <sup>7</sup>	ΣΧΙΣΜΗ	3 <sup>ο</sup> φύλλο	-	-	-	-	-	-	-	-
43	821	10 <sup>7</sup>	ΣΧΙΣΜΗ	3 <sup>ο</sup> φύλλο	-	-	-	-	-	-	-	-
44	821	10 <sup>6</sup>	ΣΧΙΣΜΗ	3 <sup>ο</sup> φύλλο	-	-	-	-	-	-	-	-
45	821	10 <sup>6</sup>	ΣΧΙΣΜΗ	3 <sup>ο</sup> φύλλο	-	-	-	-	-	-	-	-
46	821	10 <sup>6</sup>	ΣΧΙΣΜΗ	3 <sup>ο</sup> φύλλο	-	-	-	-	-	-	-	-
47	821	10 <sup>4</sup>	ΣΧΙΣΜΗ	3 <sup>ο</sup> φύλλο	-	-	-	-	-	-	-	-
48	821	10 <sup>4</sup>	ΣΧΙΣΜΗ	3 <sup>ο</sup> φύλλο	-	-	-	-	-	-	-	-
49	821	10 <sup>4</sup>	ΣΧΙΣΜΗ	3 <sup>ο</sup> φύλλο	-	-	-	-	-	-	-	-
50	821	10 <sup>7</sup>	ΤΟΜΗ ΦΥΛΛΟΥ	3 <sup>ο</sup> φύλλο	-	-	-	-	-	-	-	-
51	821	10 <sup>7</sup>	ΤΟΜΗ ΦΥΛΛΟΥ	3 <sup>ο</sup> φύλλο	-	-	-	-	-	-	-	-
52	821	10 <sup>7</sup>	ΤΟΜΗ ΦΥΛΛΟΥ	3 <sup>ο</sup> φύλλο	-	-	-	-	-	-	-	-
53	821	10 <sup>6</sup>	ΤΟΜΗ ΦΥΛΛΟΥ	3 <sup>ο</sup> φύλλο	-	-	-	-	-	-	-	-

A/A	Απομόνωση	CFU	Τρόπος μόλυνσης	Ηλικία	Μει. αναπτύξη	Διόγκωση βλ.	Σχίσμο βλ.	Κορυφή	Τομή	Plating	Striking	I.F.
154	821	10 <sup>6</sup>	ΤΟΜΗ ΦΥΛΛΟΥ	3 <sup>ο</sup> φύλλο	-	-	-	-	-	-	-	-
155	821	10 <sup>6</sup>	ΤΟΜΗ ΦΥΛΛΟΥ	3 <sup>ο</sup> φύλλο	-	-	-	-	-	-	-	-
156	821	10 <sup>4</sup>	ΤΟΜΗ ΦΥΛΛΟΥ	3 <sup>ο</sup> φύλλο	-	-	-	-	-	-	-	-
157	821	10 <sup>4</sup>	ΤΟΜΗ ΦΥΛΛΟΥ	3 <sup>ο</sup> φύλλο	-	-	-	-	-	-	-	-
158	821	10 <sup>4</sup>	ΤΟΜΗ ΦΥΛΛΟΥ	3 <sup>ο</sup> φύλλο	-	-	-	-	-	-	-	-
159	821	10 <sup>7</sup>	INJECTION	3 <sup>ο</sup> φύλλο	-	-	-	-	-	-	-	-
160	821	10 <sup>7</sup>	INJECTION	3 <sup>ο</sup> φύλλο	-	-	-	-	-	-	-	-
161	821	10 <sup>7</sup>	INJECTION	3 <sup>ο</sup> φύλλο	-	-	-	-	-	-	-	-
162	821	10 <sup>6</sup>	INJECTION	3 <sup>ο</sup> φύλλο	-	-	-	-	-	-	-	-
163	821	10 <sup>6</sup>	INJECTION	3 <sup>ο</sup> φύλλο	-	-	-	-	-	-	-	-
164	821	10 <sup>6</sup>	INJECTION	3 <sup>ο</sup> φύλλο	-	-	-	-	-	-	-	-
165	821	10 <sup>4</sup>	INJECTION	3 <sup>ο</sup> φύλλο	-	-	-	-	-	-	-	-
166	821	10 <sup>4</sup>	INJECTION	3 <sup>ο</sup> φύλλο	-	-	-	-	+	+	+	+
167	821	10 <sup>4</sup>	INJECTION	3 <sup>ο</sup> φύλλο	-	-	-	-	-	-	-	-

#### **1.4 Συμπεράσματα**

- Στο συνολικό δείγμα 167 φυτών:
- Σε 71 φυτά τα οποία μολύνθηκαν με την μέθοδο της σχισμής-ένεσης(μέσω της μεθόδου I.F.) εμφανίστηκε μετακίνηση του βακτηρίου (εντός του βλαστού) το οποίο ανιχνεύθηκε τόσο στο σημείο μόλυνσης όσο και στην κορυφή του φυτού.
- Σε 45 φυτά ανιχνεύθηκαν κύτταρα βακτηρίου στο σημείο τεχνητής μόλυνσης χωρίς αυτά να δείξουν εξωτερικά συμπτώματα μάρανσης για χρονικό διάστημα 45 ημερών.
- Η πλέον παθογόνος απομόνωση είναι η B.P.I.C. 1037 τόσο σε χρόνο εκδήλωσης συμπτωμάτων όσο και στην ένταση εμφάνισέως τους.
- Τα φυτά που μολύνθηκαν σε ηλικία 2<sup>ου</sup> φύλλου ήταν περισσότερο ευπαθή και εμφάνισαν διόγκωση βλαστού και έκπτυξη τυχαίων ριζών επί του βλαστού σε ποσοστό 80%,ενώ τα φυτά που μολύνθηκαν σε ηλικία 3<sup>ου</sup>

φύλλου ήταν ανθεκτικότερα και εμφάνισαν διόγκωση βλαστού και έκπτυξη τυχαίων ριζών επί του βλαστού σε ποσοστό 10%.

- Ο ρυθμός εκδήλωσης συμπτωμάτων είναι ανάλογος της συγκέντρωσης του αιωρήματος βακτηρίου.
- Ο περισσότερο “αποτελεσματικός” τρόπος τεχνητής μόλυνσης είναι αυτός της μεθόδου της ένεσης ο οποίος έδωσε το μεγαλύτερο ποσοστό εκδήλωσης της ασθένειας (44,4%) καθώς επίσης και η μόλυνση με την μέθοδο της σχισμής (42,5%). Η μόλυνση με τομή φύλλου έδειξε το μικρότερο ποσοστό εκδήλωσης της ασθένειας (18,5%).
- Ο βαθμός εκδήλωσης της ασθένειας είναι ανάλογος της ποσότητας μολύσματος (inoculum).





Εικ 3.3



Εικ 3.4

**2.Μελέτη ανθεκτικότητας φυτών τομάτας διαφορετικών ποικιλιών στο  
βακτήριο *Ralstonia solanacearum***

## **2.1 Περίληψη**

Στόχος της πειραματικής αυτής μελέτης είναι ο έλεγχος του βαθμού ανθεκτικότητας-ανεκτικότητας δεκατεσσάρων εισαγομένων ποικιλιών τομάτας στο βακτήριο *Ralstonia solanacearum*. Πραγματοποιήθηκαν τεχνητές μολύνσεις σε νεαρά φυτά τομάτας με αιώρημα του βακτηρίου *Ralstonia solanacearum* και απομόνωσης BPIC 1037 από την συλλογή του Μ.Φ.Ι. Οι τεχνητές μολύνσεις έγιναν με την συγκεκριμένη απομόνωση διότι έδειξε την μεγαλύτερη παθογένεια στα φυτά τομάτας της ποικιλίας AR-100. Οι μολύνσεις έγιναν σε φυτά ίδιας ηλικίας, με μια συγκέντρωση αιωρήματος βακτηρίου (C.F.U.), και με τον ίδιο τρόπο μόλυνσης (σχισμή βλαστού).

Στη συνέχεια λήφθησαν καθημερινά παρατηρήσεις για χρονικό διάστημα σαρανταπέντε ημερών.

## **2.2 Υλικά-Μέθοδοι**

### **2.2.1. Συνθήκες ανάπτυξης των φυτών**

Μολύνθηκαν φυτά των παρακάτω ποικιλιών τομάτας (φαγητού και βιομηχανίας):

<b>RED RIVER</b>	<b>PAKMOR</b>
<b>RIO ROJO</b>	<b>RED ROCK</b>
<b>RIO GRANDE</b>	<b>TOPER</b>
<b>PACIFIC</b>	<b>EARLY PAK No 7</b>
<b>PRINCE No 3</b>	<b>RIO FUEGO</b>
<b>PANTANO</b>	<b>ACE 55VF</b>
<b>ALMA</b>	<b>FLORAL DADG</b>

Σπόροι των παραπάνω ποικιλιών φυτεύθηκαν σε μεταλλικούς δίσκους εντός θερμοκηπίου σταθερής θερμοκρασίας 23-25°C και φωτοπεριόδου 16 ωρών. Μετά την πάροδο 14 ημερών τα φυτά μεταφυτεύθηκαν σε πλαστικά ποτήρια νερού που περιείχαν κομπόστα και στηρίχθηκαν με λεπτά ξύλα ώστε να αναπτυχθούν κατακόρυφοι βλαστοί. Τα νεαρά φυτά ποτίζονταν καθημερινά με μικρές ποσότητες νερού.

### 2.2.2. Λήψη αιωρήματος βακτηρίου

Ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία που περιγράφεται στην παράγραφο 1.2.2. με εξαίρεση τη χρησιμοποίηση μιας απομόνωσης (B.P.I.C. 1037). Οι συγκεντρώσεις που παρατηρήθηκαν στο μικροσκόπιο (μέσω της καταμέτρησης κυττάρων του βακτηρίου) για κάθε αραιώση ήταν οι παρακάτω:

Απομόνωση	B.P.I.C. 1037
Πυκνό διάλυμα	$0.97 \cdot 10^8$ c.f.u./ml
Αραίωση -1	$0.97 \cdot 10^7$ c.f.u./ml
Αραίωση -2	$0.97 \cdot 10^6$ c.f.u./ml
Αραίωση -3	$0.97 \cdot 10^5$ c.f.u./ml
Αραίωση -4	$0.97 \cdot 10^4$ c.f.u./ml

Οι προαναφερθείσες συγκεντρώσεις βασίζονται σε οπτική καταμέτρηση και περιλαμβάνουν και νεκρά κύτταρα βακτηρίου, εξαιτίας αυτού πραγματοποιείται και εξάπλωση (plating) αιωρήματος βακτηρίου όπως περιγράφεται στην παράγραφο 1.2.3. (με εξαίρεση ότι αντί του θρεπτικού υλικού N.A.D. χρησιμοποιήθηκε το υλικό S.M.S.A. το οποίο είναι εκλεκτικό υλικό ανάπτυξης του *Ralstonia solanacearum*.) με στόχο την ανάπτυξη καλλιεργειών για τον ακριβή προσδιορισμό της συγκέντρωσης του βακτηρίου. Με αυτόν τον τρόπο προκύπτει ο αριθμός των ζώντων κυττάρων βακτηρίου και ακολούθως ο αριθμός κυττάρων που αντιστοιχεί στη δόση μολύσματος ανά φυτό (5μl):

Απομόνωση	B.P.I.C. 1037
Πυκνό αιώρημα	$1,34 \cdot 10^4$ c.f.u./5μl
Αραίωση -1	$1,34 \cdot 10^3$ c.f.u./5μl
Αραίωση -2	$1,34 \cdot 10^2$ c.f.u./5μl
Αραίωση -3	1,34.10 c.f.u./5μl
Αραίωση -4	1,34 c.f.u./5μl

### 2.2.3. Τεχνητές μολύνσεις

Για τις μολύνσεις χρησιμοποιήθηκε το πυκνό αιώρημα βακτηρίου C.F.U.:  $1,34 \cdot 10^4$  c.f.u. ανά 5μl μολύσματος που χρησιμοποιήθηκαν ανά φυτό. Οι μολύνσεις πραγματοποιήθηκαν σε φυτά ηλικίας 29 ημερών και σταδίου ανάπτυξης δευτέρου φύλλου. Χρησιμοποιήθηκαν τρεις επαναλήψεις και ένας αρνητικός μάρτυρας ανά ποικιλία. Η μόλυνση έγινε με την μέθοδο της σχισμής όπως αυτή περιγράφεται στην παράγραφο 1.2.3.1.

### 2.3 Αποτελέσματα

Μετά την πραγματοποίηση των μολύνσεων τα φυτά τοποθετήθηκαν ανά 21 σε πλαστικούς δίσκους σε θάλαμο ελεγχόμενων συνθηκών (Θερμοκρασίας 23-25°C και φωτοπεριόδου 16 ωρών) .Για να αποφευχθεί η μεταφορά του μολύσματος μέσω του νερού τα φυτά ποτίζονταν με μικρές ποσότητες νερού και με την βοήθεια υδροβολέα.Η παρατήρηση και καταγραφή των συμπτωμάτων έγινε για χρονική διάρκεια 45 ημερών και συνοπτικά τα αποτελέσματα έχουν ως εξής:

Σε σύνολο 42 τεχνητά μολυσμένων φυτών τομάτας

- 15 φυτά δεν παρουσίασαν καμία επιπλοκή στην ανάπτυξη τους σε σχέση με τους αρνητικούς μάρτυρες.
- 42 φυτά παρουσίασαν διόγκωση του βλαστού στο σημείο μόλυνσης.
- 27 φυτά εμφάνισαν μειωμένη ανάπτυξη καθ' ύψος σε σχέση με τους αρνητικούς μάρτυρες.
- 22 φυτά ανέπτυξαν μίσχους 2<sup>ου</sup> και 3<sup>ου</sup> φύλλου οι οποίοι είχαν διπλάσια διάμετρο σε σχέση με τους αρνητικούς μάρτυρες.

Μετά την πάροδο των 45 ημερών τα φυτά απομακρύνθηκαν 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 ανεξάρτητα αν έδειξαν η όχι συμπτώματα σύμφωνα με την διαδικασία που περιγράφεται στην παράγραφο 1.3 με εξαίρεση ότι αντί του θρεπτικού υλικού N.A.D. χρησιμοποιήθηκε το υλικό S.M.S.A. το οποίο είναι εκλεκτικό υλικό ανάπτυξης του *Ralstonia solanacearum*.Τα τελικά αποτελέσματα φαίνονται αναλυτικά στον πίνακα 2 που ακολουθεί:

## ΠΙΝΑΚΑΣ 2:ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

A/A	Ποικιλία	Σημ.τομής	Κορυφή	Διόγκωση	Μειωμ.Ανάπτυξη	Striking	I.F.
1	ACE 55VF	+	+	+	+	+	+
2	ACE 55VF	+	+	+	+	+	+
3	ACE 55VF	+	+	+	-	+	+
4	PANTANO	+	+	+	+	+	+
5	PANTANO	+	+	+	-	+	+
6	PANTANO	+	+	+	-	+	+
7	RED ROCK	+	+	+	+	+	+
8	RED ROCK	+	+	+	+	+	+
9	RED ROCK	+	+	+	+	+	+
10	RIO FUEGO	+	+	+	+	+	+
11	RIO FUEGO	+	+	+	+	+	+
12	RIO FUEGO	+	+	+	+	+	+
13	ALMA	+	+	+	+	+	+
14	ALMA	+	+	+	-	+	+
15	ALMA	+	+	+	+	+	+
16	FLORAL DADG	+	+	+	+	+	+
17	FLORAL DADG	+	+	+	+	+	+
18	FLORAL DADG	+	+	+	+	+	+
19	RIO ROJO	+	+	+	+	+	+
20	RIO ROJO	+	+	+	-	+	+
21	RIO ROJO	+	+	+	-	+	+
22	TOPER	+	+	+	-	+	+
23	TOPER	+	+	+	+	+	+
24	TOPER	+	+	+	-	+	+
25	PRINCE No 3	+	+	+	-	+	+
26	PRINCE No 3	+	+	+	+	+	+
27	PRINCE No 3	+	+	+	+	+	+
28	PAKMOR	+	+	+	+	+	+
29	PAKMOR	+	+	+	+	+	+

A/A	Ποικιλία	Σημ.τομής	Κορυφή	Διόγκωση	Μειωμ.Ανάπτυξη	Striking	I.F.
30	PAKMOR	+	+	+	-	+	+
31	PACIFIC	+	+	+	-	+	+
32	PACIFIC	+	+	+	+	+	+
33	PACIFIC	+	+	+	+	+	+
34	EARLY PAK	+	+	+	+	+	+
35	EARLY PAK	+	+	+	-	+	+
36	EARLY PAK	+	+	+	+	+	+
37	RED RIVER	+	+	+	+	+	+
38	RED RIVER	+	+	+	+	+	+
39	RED RIVER	+	+	+	-	+	+
40	RIO GRANDE	+	+	+	-	+	+
41	RIO GRANDE	+	+	+	+	+	+
42	RIO GRANDE	+	+	+	-	+	+

### 3.4 Συμπεράσματα

- Σε 42 φυτά (μέσω της μεθόδου I.F.) εμφανίστηκε μετακίνηση του βακτηρίου (εντός του βλαστού) το οποίο ανιχνεύθηκε τόσο στο σημείο επέμβασης όσο και στην κορυφή του φυτού.
- Οι ποικιλίες **Pantano,Rio rojo** εμφάνισαν την μεγαλύτερη ανεκτικότητα στην ύπαρξη του βακτηρίου το οποίο δεν εμπόδισε την καθ' ύψος ανάπτυξη τους σε δυο από τους τρεις θετικούς μάρτυρες.
- Στις ποικιλίες **Rio grande,Red river,Early pak,Pakmor,Pacific,Prince No3,Toper,Alma,Age 55VF** ένας εκ των τριών θετικών μαρτύρων αναπτύχθηκε φυσιολογικά καθ' ύψος συγκριτικά με τον αρνητικό μάρτυρα.
- Οι ποικιλίες **Red rock,Rio fuego,Floral dadg** εμφάνισαν μειωμένη ανάπτυξη και στους τρεις θετικούς μάρτυρες.



- Σε όλες τις ποικιλίες και σε όλους τους θετικούς μάρτυρες παρατηρήθηκε μετακίνηση του βακτηρίου από το σημείο μόλυνσης στην κορυφή του φυτού.
- Στις ποικιλίες **Rio grande, Red river, Early pak, Red rock, Pacific, Floral dadg** παρατηρήθηκε εκδήλωση συμπτωμάτων της βακτηριακής μάρανσης.



Εικ 4.1



Εικ 4.2

**3.Μελέτη ανθεκτικότητας δέκα ποικιλιών φυτών πατάτας στο  
*Ralstonia solanacearum***

### **3.1 Περίληψη**

Στόχο της πειραματικής αυτής μελέτης είναι ο έλεγχος του βαθμού ανθεκτικότητας-ανεκτικότητας δέκα εισαγομένων ποικιλιών σπόρου πατάτας. Πραγματοποιήθηκαν τεχνητές μολύνσεις σε νεαρά φυτά πατάτας με αιώρημα του βακτηρίου *Ralstonia solanacearum* και απομόνωσης BPIC 1037 από την συλλογή του Μ.Φ.Ι. Οι μολύνσεις έγιναν σε φυτά ίδιας ηλικίας, με μια συγκέντρωση αιωρήματος βακτηρίου (C.F.U.), και με τον ίδιο τρόπο μόλυνσης (σχισμή βλαστού).

Στη συνέχεια λήφθησαν καθημερινά παρατηρήσεις συμπτωμάτων για χρονικό διάστημα σαρανταπέντε ημερών.

### **3.2 Υλικά-Μέθοδοι**

#### **3.2.1. Συνθήκες ανάπτυξης των φυτών**

Μολύνθηκαν φυτά των παρακάτω ποικιλιών πατάτας :

<b>SPUNTA</b>	<b>RODEO</b>
<b>LISSETTA</b>	<b>ARNOVA</b>
<b>ARMADA</b>	<b>FABULA</b>
<b>MARANCA</b>	<b>DERBY</b>
<b>MONDIAL</b>	<b>HERMES</b>

Κόνδυλοι των παραπάνω ποικιλιών τοποθετήθηκαν σε χάρτινα κιβώτια και καλύφθηκαν με διηθητικό χαρτί (το οποίο διατηρήθηκε νωπό) για προβλάστηση σε σκοτεινό χώρο για διάστημα 18 ημερών. Στη συνέχεια τέσσερις κόνδυλοι ανά ποικιλία φυτεύθηκαν σε πλαστικές γλάστρες διαμέτρου 20

εκ.Επίσης φυτεύθηκαν δυο κόνδυλοι ανά ποικιλία υπό τις ίδιες συνθήκες ως αρνητικοί μάρτυρες.Τα φυτά αφού στηρίχθηκαν με την βοήθεια ξύλινων ράβδων τοποθετήθηκαν σε θερμοκήπιο.

### 3.2.2.Λήψη αιωρήματος βακτηρίου

Ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία που περιγράφεται στην παράγραφο 1.2.2. με εξαίρεση τη χρησιμοποίηση μιας απομόνωσης (B.P.I.C. 1037).Οι συγκεντρώσεις που παρατηρήθηκαν στο μικροσκόπιο (μέσω της καταμέτρησης κυττάρων του βακτηρίου) για κάθε αραιώση ήταν οι παρακάτω:

Απομόνωση	B.P.I.C. 1037
Πυκνό διάλυμα	$1,17 \cdot 10^7$ c.f.u./ml
Αραιώση -1	$1,17 \cdot 10^6$ c.f.u./ml
Αραιώση -2	$1,17 \cdot 10^5$ c.f.u./ml
Αραιώση -3	$1,17 \cdot 10^4$ c.f.u./ml
Αραιώση -4	$1,17 \cdot 10^3$ c.f.u./ml

Οι προαναφερθείσες συγκεντρώσεις βασίζονται σε οπτική καταμέτρηση και περιλαμβάνουν και νεκρά κύτταρα βακτηρίου,εξαιτίας αυτού πραγματοποιείται και εξάπλωση (plating) αιωρήματος βακτηρίου όπως περιγράφεται στην παράγραφο 1.2.3. (με εξαίρεση ότι αντί του θρεπτικού υλικού N.A.D. χρησιμοποιήθηκε το υλικό S.M.S.A. το οποίο είναι εκλεκτικό υλικό ανάπτυξης του *Ralstonia solanacearum*.)με στόχο την ανάπτυξη καλλιεργειών για τον ακριβή προσδιορισμό της συγκέντρωσης του βακτηρίου. Με αυτόν τον τρόπο προκύπτει ο αριθμός των ζώντων κυττάρων βακτηρίου και

ακολούθως υπολογίζεται ο αριθμός κυττάρων που αντιστοιχεί στη δόση μολύσματος ανά φυτό (5μl):

Απομόνωση	B.P.I.C. 1037
Πυκνό αιώρημα	$1,22 \cdot 10^4$ c.f.u./5μl
Αραίωση -1	$1,22 \cdot 10^3$ c.f.u./5μl
Αραίωση -2	$1,22 \cdot 10^2$ c.f.u./5μl
Αραίωση -3	12,2 c.f.u./5μl
Αραίωση -4	1,22 c.f.u./5μl

### **3.2.3. Τεχνητές μολύνσεις**

Για τις μολύνσεις χρησιμοποιήθηκε το πυκνό αιώρημα βακτηρίου  $1,22 \cdot 10^4$  c.f.u. ανά 5μl μολύσματος που χρησιμοποιήθηκαν ανά φυτό. Οι μολύνσεις πραγματοποιήθηκαν σε φυτά πατάτας ηλικίας 26 ημερών ( και σταδίου ανάπτυξης δευτέρου φύλλου. Πραγματοποιήθηκαν τέσσερις επαναλήψεις και δυο αρνητικοί μάρτυρες ανά ποικιλία. Η μόλυνση έγινε με την μέθοδο της σχισμής όπως αυτή περιγράφεται στην παράγραφο 1.2.3.1.

### **3.3 Αποτελέσματα**

Μετά την πραγματοποίηση των μολύνσεων τα φυτά τοποθετήθηκαν σε θερμοκήπιο με φυσικό φωτισμό και μη σταθερή θερμοκρασία .Η παρατήρηση και καταγραφή των συμπτωμάτων έγινε για χρονική διάρκεια 45 ημερών και κανένα φυτό δεν έδειξε εμφανή συμπτώματα “βακτηριακής μάρανσης”.

Μετά την πάροδο των 45 ημερών τα φυτά απομακρύνθηκαν από το θερμοκήπιο με σκοπό την ανίχνευση του παθογόνου εργαστηριακά έτσι ώστε να αποδειχθεί η τυχόν παρουσία του βακτηρίου. Ελήφθησαν απομονώσεις από τα φυτά που μολύνθηκαν ανεξάρτητα αν έδειξαν η όχι συμπτώματα σύμφωνα με

την διαδικασία. που περιγράφεται στην παράγραφο 1.3 με εξαίρεση ότι αντί του θρεπτικού υλικού N.A.D. χρησιμοποιήθηκε το υλικό S.M.S.A. το οποίο είναι εκλεκτικό υλικό ανάπτυξης του *Ralstonia solanacearum*. Τα τελικά αποτελέσματα φαίνονται αναλυτικά στο πίνακα που ακολουθεί:

ΠΙΝΑΚΑΣ 3: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

A/A	Ποικιλία	Σημ.τομής	Κορυφή φυτού	Striking	I.F.
1	Lisetta	+	+	+	+
2	Lisetta	+	+	+	+
3	Lisetta	+	+	+	+
4	Lisetta	+	+	+	+
5	Mondial	+	+	+	+
6	Mondial	+	+	+	+
7	Mondial	-	-	-	-
8	Mondial	+	+	+	+
9	Arnova	-	-	-	-
10	Arnova	+	+	+	+
11	Arnova	+	+	+	+
12	Arnova	+	+	+	+
13	Maranca	+	+	+	+
14	Maranca	+	+	+	+
15	Maranca	+	+	+	+
16	Maranca	+	+	+	+
17	Derby	+	+	+	+
18	Derby	+	+	+	+
19	Derby	+	+	+	+
20	Derby	+	+	+	+

A/A	Ποικιλία	Σημ.τομής	Κορυφή φυτό	Striking	I.F.
21	Rodeo	+	+	-	+
22	Rodeo	+	+	+	+
23	Rodeo	+	+	+	+
24	Rodeo	+	+	+	+
25	Hermes	+	+	+	+
26	Hermes	-	-	-	-
27	Hermes	+	+	+	+
28	Hermes	+	+	+	+
29	Armada	+	+	+	+
30	Armada	-	-	-	-
31	Armada	+	+	+	+
32	Armada	+	+	+	+
33	Fabula	+	+	+	+
34	Fabula	+	+	+	+
35	Fabula	-	-	-	-
36	Fabula	+	+	+	+
37	Spunta	+	+	+	+
38	Spunta	+	+	+	+
39	Spunta	+	+	+	+
40	Spunta	+	+	+	+



### **3.4 Συμπεράσματα**

Σε σύνολο 40 τεχνητά μολυσμένων φυτών:

- Ανιχνεύθηκε το βακτήριο σε 35 φυτά τόσο στο σημείο μόλυνσης όσο και στην κορυφή του στελέχους.
- Κανένα φυτό σε διάστημα 45 ημερών δεν έδειξε τα συμπτώματα της βακτηριακής μάρανσης.
- Σε 5 φυτά δεν ανιχνεύθηκε το βακτήριο

**4.Μελέτη ανθεκτικότητας φυτών της Οικογένειας *Solanaceae* στο βακτήριο  
*Ralstonia solanacearum***

## **4.1 Περίληψη**

Στόχο της πειραματικής αυτής μελέτης είναι ο έλεγχος και ο βαθμός ανθεκτικότητας-ανεκτικότητας διαφόρων φυτών της οικογ. *Solanaceae* και συγκεκριμένα καλλιεργούμενων: πιπεριά (ποικ. Paola, Sweet stamboli), μελιτζάνα (ποικ. Mirabelle, Black beauty), ανθοκομικών: Πετούνια (*Petunia hybrida*), Νικοτιανή (*Nicotiana alata*), Σχίζανθος (*Schizanthus pinnatus*) ζιζανίων: Ντάτουρας (*Datura stramonium*), Στίφνος (*Solanum nigrum*). Πραγματοποιήθηκαν τεχνητές μολύνσεις σε νεαρά φυτά με αιώρημα του βακτηρίου *Ralstonia solanacearum* και απομόνωσης BPIC 1037 από την συλλογή του Μ.Φ.ΙΟι μολύνσεις έγιναν σε φυτά ίδιας ηλικίας, με μια συγκέντρωση αιωρήματος βακτηρίου (C.F.U.), και με τον ίδιο τρόπο μόλυνσης (σχισμή βλαστού με εξαίρεση τα ζιζάνια).

Στη συνέχεια λήφθησαν καθημερινά μετρήσεις παθογένειας για χρονικό διάστημα σαρανταπέντε ημερών.

## **4.2 Υλικά-Μέθοδοι**

### **4.2.1. Συνθήκες ανάπτυξης των φυτών**

Σπόροι των παραπάνω ποικιλιών φυτεύθηκαν σε μεταλλικούς δίσκους εντός θερμοκηπίου σταθερής θερμοκρασίας 23-25°C και φωτοπεριόδου 14 ωρών. Μετά την πάροδο 30 ημερών για τα καλλιεργούμενα, 37 ημερών για τα ζιζάνια, 36 ημερών για τα ανθοκομικά τα φυτά μεταφυτεύθηκαν σε πλαστικά ποτήρια νερού που περιείχαν κομπόστα και στηρίχθηκαν με λεπτά ξύλα ώστε να αναπτυχθούν κατακόρυφοι βλαστοί. Τα νεαρά φυτά ποτίζονταν καθημερινά με μικρές ποσότητες νερού.

#### 4.2.2.Λήψη αιωρήματος βακτηρίου

Ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία που περιγράφεται στην παράγραφο 1.2.2. με εξαίρεση τη χρησιμοποίηση μιας απομόνωσης (B.P.I.C. 1037). Οι συγκεντρώσεις που παρατηρήθηκαν στο μικροσκόπιο (μέσω της καταμέτρησης κυττάρων του βακτηρίου) για κάθε αραιώση ήταν οι παρακάτω:

Απομόνωση	B.P.I.C. 1037
Πυκνό διάλυμα	$0.25 \cdot 10^8$ c.f.u./ml
Αραιώση -1	$0.25 \cdot 10^7$ c.f.u./ml
Αραιώση -2	$0.25 \cdot 10^6$ c.f.u./ml
Αραιώση -3	$0.25 \cdot 10^5$ c.f.u./ml
Αραιώση -4	$0.25 \cdot 10^4$ c.f.u./ml

Οι προαναφερθείσες συγκεντρώσεις βασίζονται σε οπτική καταμέτρηση και περιλαμβάνουν και νεκρά κύτταρα βακτηρίου, εξαιτίας αυτού πραγματοποιείται και εξάπλωση (plating) αιωρήματος βακτηρίου όπως περιγράφεται στην παράγραφο 1.2.3. (με εξαίρεση ότι αντί του θρεπτικού υλικού N.A.D. χρησιμοποιήθηκε το υλικό S.M.S.A. το οποίο είναι εκλεκτικό υλικό ανάπτυξης του *Ralstonia solanacearum*.) με στόχο την ανάπτυξη καλλιεργειών για τον ακριβή προσδιορισμό της συγκέντρωσης του βακτηρίου. Με αυτόν τον τρόπο υρολογίζεται ο αριθμός των ζώντων κυττάρων βακτηρίου που αντιστοιχεί στη δόση μολύσματος ανά φυτό (5μl):

Απομόνωση	B.P.I.C. 1037
Πυκνό αιώρημα	$1,06 \cdot 10^5$ c.f.u./5μl
Αραίωση -1	$1,06 \cdot 10^4$ c.f.u./5μl
Αραίωση -2	$1,06 \cdot 10^3$ c.f.u./5μl
Αραίωση -3	$1,06 \cdot 10^2$ c.f.u./5μl
Αραίωση -4	10,6 c.f.u./5μl

### **4.2.3. Τεχνητές μολύνσεις**

Για τις μολύνσεις χρησιμοποιήθηκε το πυκνό αιώρημα βακτηρίου  $1,06 \cdot 10^5$  c.f.u. ανά 5μl μολύσματος που χρησιμοποιήθηκαν ανά φυτό. Οι μολύνσεις πραγματοποιήθηκαν σε φυτά σταδίου ανάπτυξης δευτέρου φύλλου. Χρησιμοποιήθηκαν τρεις επαναλήψεις και ένας αρνητικός μάρτυρας ανά είδος και ποικιλία. Η μόλυνση έγινε με την μέθοδο της σχισμής όπως αυτή περιγράφεται στην παράγραφο 1.2.3.1. εκτός από τις μολύνσεις των ζιζανίων οι οποίες πραγματοποιήθηκαν με την παρακάτω διαδικασία:

Σε ποτήρι ζέσεως (20ml) τοποθετήθηκε αιώρημα βακτηρίου. Στη συνέχεια αφού βγήκε το φυτό από το πλαστικό ποτήρι απομακρύνθηκε το χώμα από τις ρίζες. Το ριζικό σύστημα ξεπλύθηκε σε απιονισμένο νερό και με την βοήθεια αποστειρωμένου νυστεριού αφαιρέθηκε ένα μικρό μέρος του ριζικού συστήματος. Έγινε εμβάπτιση του ριζικού συστήματος του φυτού στο αιώρημα του βακτηρίου για 10 sec.. Στη συνέχεια το φυτό φυτεύθηκε σε πλαστικό δοχείο.

### 4.3 Αποτελέσματα

Μετά την πραγματοποίηση των μολύνσεων τα φυτά τοποθετήθηκαν ανά κατηγορία σε πλαστικούς δίσκους σε θάλαμο ελεγχόμενων συνθηκών (Θερμοκρασίας 23-25°C και φωτοπεριόδου 14 ωρών) .Για να αποφευχθεί η μεταφορά του μολύσματος μέσω του νερού τα φυτά ποτίζονταν με μικρές ποσότητες νερού και με την βοήθεια υδροβολέα.Η παρατήρηση και καταγραφή των συμπτωμάτων έγινε για χρονική διάρκεια 45 ημερών και συνοπτικά τα αποτελέσματα έχουν ως εξής:

- Στα καλλιεργούμενα φυτά δεν επηρεάστηκε η ανάπτυξη τους σε σχέση με τους αρνητικούς μάρτυρες.
- Τα ανθοκομικά παρουσίασαν μειωμένη ανάπτυξη (καθ'ύψος) και δεν άνθισαν συγκριτικά με τους αρνητικούς μάρτυρες.
- Τα ζιζάνια εμφάνισαν μειωμένη ανάπτυξη (καθ'ύψος) και άνθισαν φυσιολογικά.
- Κανένα φυτό δεν εμφάνισε διόγκωση βλαστού στο σημείο επέμβασης.

Μετά την πάροδο των 45 ημερών τα φυτά απομακρύνθηκαν από το θερμοκήπιο με σκοπό την ανίχνευση του παθογόνου εργαστηριακά έτσι ώστε να αποδειχθεί η τυχόν παρουσία του βακτηρίου.Ελήφθησαν απομονώσεις από τα φυτά που μολύνθηκαν ανεξάρτητα αν έδειξαν η όχι συμπτώματα σύμφωνα με την διαδικασία. που περιγράφεται στην παράγραφο 1.3 με εξαίρεση ότι αντί του θρεπτικού υλικού N.A.D. χρησιμοποιήθηκε το υλικό S.M.S.A. το οποίο είναι εκλεκτικό υλικό ανάπτυξης του *Ralstonia solanacearum*.Τα αποτελέσματα φαίνονται αναλυτικά στον πίνακα που ακολουθεί:

## ΠΙΝΑΚΑΣ 4: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

A/A	Είδος Φυτού	Ποικιλία	Σημ. τομής	Κορυφή	Μειομ. ανάπτυξη	Striking	I.F.
1	Νικοτιανή		+	+	+	+	+
2	Νικοτιανή		+	+	+	+	+
3	Νικοτιανή		+	+	+	+	+
4	Σχιζανθος		+	+	-	+	+
5	Σχιζανθος		+	+	-	+	+
6	Σχιζανθος		+	+	-	+	+
7	Πετούνια		+	+	+	+	+
8	Πετούνια		+	+	+	+	+
9	Πετούνια		+	+	+	+	+
10	Πιπεριά	Sweet stambolli	+	+	-	+	+
11	Πιπεριά	Sweet stambolli	+	+	-	+	+
12	Πιπεριά	Sweet stambolli	+	+	-	+	+
13	Πιπεριά	Paola	+	+	-	+	+
14	Πιπεριά	Paola	+	+	-	+	+
15	Πιπεριά	Paola	+	+	-	+	+
16	Μελιτζάνα	Mirabelle	+	+	-	+	+
17	Μελιτζάνα	Mirabelle	+	+	-	+	+
18	Μελιτζάνα	Mirabelle	+	+	-	+	+
19	Μελιτζάνα	Black beauty	+	+	-	+	+
20	Μελιτζάνα	Black beauty	+	+	-	+	+
21	Μελιτζάνα	Black beauty	+	+	-	+	+
22	Ντάτουρας		+	+	-	+	+
23	Ντάτουρας		+	+	+	+	+
24	Ντάτουρας		+	+	+	+	+
25	Στίφνος		+	+	+	+	+

A/A	Είδος Φυτού	Ποικιλία	Σημ. τομής	Κορυφή	Μειωμ. ανάπτυξη	Striking	I.F.
26	Στίφνος		+	+	-	+	+
27	Στίφνος		+	+	+	+	+

#### 4.4 Συμπεράσματα

- Τα καλλιεργούμενα φυτά (Πιπεριά ,Μελιτζάνα) αναπτύχθηκαν κανονικά καθ' ύψος συγκριτικά με τους αρνητικούς μάρτυρες και το βακτήριο ανιχνεύθηκε τόσο στο σημείο μόλυνσης όσο και στην κορυφή των φυτών χωρίς να εμφανίσει συμπτώματα για χρονικό διάστημα 45 ημερών.
- Τα ανθοκομικά φυτά (Νικοτιανή ,Σχίζανθος ,Πετούνια) είχαν μειωμένη ανάπτυξη και το βακτήριο ανιχνεύθηκε τόσο στο σημείο μόλυνσης όσο και στην κορυφή του φυτού χωρίς να εμφανίσει τα συμπτώματα της βακτηριακής μάρανσης.
- Τα ζιζάνια (Ντάτουρας ,Στίφνος) είχαν μειωμένη ανάπτυξη και το βακτήριο ανιχνεύθηκε στο σημείο μόλυνσης και στην κορυφή των φυτών χωρίς να εκδηλώσει συμπτώματα για το διάστημα των 45 ημερών.



## ΓΕΝΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα πτυχιακή μελέτη εξετάστηκε η ανθεκτικότητα της τομάτας και διαφόρων φυτών της Οικογ.*Solanaceae* στο βακτήριο *Ralstonia solanacearum*.

Στα φυτά τομάτας εμφανίστηκε μετακίνηση του βακτηρίου(μέσο των αγγείων)στο βλαστό σε ποσοστό 54% σε διάστημα 45 ημερών.Στα υπόλοιπα φυτά το βακτήριο ανιχνεύθηκε στο σημείο τεχνητής μόλυνσης εκτός ελαχίστων στα οποία δεν ανιχνεύθηκε το βακτήριο.Ο ρυθμός εκδήλωσης συμπτωμάτων εξαρτάται από από την ηλικία των φυτών.Σε νεαρά φυτά τα συμπτώματα της ασθένειας εκδηλώνονται σε χρονικό διάστημα 5-10 ημερών.Όσο μεγαλώνει το φυτό καθυστερεί και η εκδήλωση των συμπτωμάτων ακόμα και άνω των 45 ημερών το οποίο πρακτικά σημαίνει ακόμη και την λήψη της συγκομιδής ή μέρους αυτής.Το μεγάλο ποσοστό επιτυχίας της μόλυνσης με σχισμή βλαστού-τομής φύλλου υποδηλώνει την προσοχή που πρέπει να δίνεται ώστε να αποφεύγονται οι τραυματισμοί των φυτών με τις καλλιεργητικές φροντίδες γεγονός το οποίο έχει ως αποτέλεσμα την μετάδοση της ασθένειας στα υγιή φυτά.Η εκδήλωση της ασθένειας ευνοείται από τις υψηλές τιμές υγρασίας-θερμοκρασίας.Οι ανεκτικότερες ποικιλίες ως προς την εκδήλωση συμπτωμάτων είναι οι: Pantano,Rio rojo (για τις απομονώσεις BPIC 1037,BPIC 828,BPIC 821).

Στα φυτά πατάτας παρόλο που σε διάστημα 45 ημερών κανένα φυτό δεν εμφάνισε συμπτώματα βρέθηκε εργαστηριακά ότι το βακτήριο μετακινήθηκε από το σημείο τεχνητής μόλυνσης στην κορυφή του φυτού σε ποσοστό 87,5%.Εμφανή συμπτώματα της ασθένειας δεν εκδηλώθηκαν και στα καλλιεργούμενα φυτά (πιπεριά ,μελιτζάνα)στα οποία επίσης ανιχνεύθηκε μετακίνηση του βακτηρίου στο ίδιο χρονικό διάστημα.

Στα ανθοκομικά φυτά παρατηρήθηκε μειωμένη ανάπτυξη και ανθοφορία ,φαινόμενο το οποίο εμφανίστηκε και στα ζιζάνια και πρακτικά στην περίπτωση των ανθοκομικών φυτών σημαίνει την ολοκληρωτική απώλεια της παραγωγής.

Γενικότερα ιδιαίτερη προσοχή θα πρέπει να δίνεται στην απολύμανση του εδάφους πριν την εγκατάσταση μιας καλλιέργειας των παραπάνω φυτών λόγω της ιδιότητας του βακτηρίου να διαβιώνεται στο έδαφος μέσω των ζιζανίων.Τέλος κρίνεται αναγκαία η εξέταση του νερού άρδευσης μέσο του οποίου είναι δυνατή η εξάπλωση του βακτηρίου.

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΥΛΙΚΩΝ

- **N.A.** : Nutrient broth (Difco) 8 gr  
Bacto agar (Difco) 15 gr  
Απεσταγμένο νερό 1 λίτρο
- **N.A.D.** : Nutrient broth (Difco) 3gr  
Bacto agar (Difco) 12gr  
D(+γλυκόζη) 10gr
- **N.A.G.** : Nutrient broth (Difco) 3gr  
Bacto agar (Difco) 12gr  
Glycerol 20ml
- **PBS (0,01M)** :  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  2,7gr  
 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0,4gr  
NaCL 8 gr  
Απεσταγμένο νερό 1 λίτρο
- **Αντιορός R.s.** : Πολυκλωνικό αντίσωμα από κουνέλι από την  
Συλλογή του Μ.Φ.Ι.αραιωμένο σε αναλογία  
1:800 με PBS (0,01 M)
- **F.I.T.C.** : FITC Conjugate (SIGMA)  
Antibody developed in Goat  
Anti-rabbit IgG  
Αραίωση 1:50 με Pbs (0.01M)
- **Κυκλοεξαμείδη** : Cyclohexamide (SIGMA)  
From Streptomyces griseus  
Αναλογία 2% σε απεσταγμένο νερό

- **S.M.S.A.** : Casamino acids (Difco) 1gr  
 Bacto peptone (Difco) 10gr  
 Γλυκερίνη 5 ml  
 Nutrient agar (Difco) 15gr  
 Αποσταγμένο νερό 1λίτρο  
 Ακολουθεί αποστείρωση(121°C), έλεγχος pH (6,5)  
 και προσθήκη των παρακάτω ουσιών (αντιβιοτικών) :  
 Crystal violet 5mgr  
 Θεικη πολυμιξίνη-B 100 mgr  
 Βακιτρακίνη 25 mgr  
 Χλωραμφενικόλη 5 mgr  
 Πενικιλίνη-G 0,5 mgr  
 Άλατα τετραζολίου 50 mgr

## **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

- BAGINSKA H.,KORDYLA-BRONCA M.(1998) :*Ralstonia solanacearum*-the potential to crops in Poland.
- BRADBURY J.F.(1986) : Guide to plant pathogenic bacteria.p.54-57
- FREY P.,PRIOR P.,TRIGALET-DEMERY,MARIE C.,KOTOYJANSKY A.(1986) : Advances in biological control to tomato bacterial wilt using genetically engineered avirulent mutants of *Ralstonia solanacearum*
- GANDEER H.,YANG-CHANGSISEN,YANG C.H.(1999) : A single locus leads to resistance of *Arabidopsis thaliana* to bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum* through a hypersensitive-like response.
- GUNSALUS I.G.,STANIER R.Y.(1960) : The bacteria p.62-74 (VOLUME 1)
- KRIEG N.R.,HOLT J.G.(1984) : Systematic bacteriology p.125-128
- LAPAGE S.P.,SNEATH P.H.,LESSEL E.F.,SKERMAN V.B.,SEELIGER H.P.,CLARK W.A.(1975) : p.151-158
- LIN J.C.,HSU S.T.,TSENG K.C.(1999) : Weed hosts of *Ralstonia solanacearum* in Taiwan.
- LELLIOTT R.A.,STEAD D.E.(1987) : Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants.p.84-89.
- LELLIOTT R.A.,SMITH I.M.,DUNEZ J.PHILLIPS D.H.,ARCHER S.A.(1986) : European handbook of plant diseases.p.37-42,885-889,963-968.
- LEMATTRE M.,FREIGOUN S.,RUDOLPH K.,SWING J.G.(1992) : Plant pathogenic bacteria.p.25-28,124-128.
- ΠΑΝΑΓΟΠΟΥΛΟΣ Χ.(1995) : Ασθένειες κηπευτικών καλλιεργειών σελ.113-117.

- PRADHANANG P.M.,ELPHINSTONE J.K.(2000) : Identification of crop and weed hosts of *Ralstonia solanacearum* biovar 2 in the hills of Nepal.
- PSALLIDAS P.G.(1989) : Characteristics of Greek isolates of *Ralstonia solanacearum*.
- SEQUEIRA L.(1986) : The life and times of *Ralstonia solanacearum*
- TRIGALET A.(1986) : Advances in biological control of bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum*.
- WEIDE R.Y.,RIDDER J.K.(2000) : *Solanum dulcamara* as host plant for brown rot.
- WENNEKER M.,VERDEL M.S.W.,KEMPENAAR C.,JANSE J.D.(1999) : *Ralstonia solanacearum* race 3 ,causal agent of potato brown rot,in surface water and natural weed hosts.
- WRIGHT A.J.(1998) : Legislative measures to prevent the introduction and spread of *Ralstonia solanacearum* in the European Union.
- ΖΑΧΟΣ (1957) : Η υπό του βακτηρίου *Pseudomonas solanacearum* προκαλούμενη σήψις των γεωμήλων εν Ελλάδι.Χρονικά Μπενακείου Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου.σελ: 125-127
- ΖΑΧΟΣ (1962) : Ασθένειαι των γεωμήλων.Μπενάκειο Φυτοπαθολογικό Ινστιτούτο.σελ: 145