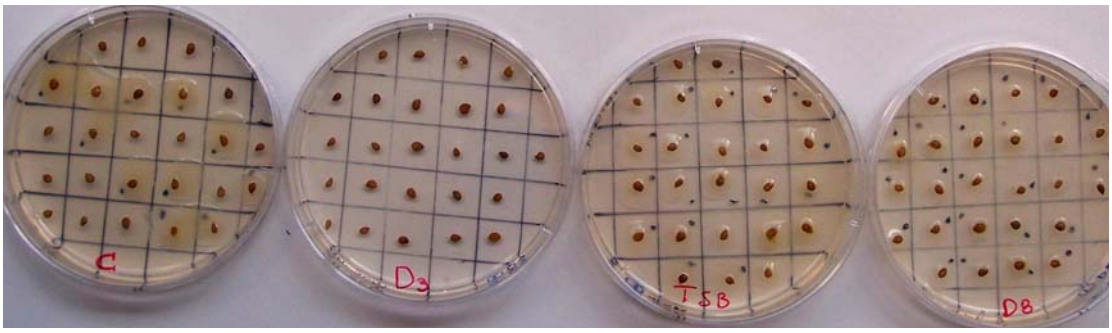
ΑΝΩΤΑΤΟ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΚΡΗΤΗΣ

ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Αξιολόγηση εναλλακτικών μεθόδων στην επιβίωση του *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis* σε σπόρο τομάτας



ΣΠΟΥΔΑΣΤΡΙΑ: ΜΙΧΕΛΑΚΗ ΧΡΥΣΗ

ΕΙΣΗΓΗΤΗΣ: Δρ. ΓΚΟΥΜΑΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ

ΜΑΡΤΙΟΣ 2006

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ 1

ΒΑΣΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΤΗΣ ΑΣΘΕΝΕΙΑΣ 1

I. Συμπτώματα 1

Συμπτώματα διασυστηματικής προσβολής 1

Συμπτώματα δευτερογενών μολύνσεων 2

II. Παθογόνο αίτιο 2

III. Στοιχεία επιδημιολογίας 3

Είσοδος του παθογόνου 3

Επιβίωση και μετάδοση του παθογόνου 3

IV. Ταυτοποίηση του παθογόνου 4

V. Καταπολέμηση 4

Καλλιεργητικά μέτρα 4

Φυτοπροστατευτικά μέτρα 4

Χρήση πιστοποιημένου πολλαπλασιαστικού υλικού 5

Εξυγίανση σπόρου 5

ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΜΕ ΧΗΜΙΚΟΥΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ (ΧΗΜΙΚΗ ΚΑΤΑΠΟΛΕΜΗΣΗ) 6

Συντηρητικά 7

Αντιβιοτικά 8

ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΜΕ ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΥΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ (ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΚΑΤΑΠΟΛΕΜΗΣΗ) 9

Βιολογική καταπολέμηση 9

Βάκιλοι 9

Εκχυλίσματα 11

Εκχυλίσματα κομπόστας 11

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ 12

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ 13
ΓΕΝΙΚΑ 13
Δοκιμές βλαστικότητας 13
Καλλιέργεια του παθογόνου 13
Δημιουργία τεχνητά μολυσμένου σπόρου τομάτας 14
Τυπική ανάπτυξη της καλλιέργειας του βακτηρίου 14
Στατιστική ανάλυση 15
Βακτηριακά στελέχη 16

Πείραμα 1 (Νιτρώδη διαλύματα) 17
Υλικά και μέθοδοι 17
Αποτελέσματα 17

Πείραμα 2 (Βάκιλοι) 19
Υλικά και μέθοδοι 19
Αποτελέσματα 19

Πείραμα 3 (Βάκιλοι) 21
Υλικά και μέθοδοι 21
Αποτελέσματα 21

Πείραμα 4 (Εκχυλίσματα κομπόστας) 23
Υλικά και μέθοδοι 23
Αποτελέσματα 23

ΣΥΖΗΤΗΣΗ 25

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ 28

ΦΩΤΟΓΡΑΦΙΚΟ ΥΛΙΚΟ 32

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

ΒΑΣΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΤΗΣ ΑΣΘΕΝΕΙΑΣ

Η ασθένεια, που στα ελληνικά είναι γνωστή με τις ονομασίες βακτηριακό έλκος ή κορυνοβακτηρίωση, είναι μια σοβαρή τυπική αδροβακτηρίωση που υπάρχει σχεδόν σε όλες τις περιοχές που καλλιεργείται η τομάτα. Στην Ελλάδα διαπιστώθηκε για πρώτη φορά στην Πρέβεζα το 1958, ενώ σήμερα έχει εξαπλωθεί σε όλη τη χώρα και αποτελεί σοβαρό πρόβλημα τόσο στις υπαίθριες όσο και στις υπό κάλυψη καλλιέργειες. Οι ζημιές μπορούν να οδηγήσουν σε απώλεια της παραγωγής μέχρι και 80%. Η ονομασία του παθογόνου [*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm)] προέρχεται από την πολιτεία Michigan των Η.Π.Α. όπου βρέθηκε για πρώτη φορά, ενώ το κοινό όνομα της ασθένειας στα αγγλικά είναι bacterial canker.

I. Συμπτώματα

Η εκδήλωση των συμπτωμάτων μπορεί να χαρακτηριστεί ως διασυστηματική ή τοπική. Στη διασυστηματική προσβολή τα συμπτώματα εκδηλώνονται λόγω του μπλοκαρίσματος των ξυλωδών αγγείων, ενώ οι τοπικές μολύνσεις προκαλούν αλλοιώσεις στο υπέργειο μέρος των φυτών. Τα συχνότερα αλλά και σοβαρότερα προβλήματα οφείλονται στη διασυστηματική μόλυνση των φυτών και σε μικρότερο βαθμό από τις δευτερογενείς παρεγχυματικές προσβολές των υπέργειων οργάνων των φυτών (Παναγόπουλος, 2000).

Συμπτωματολογία διασυστηματικής προσβολής

Οι συνθήκες του περιβάλλοντος, η ποικιλία και η ηλικία των φυτών είναι οι παράγοντες που επηρεάζουν το είδος, την ένταση και την έκταση των συμπτωμάτων. Τα αρχικά συμπτώματα εμφανίζονται στα παλαιότερα φύλλα. Τα φυλλάριά τους συστρέφονται και τελικώς συρρικνώνεται ολόκληρο το φύλλο. Το πιο σύνηθες φαινόμενο είναι να προσβάλλεται η μία πλευρά του φύλλου (να ξηραίνονται δηλαδή τα μισά φυλλάρια) ενώ η άλλη να παραμένει υγιής. Οι μίσχοι που φέρουν προσβεβλημένα φύλλα μπορεί επίσης να αποκτούν μια συστροφή προς τα κάτω, όμως δεν μαραίνονται. Οι προσβολές σε μεγαλύτερης ηλικίας φυτά συνήθως εκδηλώνονται με το σύνδρομο του βραδέως μαρασμού, καθώς ιδίως τα κατώτερα φύλλα μαραίνονται βαθμιαίως, φαινόμενο που αρχικά εκδηλώνεται με την μορφή ημιπληγίας και στην συνέχεια επεκτείνεται σε

ολόκληρο το φυτό. Στα νεαρά φυτά παρατηρείται μαρασμός και στη συνέχεια ξήρανση, ενώ αν επιζήσουν της προσβολής παρουσιάζουν έντονο νανισμό (MacNab, 2004).

Χαρακτηριστικό σύμπτωμα της ασθένειας είναι ο κίτρινος μέχρι καστανόμαυρος ή καστανός μεταχρωματισμός των αγγείων σε ολόκληρο το μήκος των προσβεβλημένων βλαστών και μίσχων των φύλλων. Σε εγκάρσια τομή στη βάση μίσχου του φύλλου παρατηρείται καστανός μεταχρωματισμός των αγγείων ημισελινοειδούς μορφής ή πετάλου ίππου, οι οποίοι παρουσιάζουν και μαλακή σήψη, ενώ σε προχωρημένο στάδιο της ασθένειας σχηματίζονται επιμήκη ανοικτά έλκη στην επιφάνεια του στελέχους (Παναγόπουλος, 2000). Χαρακτηριστικά συμπτώματα επίσης μπορούν να εμφανιστούν και σε προσβεβλημένους καρπούς όταν τα βακτήρια κινηθούν διασυστηματικά διαμέσου του δικτύου των αγγείων του βλαστού και περάσουν στους ποδίσκους των καρπών. Οι νεαροί καρποί παραμορφώνονται ενώ οι μεγαλύτεροι αν και μπορεί να μην έχουν εξωτερικά συμπτώματα παρουσιάζουν αδυναμία πρόσφυσης του ποδίσκου στον καρπό καθώς και κιτρίνισμα στο εσωτερικό του (MacNab, 2004)**,** (Εικόνες 1-7).

Συμπτωματολογία δευτερογενών μολύνσεων

Το παθογόνο εισέρχεται στους ιστούς από τα στομάτια, τα φακίδια και τα τριχίδια όταν οι συνθήκες είναι υγρές και ο καιρός βροχερός. Στο έλασμα των φύλλων, στους μίσχους, στα στελέχη και στους κάλυκες των ανθέων σχηματίζονται κυκλικές, υπερυψωμένες φλυκταινώδεις κηλίδες χρώματος ανοικτού καστανού και φελλώδους υφής. Στους καρπούς σχηματίζονται κηλίδες κυκλικές, χρώματος αρχικά υπόλευκου και στην συνέχεια καστανού που περιβάλλονται από μία υπόλευκη άλω. Οι κηλίδες είναι διαμέτρου 3-6 mm που συχνά σχίζονται στο κέντρο και μοιάζουν με «μάτι πτηνού». Η προσβολή μπορεί να γίνει και μέσω των αγγείων και τέτοιοι καρποί είναι συνήθως μικροί, παραμορφωμένοι και με αλλοιωμένη απόχρωση κατά θέσεις, ιδίως όταν η προσβολή γίνει στο στάδιο της ανάπτυξης (MacNab, 2004; Παναγόπουλος, 2000), (Εικόνες 8-10).

II. <u>Παθογόνο αίτιο</u>

Η ασθένεια οφείλεται στο βακτήριο *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm). Είναι θετικό κατά Gram, με βακτηριακά κύτταρα κορυνοειδούς σχήματος, δεν έχει αυτόνομη κίνηση, είναι βραδείας ανάπτυξης ενώ έχει άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης 24-28 ^{0}C. Σχηματίζει αποικίες άσπρου, κίτρινου και ροζ χρώματος, από τις οποίες μόνο οι άσπρες και οι κίτρινες είναι οι παθογόνες (MacNab, 2004). Εκτός από την τομάτα προσβάλλει υπό φυσικές και άλλα είδη της οικογένειας

Solanaceae, όπως τα φυτά *Solanun mammosum*, *Solanum douglasii*, *Solanum nigrum* και *Solanum triflorum.* Σαν ξενιστές του παθογόνου σε τεχνητές μολύνσεις αναφέρονται ακόμη τα φυτά *Solanum melongena, Capsicum frutescens* αλλά και διάφορα είδη των γενών *Solanum*, *Chypomandra* και *Nicotiana* (Παναγόπουλος, 2000).

III. Στοιχεία επιδημιολογίας

Είσοδος του παθογόνου

Η είσοδος του παθογόνου στο φυτό γίνεται από τις πληγές στις ρίζες και στο λαιμό που προκαλούνται από έντομα, νηματώδεις, καλλιεργητικά εργαλεία ή κατά την μεταφύτευση. Επίσης γίνεται από τα στομάτια, τα φακίδια και τα τριχίδια όταν οι συνθήκες είναι υγρές και ο καιρός βροχερός.

Επιβίωση και μετάδοση του παθογόνου

Το βακτήριο επιβιώνει στον σπόρο, με τον οποίο και μεταδίδεται σε αμόλυντες περιοχές. Στο έδαφος μπορεί να επιβιώσει από 2,5 έως και 5 χρόνια, σε κομπόστα περίπου 2 χρόνια και τέλος σε νεκρά φυτικά υπολείμματα ή σε άλλα φυτά ξενιστές έως 10 μήνες (MacNab, 2004). Μπορεί επίσης να παραμείνει σε θερμοκήπιο αλλά και στο χωράφι, όταν οι καλλιέργειες είναι συνεχείς κατά την διάρκεια του έτους. Τέλος, το παθογόνο επιβιώνει στα υλικά υποστύλωσης των φυτών, στα εργαλεία και στα ζιζάνια (Παναγόπουλος, 2000).

Η διασπορά των βακτηρίων γίνεται με τον άνεμο, τη βροχή ή την άρδευση με υψηλή καταιόνηση, παράγοντες που είναι υπεύθυνοι για τις επιφανειακές μολύνσεις, τα συμπτώματα των οποίων γίνονται ορατά μερικές μέρες αργότερα. Φυσικά μολυσμένος σπόρος σε αναλογία 1:10.000 μπορεί να οδηγήσει σε επιδημική εκδήλωση της ασθένειας στον αγρό εφόσον επικρατήσουν ευνοϊκές συνθήκες, ενώ η μετάδοση μπορεί να γίνει και με μολυσμένα φυτάρια (σπορόφυτα). Σήμερα, ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο στη μετάδοση του παθογόνου φαίνεται ότι έχουν τα εμβολιασμένα σπορόφυτα λόγω της μεγάλης συχνότητας μετάδοσης του παθογόνου κατά την διαδικασία του εμβολιασμού (Γκούμας, 2004).

Στον αγρό μεταδίδεται με τα εργαλεία κλαδέματος μέσω των τομών που δημιουργούνται από το κλάδεμα, ενώ στο έδαφος η διασπορά του μολύσματος γίνεται με το νερό του ποτίσματος και τα καλλιεργητικά εργαλεία (Παναγόπουλος, 2000).

IV. Ταυτοποίηση του παθογόνου

Η ανίχνευση, η απομόνωση και η ταυτοποίηση του παθογόνου γίνεται στο εργαστήριο με άμεση απομόνωση σε κατάλληλα εκλεκτικά θρεπτικά υποστρώματα, με την μέθοδο του ανοσοφθορισμού (χρώση IF, Εικόνα 11), με την μέθοδο ELISA και πρόσφατα με την χρώση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR).

V. Καταπολέμηση

Ο πιο αποτελεσματικός τρόπος καταπολέμησης είναι αυτός που μειώνει σημαντικά το μόλυσμα στις αρχικές μολύνσεις με αποτέλεσμα να περιορίζονται και οι επόμενες. Γενικά, όταν εκδηλωθεί η ασθένεια είναι αρκετά δύσκολο να αντιμετωπιστεί. Έτσι μπορούν να εφαρμοστούν διαφορετικοί τρόποι αντιμετώπισής της, αναλόγως με το στάδιο της καλλιέργειας και την έκταση της προσβολής.

Καλλιεργητικά μέτρα

1. Εφαρμογή αμειψισποράς για 2-3 χρόνια ή αν δεν είναι δυνατόν, ηλιοαπολύμανση του εδάφους. Η εφαρμογή της ηλιοαπολύμανσης του εδάφους με διαφανή φύλλα πολυαιθυλενίου και με διάρκεια κάλυψης 1,5-2 μήνες βρέθηκε ότι είναι πολύ αποτελεσματική στην χώρα μας (Antoniou *et al*., 1995).
2. Καταστροφή και κάψιμο των προσβεβλημένων τμημάτων του φυτού και των φυτικών υπολειμμάτων μαζί με το ριζικό τους σύστημα.
3. Απολύμανση εργαλείων κλαδέματος και μετά το κλάδεμα ψεκασμός των φυτών με χαλκούχο φάρμακο.
4. Το νερό του ποτίσματος να μη διέρχεται από προσβεβλημένες φυτείες.
5. Καταπολέμηση των ζιζανίων και κυρίως των εναλλακτικών ξενιστών.
6. Αποφυγή επαναφύτευσης σε έδαφος που είχε εμφανιστεί η ασθένεια.

Φυτοπροστατευτικά μέτρα

Το υδροξείδιο του χαλκού μόνο του ή σε συνδυασμό με το mancozeb και την στρεπτομυκίνη χρησιμοποιείται ως μέσο ψεκασμού των φυτών για τον περιορισμό της διάδοσης του βακτηρίου (Hausbeck, *et al*., 2000). Έχουν δοκιμαστεί και άλλες εναλλακτικές μέθοδοι καταπολέμησης του βακτηρίου οι οποίες περιλαμβάνουν την χρησιμοποίηση βιολογικών παραγόντων όπως είναι κάποια φυτικά ή ζωικά εκχυλίσματα (το vermicompost tea), ορισμένα ανταγωνιστικά βακτηριακά

στελέχη, όπως αυτά του γένους *Bacillus* και τέλος ορισμένοι μύκητες όπως ο *Trichoderma harzianum* και ο *Rhodosporidium diobovatum* (Utkhede & Koch, 2003), οι οποίοι έχουν την δυνατότητα να παρεμποδίζουν την εκδήλωση του βακτηριακού έλκους στο θερμοκήπιο.

Χρήση πιστοποιημένου πολλαπλασιαστικού υλικού

1. Χρησιμοποίηση ανθεκτικών ποικιλιών.
2. Χρησιμοποίηση πιστοποιημένου σπόρου.
3. Φύτευση υγιών σποροφύτων ή εμβολιασμένων φυτών.

Εξυγίανση σπόρου

Για την εξυγίανση του μολυσμένου σπόρου γίνονται εμβαπτίσεις σε 0,6 Μ υδροχλωρικού οξέος (HCl) για 5 ώρες, σε 0,25 ή 0,5% acidified cupric acetate (ACA) για είκοσι λεπτά ή εμβαπτίσεις σε θερμό νερό θερμοκρασίας 52-56 ^{0}C για είκοσι και τριάντα λεπτά αντίστοιχα (Fatmi *et al*., 1991). Παρόλο που τόσο το HCl όσο και το ACA εξάλειψαν το παθογόνο προκάλεσαν σημαντική μείωση στη βλαστικότητα των σπόρων. Αντίθετα, στην επέμβαση με θερμό νερό, οι σπόροι παρουσίασαν σημαντική αύξηση του ποσοστού της βλαστικότητας- σε σχέση πάντα με τον μάρτυρα που δεν είχε υποστεί καμιά επέμβαση. Το μειονέκτημα των επεμβάσεων με το νερό είναι ότι μπορεί να κάνει τους σπόρους πιο ευαίσθητους σε άλλα παθογόνα εδάφους (κυρίως μύκητες), με αποτέλεσμα να είναι απαραίτητη η επέμβαση με κάποιο μυκητοκτόνο πριν οι σπόροι φυτευτούν (Fatmi *et al*., 1991).

ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΜΕ ΧΗΜΙΚΟΥΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ (ΧΗΜΙΚΗ ΚΑΤΑΠΟΛΕΜΗΣΗ)

Οι χημικοί αντιμικροβιακοί παράγοντες δρουν είτε θανατώνοντας ή παρεμποδίζοντας την ανάπτυξη των μικροοργανισμών (Todar, 1997). Περιλαμβάνουν χημικά συντηρητικά, αντισηπτικά όπως και φάρμακα, τα οποία χρησιμοποιούνται για την προστασία μεταδιδόμενων ασθενειών σε φυτά αλλά και σε ζώα. Οι αντιμικροβιακοί παράγοντες μπορεί να είναι φυσικής ή συνθετικής προέλευσης και να έχουν ανασταλτική ή θανατηφόρα επίδραση στους μικροοργανισμούς. Την ίδια επίδραση με τους αντιμικροβιακούς παράγοντες στα φυτά μπορεί να έχουν τα αντισηπτικά και τα απολυμαντικά, από τα οποία τα πιο γνωστά παρουσιάζονται στον πίνακα 1.

Πίνακας 1: Γνωστά αντισηπτικά και απολυμαντικά

ΧΗΜΙΚΑ	**ΔΡΑΣΗ**	**ΧΡΗΣΗ**
Αιθανόλη (50-70%)	Αποδομεί τις πρωτεΐνες και διαλυτοποιεί τα λιπίδια	Αντισηπτικό για το δέρμα
Ισοπροπανόλη (50-70%)	Αποδομεί τις πρωτεΐνες και διαλυτοποιεί τα λιπίδια	Αντισηπτικό για το δέρμα
Φορμαλδεύδη (8%)	Αντιδρά με ομάδες NH_2, SH και COOH	Απολυμαντικό, θανατώνει τα ενδοσπόρια
Βάμμα Ιωδίου (2% I_2 σε 70% αλκοόλη)	Αδρανοποίηση των πρωτεϊνών	Αντισηπτικό για το δέρμα
Χλωρίνη (Cl_2)	Σχηματίζει υποχλωριώδες οξύ (HClO), ισχυρός οξειδωτικός παράγοντας	Γενικό απολυμαντικό
Νιτρικός Άργυρος($AgNO_3$)	Κατακρήμνιση πρωτεινών	Γενικό αντισηπτικό
Χλωριούχος Υδράργυρος	Απενεργοποιεί τις πρωτεΐνες αντιδρώντας με σουλφομάδες	Απολυμαντικό, παρόλο που χρησιμοποιείται και ως αντισηπτικό στο δέρμα
Απορρυπαντικά	Διάσπαση των κυτταρικών μεμβρανών	Αντισηπτικό δέρματος και απολυμαντικό
Φαινολικές ενώσεις(π.χ. carboloic acid, lysol, hexylresorcinol)	Αποδιοργάνωση πρωτεϊνών και διάρρηξη κυτταρικών μεμβρανών	Αντισηπτικό σε μικρές συγκεντρώσεις και απολυμαντικό σε μεγαλύτερες

Τα συντηρητικά είναι ανασταλτικοί παράγοντες που χρησιμοποιούνται για την παρεμπόδιση της ανάπτυξης των μικροοργανισμών συνήθως σε φαγητά. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν η φορμαλδεΰδη, τα νιτρώδη, το διοξείδιο του θείου, το προπιονικό ασβέστιο και το βενζοϊκό νάτριο (Todar, 1997). Στον πίνακα 2 παρουσιάζονται τα πιο γνωστά συντηρητικά, καθώς και οι χρήσεις που έχουν στην καθημερινότητά μας.

Επικρατεί η άποψη ότι τα νιτρώδη (τα οποία προέρχονται από τα νιτρικά που βρίσκονται σε αρκετά φαγητά αλλά και στο πόσιμο νερό) είναι βλαβερά για τον ανθρώπινο οργανισμό (Duncan *et al*., 1997), γιατί έχουν την ικανότητα να αντιδρούν με τις αμίνες και τις αμίδες και να δημιουργούν αζωτούχες ενώσεις οι οποίες βρέθηκαν καρκινογόνες σε πειραματόζωα. Όμως, μετά από πρόσφατες έρευνες που έγιναν σε θηλαστικά ανακαλύφθηκε ότι μπορεί να έχουν και θετικές επιδράσεις. Συγκεκριμένα, η μετατροπή των νιτρικών σε νιτρώδη που γίνεται στην στοματική κοιλότητα φαίνεται ότι έχει ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη ενός μηχανισμού αντίστασης ενάντια σε μολυσματικές ασθένειες (Duncan *et al*., 1995).

Πίνακας 2: Γνωστά συντηρητικά και οι χρήσεις τους

Συντηρητικά	Αποτελεσματική συγκέντρωση	Χρήσεις
Propionic acid and propionates	0.32%	Αντιμυκητιακός παράγοντας σε ψωμιά και ελβετικά τυριά
Sorbic acid and sorbates	0.2%	Αντιμυκητιακός παράγοντας σε τυριά και γλυκά
Benzoic acid and benzoates	0.1%	Αντιμυκητιακός παράγοντας σε τρόφιμα και ποτά
Sodium diacetate	0.32%	Αντιμυκητιακός παράγοντας σε ψωμιά
Lactic acid	?	Αντιμικροβιακός παράγοντας σε τυριά. γάλα, γιαούρτι
Sulfur dioxide, sulfites	200-300 ppm	Αντιμικροβιακός παράγοντας σε ξηρούς καρπούς και σταφύλια
Sodium Nitrite	200 ppm	Αντιβακτηριακός παράγοντας στο κρέας και στο ψάρι.
Sodium chloride	?	Εμποδίζει το σάπισμα των κρεάτων, των ψαριών, κ.α.
Sugar	?	Εμποδίζει το σάπισμα των γλυκών
Wood smoke	?	Εμποδίζει το σάπισμα των κρεάτων, των ψαριών, κ.α.

Τα αντιβιοτικά παράγονται από μικροοργανισμούς που είτε θανατώνουν ή παρεμποδίζουν και αναστέλλουν την ανάπτυξη και των πολλαπλασιασμό άλλων μικροοργανισμών (Todar, 1997; Γκούμας, 2004). Σύμφωνα με τον Baker (1987) ο όρος

αντιβίωση χρησιμοποιείται με την ευρεία έννοια, όπου προϊόντα μεταβολισμού από έναν μικροοργανισμό αναστέλλουν την ανάπτυξη ή θανατώνουν κάποιον άλλο μικροοργανισμό. Τα αντιβιοτικά δηλαδή έχουν μυκητοστατική/ βακτηριοστατική ή μυκητοκτόνο/ βακτηριοκτόνο δράση. Τέτοιες ουσίες είναι ορισμένα οργανικά οξέα, υπεροξείδια και αλκοόλες που παράγονται δευτερογενώς κατά το μεταβολισμό ορισμένων μικροοργανισμών.

Ο όρος αντιβιοτικό αρχικά χρησιμοποιήθηκε μόνο για τα φυσικά προϊόντα της μικροβιακής δραστηριότητας, που παράγονται μετά από εκτενείς μικροβιακές διαδικασίες, σε αντιδιαστολή με τις συνθετικά ή ημισυνθετικά παρασκευαζόμενες ουσίες που χαρακτηρίζονται από παρόμοιες ιδιότητες. Στα διάφορα οικοσυστήματα στην φύση η δραστηριότητα των μικροοργανισμών στο να παράγουν αντιβιοτικά αποτελεί γνωστό μηχανισμό άμυνας ή και κυριαρχίας που τελικά συμβάλλει στο να υπάρχει ισορροπία ανάμεσα στα είδη (Γκούμας, 2004).

Τη δεκαετία του 1950, αμέσως μετά την εισαγωγή των αντιβιοτικών στην αντιμετώπιση των μολυσματικών ασθενειών στο χώρο της ιατρικής, τα αντιβιοτικά δοκιμάστηκαν με επιτυχία για την αντιμετώπιση κυρίως των βακτηριακών ασθενειών στα φυτά. Ο κυριότερος λόγος ήταν ότι τότε, όπως και σήμερα το μόνο διαθέσιμο φυτοφάρμακο για την αντιμετώπιση των βακτηρίων είναι οι διάφορες ενώσεις του χαλκού (Γκούμας, 2004). Κάποια από τα περισσότερα αντιβιοτικά που χρησιμοποιούνται με επιτυχία στο να σκοτώσουν ή να παρεμποδίσουν μεταδιδόμενα βακτήρια είναι τα: Streptomycin, Bacitracin, Tetracycline, Bacilysin, Fengymycin, Mycobacillin και Subtilin (Todar, 1997).

Πολλά είδη μικροοργανισμών έχει αποδειχτεί ότι παράγουν αντιβιοτικά *in vitro*. Τέτοια είναι διάφορα είδη μυκήτων, βακτηρίων και ζυμών. Αντιθέτως, τα αντιβιοτικά μπορεί να δημιουργήσουν και προβλήματα στα φυτά αφού ορισμένα εκδηλώνουν τοξική δράση στην ωφέλιμη μικροχλωρίδα (Baker, 1987).

ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΜΕ ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΥΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ (ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΚΑΤΑΠΟΛΕΜΗΣΗ)

Βιολογική καταπολέμηση είναι η καταπολέμηση των παθογόνων των φυτών που πραγματοποιείται με την συμμετοχή ενός ή περισσοτέρων οργανισμών, συμπεριλαμβανομένου και του ξενιστή χωρίς την χρησιμοποίηση χημικών παραγόντων (Cook & Baker, 1983). Οι βιολογικοί παράγοντες μπορούν να παρέμβουν σε διάφορες φάσεις του κύκλου ανάπτυξης του παθογόνου και να παρεμποδίσουν την μόλυνση με διάφορους τρόπους, όπως :

1. με ανταγωνισμό των παθογόνων για θρεπτικά στοιχεία και χώρο
2. με την παραγωγή αντιβιοτικών
3. με τον υπερπαρασιτισμό
4. με την επαγωγή ανθεκτικότητας στο φυτό ξενιστή και τέλος
5. με συνδυασμό περισσοτέρων του ενός από τους προαναφερθέντες τρόπους (Elad, 1996; Sigee, 1993).

Η επαγωγή της συστηματικής ανθεκτικότητας μπορεί να ενεργοποιηθεί στα φυτά πριν την μόλυνσή τους είτε με κάποιους μικροοργανισμούς, ή με την εφαρμογή χημικών διεγερτών που μπορούν να επάγουν την ανθεκτικότητά τους (Mercier & Arul, 1993). Η βάση αυτής της ανθεκτικότητας μπορεί να περιέχει αντιδράσεις αυτοάμυνας των φυτών, όπως η επιτάχυνση της παραγωγής φυτοαλεξίνης με σκοπό την συσσώρευσή της και η επαγωγή ενζύμων που ευνοούν την άμυνα του φυτού ενάντια στους εχθρούς του (VanLoon, 1997).

Ως παράγοντες βιολογικής καταπολέμησης θεωρούνται διάφοροι μύκητες, ζύμες, βακτήρια (κυρίως του γένους *Bacillus*), ιοί, ενώ σχετικά πρόσφατα συμπεριλήφθησαν και κάποια εκχυλίσματα είτε από φυτικούς ή από ζωικούς οργανισμούς.

Βάκιλοι

Τα βακτήρια του γένους *Bacillus* sp. είναι θετικά κατά Gram, ραβδοειδούς σχήματος, αερόβια ή προαιρετικά αναερόβια, σχηματίζουν ενδοσπόρια και περιλαμβάνουν περισσότερο από 60 είδη με σχετικά διαφορετικούς φαινότυπους (Claus & Berkeley, 1986). Η άριστη θερμοκρασία ανάπτυξής τους κυμαίνεται γύρω στους 30 ^{0}C.

Τα είδη αυτά διαθέτουν κάποια ιδιαίτερα χαρακτηριστικά γνωρίσματα που τα κάνουν ισχυρούς παράγοντες βιολογικής καταπολέμησης ασθενειών των φυτών.

Καταρχήν, παράγουν διαφορετικές ομάδες αντιβιοτικών με ανταγωνιστική δράση ενάντια σε ορισμένους μύκητες και βακτήρια (Loeffler *et al*., 1986; Krebs *et al.,* 1998; Sigee, 1993), η δράση των οποίων σε πολλές περιπτώσεις μπορεί να είναι μυκητοκτόνος/ βακτηριοκτόνος (Walker *et al*., 1998). Δεύτερον, σχηματίζουν ενδοσπόρια, που είναι ανθεκτικές μορφές, με τις οποίες μπορούν να επιβιώνουν για μεγάλα χρονικά διαστήματα στους φυτικούς ιστούς (Bochow, 1995) ενώ τρίτον, λόγω της προσαρμοστικότητάς τους αποτελούν βασικό συστατικό της μικροχλωρίδας των καλλιεργήσιμων εδαφών (Stabb *et al*., 1994).

Η ανταγωνιστική δράση των βακίλων ενάντια στους μικροοργανισμούς συχνά σχετίζεται με την παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών οι οποίοι διαθέτουν αντιβιοτικές ιδιότητες και είναι ωφέλιμοι είτε ως παράγοντες που συμβάλλουν στην ανάπτυξη και στην ανθεκτικότητα των φυτών, ή ως παράγοντες παραγωγής αντιβιοτικών που δρουν άμεσα ενάντια σε παθογόνους οργανισμούς (Wulff *et al.,* 2002). Επιπλέον, εκτός από την δυνατότητα των βακίλων στην παραγωγή αντιβιοτικών, σημαντικό ρόλο στην βιολογική αντιμετώπιση των ασθενειών παίζει και η ικανότητά τους για ενδοφυτικό αποικισμό (Kloepper *et al*., 1999). Η ικανότητα τους να παραμένουν στο αγγειακό σύστημα του φυτού τα καθιστά ισχυρούς ανταγωνιστές ενάντια σε παθογόνα που προσβάλλουν – μολύνουν διασυστηματικά τα φυτά και τα οποία συνήθως είναι περισσότερο ανθεκτικά εξ'αιτίας της θέσης που αναπτύσσονται (Wulff *et al.,* 2002).

Κατά καιρούς έχουν χρησιμοποιηθεί αρκετά βακτηριακά στελέχη του γένους *Bacillus* ως βιολογικοί παράγοντες για την καταπολέμηση του βακτηριακού έλκους της τομάτας. Σε πειράματα, έχει παρατηρηθεί ότι διάφορα στελέχη του *Bacillus subtilis* έχουν την δυνατότητα να εμποδίζουν την μόλυνση φυτών στο θερμοκήπιο από το *Clavibacter*, καθώς επίσης και να περιορίζουν την ανάπτυξη διαφόρων μυκήτων που προκαλούν ασθένειες ριζώματος, ενώ σε άλλες περιπτώσεις βρέθηκε ότι αυξάνουν την ανάπτυξη και την παραγωγή άλλων καλλιεργούμενων φυτών (Utkhede & Koch, 2003). Ο μηχανισμός με τον οποίο ελέγχεται η ασθένεια στην συγκεκριμένη μελέτη δεν είναι γνωστός, ενώ σε άλλες έρευνες έχει διαπιστωθεί η άμεση εμπλοκή των βακτηρίων με την ενεργοποίηση διαφόρων ορμονών, ή έμμεση εμπλοκή, ως επαγωγών αντοχής των φυτών. Τέλος, υπάρχει και το ενδεχόμενο ο μηχανισμός ελέγχου του παθογόνου να οφείλεται στην παραγωγή αντιβιοτικών από ορισμένα βακτηριακά στελέχη, τα οποία παρεμποδίζουν το πολλαπλασιασμό του παθογόνου και την εξάπλωση της ασθένειας (Leifert *et al*, 1995). Ο Boshow (1995) βρήκε ότι στελέχη του *B. subtilis* παράγουν διάφορους μεταβολίτες όπως

πεπτίδια, καθώς και παράγωγα φυτοορμονών (ειδικότερα αυξίνες) τα οποία δρουν θετικά στην ανάπτυξη του φυτού και ενισχύουν την αντοχή τους στις ασθένειες.

Εκχυλίσματα

Τα εκχυλίσματα μπορεί να προέρχονται είτε από φυτά (και να περιέχουν ουσίες με μυκητοστατικές ιδιότητες) ή από κομπόστες (στις οποίες υπάρχει μεγάλη βιολογική δραστηριότητα) και γενικά έχουν ευεργετικές επιδράσεις τόσο στην βλαστικότητα όσο και στην ανάπτυξη των σπορόφυτων (Utkhede & Koch, 2003).

Εκχυλίσματα κομπόστας

Στην βιολογική καταπολέμηση των ασθενειών, η αποτελεσματικότητα που έχουν οι κομπόστες ενάντια στην εμφάνιση των παθογόνων πιθανώς περιλαμβάνει τόσο βιολογικούς όσο και χημικούς παράγοντες (Kavroulakis *et al,* 2005). Η άποψη που επικρατεί περισσότερο, είναι ότι η συμβολή τους στην καταστολή των ασθενειών οφείλεται στη δράση μικροβιακών παραγόντων οι οποίοι εμπεριέχονται στην κομπόστα ως αποτέλεσμα των βιολογικών διεργασιών (Hoitink *et al*., 1999). Η αποτελεσματικότητά τους οφείλεται στην ικανότητά τους να ανταγωνίζονται τα παθογόνα για θρεπτικά στοιχεία (McKellar *et al.,* 2003), στον παρασιτισμό και τέλος στην παραγωγή υδρολυτικών ενζύμων (Kwok *et al*., 1987), ή ενώσεων με μυκητοστατικές/ μυκητοκτόνες και γενικότερα μικροβιοκτόνες ιδιότητες (Singh *et al.,* 2003). Ένας άλλος τρόπος δράσης μπορεί να είναι η επαγωγή ανθεκτικότητας σε συνδυασμό με την παρεμπόδιση του παθογόνου (Kavroulakis *et al,* 2005).

Όμως, πέρα από αυτά, οι κομπόστες έχουν και την δυνατότητα να περιορίζουν την ανάπτυξη διαφόρων παθογόνων όπως αποδείχθηκε στην περίπτωση του vermicompost tea, με την δράση ανταγωνιστικών βακτηρίων που περιέχονται μέσα σε αυτό και είναι ικανά να προστατεύσουν τα φυτά (Utkhede & Koch, 2003).

Συνεπώς, τα εκχυλίσματα από κομπόστες αποτελούν εύκολα και οικονομικά μέσα όσον αφορά την βιολογική καταπολέμηση ασθενειών. Όμως, η μη σταθερή τους σύσταση καθώς και η διαδικασία της ζύμωσης δημιουργούν λογικές αμφιβολίες για το κατά πόσο θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για την καταπολέμηση διαφόρων παθογόνων.

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Σκοπός αυτής της εργασίας ήταν να εξεταστεί η ικανότητα ήπιων εναλλακτικών μεθόδων στην αντιμετώπιση της ασθένειας. Πραγματοποιήθηκαν επεμβάσεις σε τεχνητά μολυσμένους σπόρους τομάτας με: διάφορες συγκεντρώσεις νιτρώδους νατρίου, με επιλεγμένα ανταγωνιστικά βακτηριακά στελέχη που απομονώθηκαν από διάφορα υποστρώματα σε προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου (κυρίως του γένους *Bacillus* spp), καθώς και με εκχυλίσματα διαφορετικών τύπων κομπόστας.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

ΓΕΝΙΚΑ

Δοκιμές βλαστικότητας

Έγιναν προκαταρτικές δοκιμές βλαστικότητας, σε υγιή σπόρο της ποικιλίας «Puckmore» της εταιρείας Γεωπονικό σπίτι, για έλεγχο τυχόν φυτοτοξικότητας των στις διάφορες επεμβάσεις. Στην περίπτωση αυτή χρησιμοποιήθηκε ο υγιής σπόρος γιατί δεν μας ενδιέφερε η αποτελεσματικότητα της επέμβασης στον περιορισμό εμφάνισης του βακτηρίου, αλλά η εμφάνιση ή όχι της τοξικότητας στους σπόρους, παράγοντας ο οποίος θα προκαλούσε μεγάλες δυσκολίες στην εφαρμογή των πειραμάτων στην πράξη.

Η εφαρμογή των δοκιμών βλαστικότητας έγινε υπό ασηπτικές συνθήκες, με την εξής μεθοδολογία: οι σπόροι εμβαπτίστηκαν στις αντίστοιχες επεμβάσεις (δηλαδή ίδιες συγκεντρώσεις και ίδιοι χρόνοι) με αυτές που θα εμβαπτίζονταν και οι μολυσμένοι σπόροι στα επικείμενα πειράματα. Αφού αφέθησαν να στεγνώσουν για λίγη ώρα πάνω σε διηθητικό χαρτί, τοποθετήθηκαν σε πλαστικά τριβλία «Petri», διαμέτρου 9 εκ. Στην κάθε μία επέμβαση χρησιμοποιήθηκαν 100 σπόροι, χωρισμένοι ανά 25 σε κάθε τριβλίο. Στον πάτο του κάθε τριβλίου είχε νωρίτερα τοποθετηθεί μια στρώση από διηθητικό χαρτί, το οποίο είχε εμποτιστεί με μικρή ποσότητα απιονισμένου και αποστειρωμένου (ΑΑ) νερού (περίπου 1 ml). Πάνω από τους σπόρους τοποθετήθηκε μία δεύτερη στρώση διηθητικού χαρτιού που επίσης εμποτίστηκε με περίπου 1 ml νερό). Το διηθητικό χαρτί είχε ως σκοπό το να διατηρήσει την απαραίτητη υγρασία ώστε οι σπόροι να μπορέσουν να βλαστήσουν μέσα στο τριβλίο. Στη συνέχεια τα τριβλία κλείστηκαν με παραφίλμ για αποφυγή τυχόν μόλυνσης από εξωτερικούς παράγοντες και τοποθετήθηκαν σε θάλαμο ελεγχόμενης θερμοκρασίας, στους 25 °C στο σκοτάδι. Δέκα μέρες μετά και αφού ελέγχαμε τακτικά την υγρασία των τριβλίων για να μην αφυδατωθούν οι σπόροι, καταμετρήθηκε ο αριθμός των σπόρων που βλάστησαν.

Ο μέσος όρος της βλαστικότητας κυμάνθηκε στο 75-80 % σε όλες τις επεμβάσεις και θεωρήθηκε επαρκής για την έναρξη των πειραμάτων στους μολυσμένους σπόρους.

Καλλιέργεια του παθογόνου

Το *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis* (Cmm) καλλιεργούταν στο εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα m-SCM του οποίου η σύνθεση είναι η εξής: Mannose

10g/l, Yeast extract 0.1g/l, K_2HPO_4 2g/l, KH_2PO_4 0.5 g/l, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.25g/l και Boric acid 1.5g/l. Μετά από την αποστείρωση προστίθενται: Cycloheximide 200mg (Διάλυση σε 1ml μεθανόλης), Nalidixic acid 30mg (Διάλυση σε 1ml 0,1M NaOH) και Nicotinic acid 100mg (Διάλυση σε 20ml ΑΑ H_2O). Το υπόστρωμα απλώθηκε σε πλαστικά τριβλία Petri διαμέτρου 9 cm.

Δημιουργία τεχνητά μολυσμένου σπόρου τομάτας

Σε όλα τα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν τεχνητά μολυσμένοι σπόροι τομάτας ποικιλίας «Puckmore». Η τεχνητή μόλυνση των σπόρων έγινε με τη μέθοδο της εφαρμογής υποπίεσης. Ως μόλυσμα χρησιμοποιήθηκε υδατικό βακτηριακό αιώρημα από τα στελέχη 4089, 4019 και 4100 του Cmm. Τα βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν προέρχονται από τη συλλογή του εργαστηρίου Φυτοπαθολογίας-Βακτηριολογίας του ΤΕΙ Κρήτης. Η παθογένεια των στελεχών ελέγχθηκε πριν τη χρησιμοποίησή τους με τεχνητές μολύνσεις σε φυτά τομάτας της ίδιας ποικιλίας, στο στάδιο των 3-4 πραγματικών φύλλων. Τα τυπικά συμπτώματα της ασθένειας αναπτύχθηκαν σε διάστημα 5-10 ημερών (Εικόνα 12).

Τα βακτηριακά στελέχη αναπτύχθηκαν για 48 ώρες στο θρεπτικό υπόστρωμα NAG. Σχηματίστηκαν τρία διαφορετικά αιωρήματα συγκέντρωσης 10^{7}, 10^{5} και 10^{3} c.f.u/ ml περίπου από υποδεκαπλάσιες αραιώσεις αρχικού αιωρήματος των στελεχών συγκέντρωσης 10^{8} c.f.u/ ml (οπτική πυκνότητα 0,123 στα 600 nm). Σπόρος 50 gr. τοποθετήθηκε σε φιάλη δημιουργίας κενού που περιείχε 400 ml του αντίστοιχου βακτηριακού αιωρήματος του Cmm. Με τη βοήθεια αντλίας κενού εφαρμόστηκε υποπίεση (-40 KPa) για 5 λεπτά. Ο τεχνητά μολυσμένος σπόρος μετά τη ξήρανσή του διατηρήθηκε στο ψυγείο (5 °C) σε όλη την διάρκεια των πειραμάτων.

Τυπική ανάπτυξη της καλλιέργειας του βακτηρίου

Σε κάθε πείραμα χρησιμοποιήθηκαν 100 σπόροι ανά επέμβαση, οι οποίοι κατανεμήθηκαν ανά 25 σε 4 τριβλία «Petri» διαμέτρου 9 cm, τα οποία περιείχαν το εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα m-SCM. Οι σπόροι μετά τις επεμβάσεις στέγνωσαν πάνω σε διηθητικό χαρτί. Στη συνέχεια τοποθετήθηκαν στα τριβλία και επωάστηκαν σε θάλαμο ανάπτυξης στους 30 °C για τρεις εβδομάδες. Μετά το χρονικό αυτό διάστημα της επώασης εκτιμήθηκε το ποσοστό εμφάνισης του παθογόνου ανά τριβλίο, δηλαδή το ποσοστό των σπόρων που γύρω τους αναπτύχθηκε η καλλιέργεια του βακτηρίου Cmm.

Η εκτίμηση έγινε βάσει του μορφολογικού φαινότυπου του βακτηρίου, δηλαδή από το κίτρινο χρώμα και τη γλοιώδη εμφάνιση των αποικιών (Εικόνες 13-15). Η επιβεβαίωση έγινε με την ανάπτυξη των καλλιεργειών αυτών στο θρεπτικό υπόστρωμα NAG, ενώ έγινε και τεστ για να διαπιστωθεί ότι είναι όντως θετικά κατά Gram.

Στατιστική ανάλυση

Στα δεδομένα έγινε μετατροπή logit (100,1 ως μέγιστη τιμή) με τη χρήση του τύπου: (logit = ln (% εμφάνισης του Cmm+0,1) / (100,1-% εμφάνισης του Cmm). Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε Ανάλυση Διασποράς (ANOVA). Η σύγκριση των επεμβάσεων έγινε κατά Tuckey HSD ($P \leq 0,05$). Για την ανάλυση χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πακέτο SPSS ed.11 for Windows.

Βακτηριακά στελέχη

Στην περίπτωση των βακίλων εξετάστηκαν συνολικά 21 βακτηριακά στελέχη, ορισμένα από τα οποία είχαν προκαλέσει την μεγαλύτερη ζώνη παρεμπόδισης στην ανάπτυξη του Cmm. Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται τα στελέχη αναλυτικά, καθώς και το μήκος της ζώνης παρεμπόδισης που σχημάτισε το καθένα από αυτά (Εικόνα 16).

Πίνακας 3. Μέτρηση της ζώνης παρεμπόδισης των βακτηριακών στελεχών έναντι του Cmm, σε 4 διαφορετικές δοκιμές.

ΣΤΕΛΕΧΗ	Επίδραση στην ανάπτυξη του *Fusarium culmorum*	Επίδραση στην ανάπτυξη του *Didymella lycopersici*	Διάμετρος ζώνης παρεμπόδισης (cm) της ανάπτυξης του Cmm			
			ΔΟΚΙΜΗ 1η	ΔΟΚΙΜΗ 2η	ΔΟΚΙΜΗ 3η	ΔΟΚΙΜΗ 4η
D1		Καλή	0	0,2	0,4	0
D2		Καλή	0,2	0,1	2	*
D3		Καλή	0,4	*	0,5	0,9
D4		Καλή	1	1,2	1,5	1,3
D5		Μέτρια	0,7	1,7	2	2
D6		Μέτρια	1,3	*	2	1,2
D7		Καλή	*	1,2	2	*
D8		Μέτρια	1,2	1,2	1	1
D9		Καλή	1.4	*	2	1,8
F1	Μέτρια		*	1	*	1
F2	Μέτρια		0,5	*	1,2	1,3
F3	Καλή		1,1	0,4	1	1
F4	Καλή		1,2	0,7	1,1	1,2
F5	Καλή		1	0,9	1	1
F6	Καλή		0,3	0	0	1,3
F7	Καλή		0,5	0,7	0,8	1,4
F8	Καλή		0,5	0,7	*	2
F9	Μέτρια		0,6	0,6	*	0,5
F10	Μέτρια		0,8	0,7	2	1
F11	Καλή		1,1	*	1	1,1
F12	Καλή		0,3	1,2	1,3	1,2

***Δεν πάρθηκε μέτρηση λόγω μόλυνσης του τριβλίου**

Πείραμα 1 (Νιτρώδη διαλύματα)

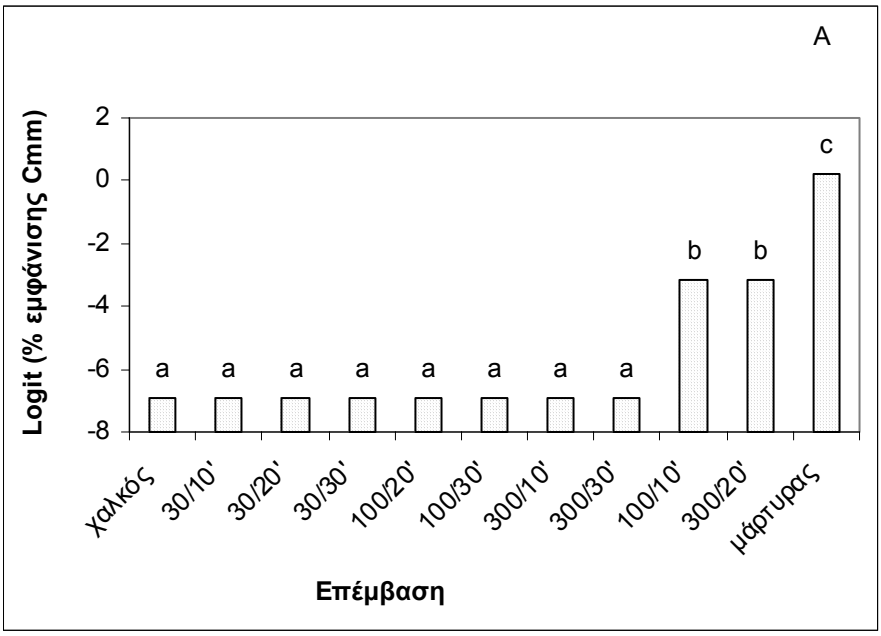
Υλικά και μέθοδοι

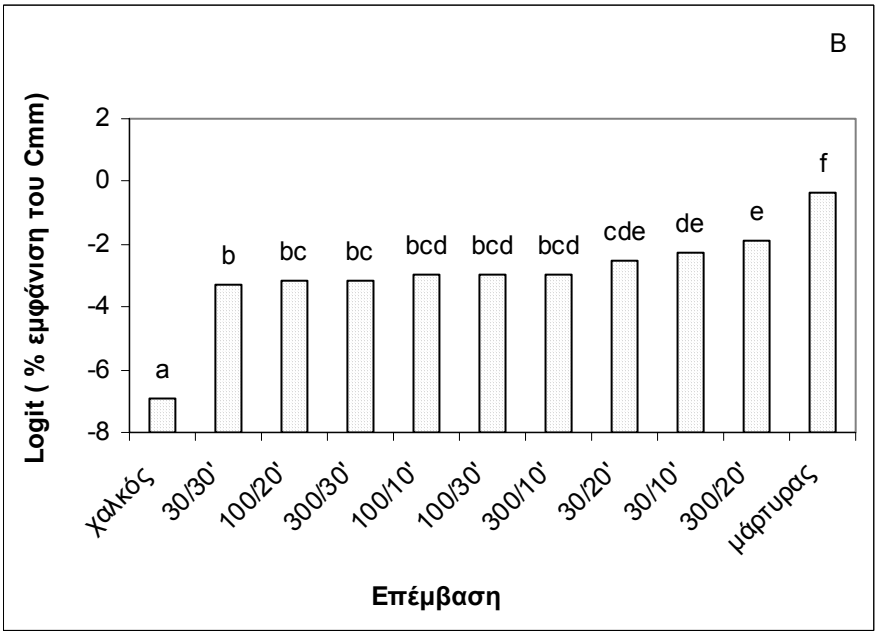
Οι σπόροι εμβαπτίστηκαν σε διαλύματα νιτρώδους νατρίου, που σχηματίστηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικού οξέος (pH 2), σε συγκεντρώσεις 30, 100 και 300 mM για 10, 20 και 30 λεπτά για κάθε μία επέμβαση. Ως μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν: υδροξείδιο του χαλκού (Kocide 101, 50% WP) στη δοσολογία: 0,003g/1ml για 10 λεπτά και ο σπόρος χωρίς επέμβαση (μάρτυρας). Το πείραμα πραγματοποιήθηκε 2 φορές.

Αποτελέσματα

Τα αποτελέσματα του πειράματος παρουσιάζονται στην εικόνα 1Α. Σε όλες τις επεμβάσεις των νιτρωδών διαλυμάτων ανεξάρτητα από την συγκέντρωση και τον χρόνο εφαρμογής, όπως επίσης και η επέμβαση με το χαλκό, το ποσοστό εμφάνισης του παθογόνου ήταν μηδενικό (0%). Μόνο στους συνδυασμούς των 100mM /10 λεπτά και των 300mM /20 λεπτά το ποσοστό εμφάνισης ήταν 4 %, ενώ το αντίστοιχο ποσοστό για τον μάρτυρα ήταν 35 %.

Τα αποτελέσματα στην επανάληψη του πειράματος παρουσιάζονται στην εικόνα 1Β. Σε αυτό το πείραμα, ο χαλκός ήταν σημαντικά καλύτερος από τα νιτρώδη καθώς το ποσοστό εμφάνισης του Cmm ήταν και πάλι μηδενικό. Όμως παρόλα αυτά, όλες οι συγκεντρώσεις των νιτρωδών και οι διαφορετικοί χρόνοι που εφαρμόστηκαν έδωσαν σημαντικά καλύτερα αποτελέσματα από τον μάρτυρα. Το μέσο ποσοστό εμφάνισης του παθογόνου κυμάνθηκε μεταξύ 4-14%, ενώ στον μάρτυρα έφτασε το 41% (Εικόνα 17).





Εικόνα 1: Logits του ποσοστού εμφάνισης του Cmm σε σπόρους τομάτας in vitro για διάφορες επεμβάσεις (συγκεντρώσεις και χρόνοι εφαρμογής) νιτρικών διαλυμάτων, για το πείραμα 1 (Α) και την επανάληψή του (Β).

Πείραμα 2 (Βάκιλοι)

Υλικά και μέθοδοι

Οι βάκιλοι αναπτύχθηκαν σε Tryptone Soy Agar (TSA) για 24 ώρες σε θάλαμο επώασης στους 22^0C. Στη συνέχεια παρασκευάστηκαν αιωρήματα των βακίλων σε απιονισμένο και αποστειρωμένο (ΑΑ) νερό οπτικής πυκνότητας (Optical Density-O.D.) 0,1. Αυτή η οπτική πυκνότητα, που μετρήθηκε με το σπεκτροφωτόμετρο στα 600 nm, αντιστοιχεί σε περίπου 10^8 cfu/ml. Κατόπιν, 100ml TSB εμβολιάστηκαν με 100 μl αιωρήματος από την κάθε καλλιέργεια του βακίλου, σε κωνικές φιάλες των 200ml. Οι καλλιέργειες επωάστηκαν σε περιστροφικό θάλαμο ανάπτυξης (Orbit) για τρεις ημέρες στους 30°C.

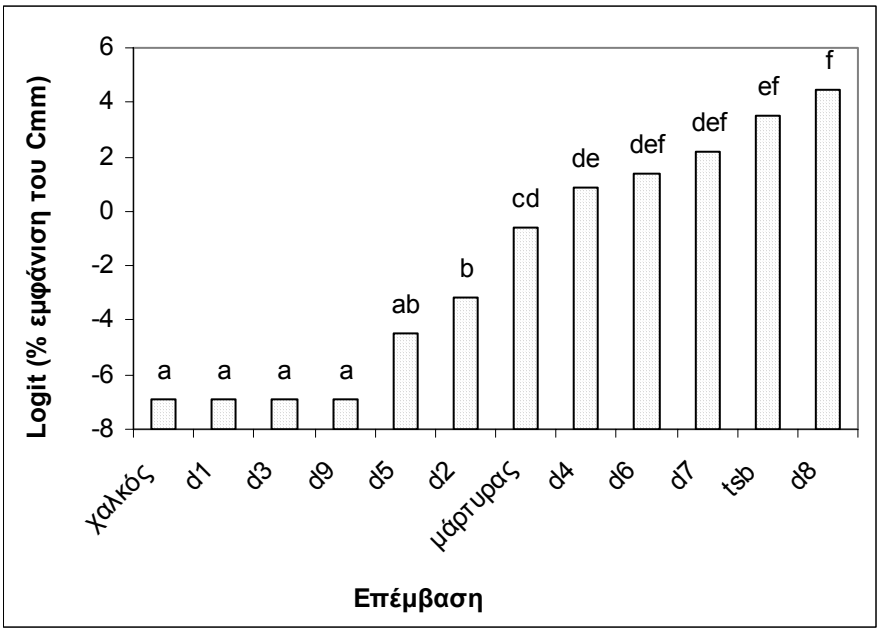
Οι σπόροι εμβαπτίστηκαν για 10 λεπτά σε υγρές καλλιέργειες (20 ml), 9 διαφορετικών στελεχών βακίλων του γένους *Bacillus* spp. (d1, d2, d3, d4, d5, d6, d7, d8, d9). Ως μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν: υδροξείδιο του χαλκού (Kocide 101, 50% WP) στη δοσολογία: 0,003g/1ml, το θρεπτικό υπόστρωμα Trypton Soy Broth (TSB) και ο σπόρος χωρίς επέμβαση (μάρτυρας).

Αποτελέσματα

Τα αποτελέσματα του πειράματος 2 παρουσιάζονται στην εικόνα 2. Στις επεμβάσεις με τα στελέχη d1, d3 και d9 όπως και σε αυτήν με τον χαλκό, το ποσοστό εμφάνισης του Cmm βρέθηκε μηδενικό (0%), ενώ στον μάρτυρα το αντίστοιχο ποσοστό ήταν 35% (Εικόνες 18-20).

Οι επεμβάσεις με τα στελέχη d2 και d5 έδωσαν ποσοστά εμφάνισης 4% και 6% αντίστοιχα, αλλά ήταν σημαντικά καλύτερα από τον μάρτυρα.

Τέλος, οι επεμβάσεις με τα στελέχη d4, d6, d7, d8, καθώς και με το θρεπτικό υπόστρωμα TSB δεν διέφεραν σημαντικά από τον μάρτυρα με τα ποσοστά εμφάνισης να κυμαίνονται από 30 μέχρι 90%.



Εικόνα 2: Logits του ποσοστού εμφάνισης του Cmm σε σπόρους τομάτας in vitro για διάφορες επεμβάσεις με στελέχη βακίλων *Bacillus* spp., (πείραμα 2).

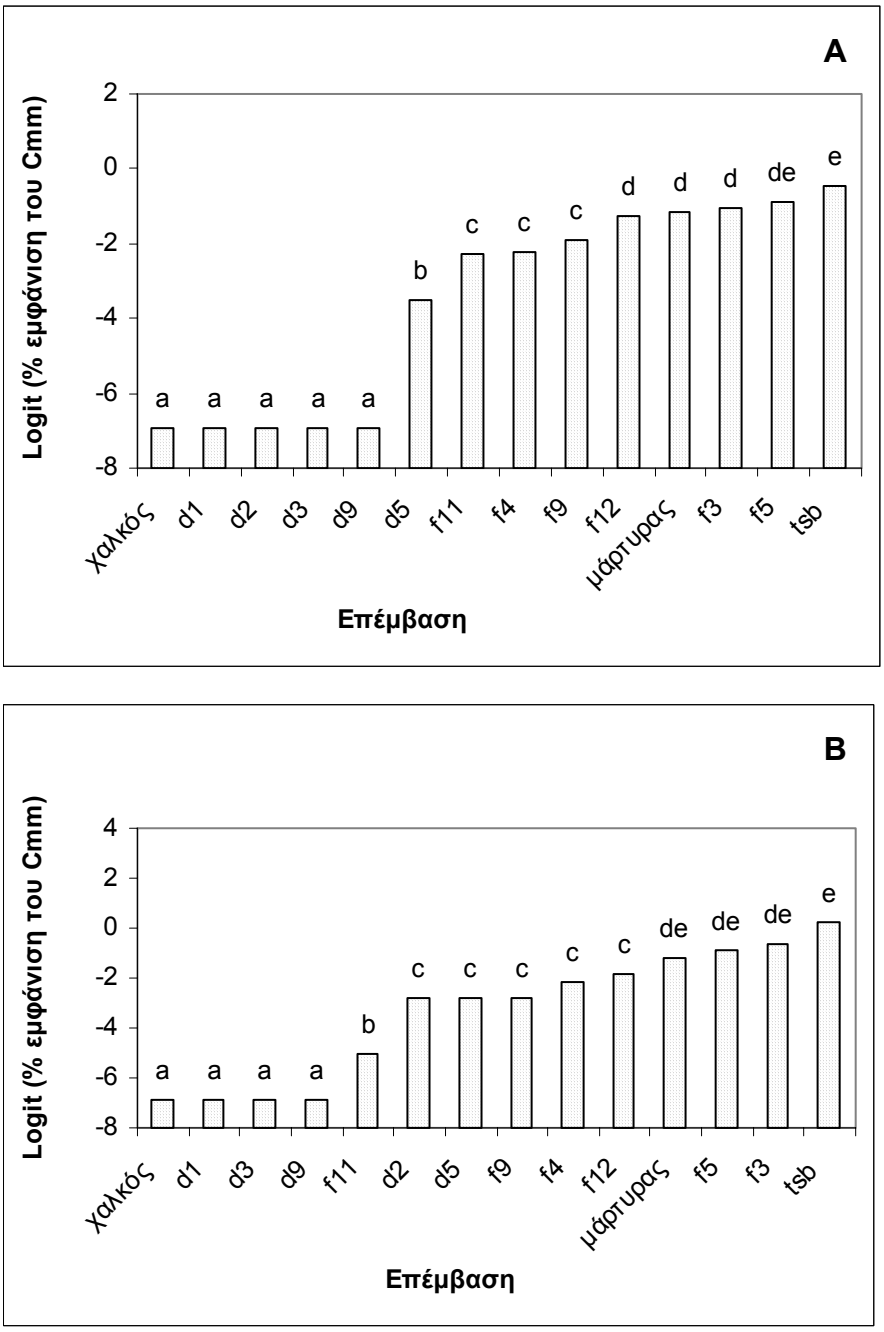
Πείραμα 3 (Βάκιλοι)

Υλικά και μέθοδοι

Χρησιμοποιήθηκε η ίδια μεθοδολογία όπως στο πείραμα 2. Πραγματοποιήθηκαν οι ακόλουθες επεμβάσεις: Τα στελέχη βακίλων d1, d2, d3, d5 και d9 του γένους *Bacillus* spp. που έδωσαν τα καλύτερα αποτελέσματα στο πείραμα 2 και τα βακτηριακά στελέχη f3, f4, f5, f9, f11 και f12. Ως μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν: υδροξείδιο του χαλκού (Kocide 101, 50% WP) στη δοσολογία 0,003g/1ml, το θρεπτικό υπόστρωμα TSB και ο σπόρος χωρίς επέμβαση (μάρτυρας). Το πείραμα πραγματοποιήθηκε 2 φορές.

Αποτελέσματα

Τα αποτελέσματα του πειράματος 3 παρουσιάζονται στην εικόνα 3 (A & B). Τα στελέχη d1, d3 και d9 ήταν πολύ αποτελεσματικά καθώς έδωσαν για μία ακόμη φορά μηδενικά ποσοστά εμφάνισης του παθογόνου(0%) και δεν διέφεραν σημαντικά από τον χαλκό (εικ.3 A & B). Τα υπόλοιπα στελέχη (εκτός των f3, f5 και TSB) ήταν επίσης σημαντικά καλύτερα από τον μάρτυρα (εικ.3 A & B). Τέλος, το στέλεχος f12 ενώ στο αρχικό πείραμα δεν διέφερε από τον μάρτυρα, στην επανάληψη ήταν σημαντικά καλύτερό του. Όλα τα στελέχη f εμφανίστηκαν σημαντικά λιγότερο αποτελεσματικά από τα στελέχη d.



Εικόνα 3: Logits του ποσοστού εμφάνισης του Cmm σε σπόρους τομάτας in vitro για διάφορες επεμβάσεις με στελέχη βακίλων *Bacillus* spp., για το πείραμα 3(A) και την επανάληψή του (B).

Πείραμα 4 (Εκχυλίσματα κομπόστας)

Υλικά και μέθοδοι

Η επέμβαση στο σπόρο έγινε με την εφαρμογή εκχυλισμάτων από 8 διαφορετικούς τύπους κομπόστας. Χρησιμοποιήθηκαν οι κομπόστες με τους κωδικούς073, 074, 075, 076, 077, 078, 079, 080, που προέρχονται από το Ερευνητικό Ινστιτούτο Οργανικής Γεωπονίας του Ackerstrasse, της Ελβετίας. Η εφαρμογή των επεμβάσεων έγινε χωρίς αραίωση του εκχυλίσματος, αφού σε προκαταρτικά πειράματα βρέθηκε ότι δεν ήταν φυτοτοξικές. Τα εκχυλίσματα παρασκευάσθηκαν ως εξής: ποσότητα 100 ml από κάθε κομπόστα διαλύθηκε σε 200ml νερού και παρέμεινε σε αιώρηση για τρεις ημέρες σε θερμοκρασία δωματίου (περίπου στους 22^0C). Στη συνέχεια, το μείγμα διηθήθηκε από τέσσερις στρώσεις γάζας. Οι σπόροι εμβαπτίστηκαν στο εκχύλισμα για 24 ώρες. Το πείραμα πραγματοποιήθηκε 2 φορές.

Ως μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν: υδροξείδιο του χαλκού (Kocide 101, 50% WP) στη δοσολογία 0,003g/1ml και ο σπόρος χωρίς επέμβαση (μάρτυρας).

Αποτελέσματα

Ανεξάρτητα από την επέμβαση (τύπος κομπόστας ή χαλκός) το ποσοστό εμφάνισης του παθογόνου ήταν μηδενικό και στις δύο εφαρμογές του πειράματος (γι' αυτό και δεν έγινε στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων). Αντιθέτως στο σπόρο χωρίς επέμβαση (μάρτυρα), το ποσοστό εμφάνισης του παθογόνου στις δύο επαναλήψεις του πειράματος ήταν 62 και 56 % αντίστοιχα.

Σε όλες τις επεμβάσεις με τα εκχυλίσματα παρατηρήθηκε η ανάπτυξη διάφορων μυκήτων γύρω από τους σπόρους, εκτός από την επέμβαση με το εκχύλισμα της κομπόστας 073 στο οποίο αναπτύχθηκε η καλλιέργεια βακτηρίου (διαφορετικού του Cmm). Οι σπόροι δε σάπισαν και εκτιμάται ότι διατήρησαν τη βλαστικότητά τους.

Πίνακας 4: Επίδραση των επεμβάσεων με κομπόστες, σε μολυσμένους σπόρους τομάτας, στην ανάπτυξη του Cmm σε θρεπτικό υπόστρωμα.

ΠΕΙΡΑΜΑ 4	**Εμφάνιση του Cmm (%)**	
Επέμβαση	**Επανάληψη πρώτη**	**Επανάληψη δεύτερη**
Μάρτυρας	**62**	**56**
Χαλκός	**0**	**0**
073 (green waste)	**0**	**0**
074 (green waste)	**0**	**0**
075 (2/3 cow-manure, 1/3 greenwaste)	**0**	**0**
076 (greenwaste)	**0**	**0**
077 (green waste / horse manure)	**0**	**0**
078 (green waste with lignin)	**0**	**0**
079 (greenwaste with tree leaves)	**0**	**0**
080 (digestate from biowaste)	**0**	**0**

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ένα μεγάλο μέρος των καλλιεργούμενων φυτών είναι ευαίσθητα σε ασθένειες που προκαλούνται από βακτήρια. Οι βακτηριώσεις των φυτών, παρά το γεγονός ότι είναι μικρότερες σε αριθμό από εκείνες που προκαλούνται από μύκητες ή τους ιούς, είναι ασθένειες που αντιμετωπίζονται πολύ δύσκολα και συχνά καταλήγουν σε άμεσες ή έμμεσες καταστροφικές απώλειες της γεωργικής παραγωγής. Σε αυτό συμβάλλουν η έλλειψη ή η αδυναμία χρήσης δραστικών χημικών ενώσεων που είναι τοξικές ενάντια στα βακτήρια και ο γρήγορος ρυθμός πολλαπλασιασμού τους, όταν οι συνθήκες είναι ευνοϊκές (Γκούμας, 2004). Γι' αυτόν ακριβώς το λόγο, οι ανάγκες να βρεθούν νέες μέθοδοι για την αντιμετώπιση των βακτηριώσεων είναι άμεσες και έτσι όλες οι εναλλακτικές προσπάθειες που εφαρμόζονται παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον όσον αφορά την πιθανή τους επιτυχία στον περιορισμό των παθογόνων οργανισμών.

Ορισμένες από τις επεμβάσεις των εναλλακτικών μεθόδων που εφαρμόστηκαν σε αυτά τα πειράματα εμφανίζονται αρκετά αποτελεσματικές όσον αφορά τον περιορισμό της εμφάνισης του βακτηρίου σε τεχνητά μολυσμένο σπόρο τομάτας. Οι επεμβάσεις με τα εκχυλίσματα κομπόστας και με τα ανταγωνιστικά βακτηριακά στελέχη βακίλων περιόρισαν την εμφάνιση του παθογόνου, δηλαδή την ανάπτυξη σε εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα σε ποσοστό ακόμη και 100%. Παρόμοια αποτελέσματα έδωσε μόνο η επέμβαση στο σπόρο με το υδροξείδιο του χαλκού (μάρτυρας), στη συγκέντρωση των 0,003 g/ml. Τα υπόλοιπα βακτηριακά στελέχη που εξετάστηκαν δεν έδωσαν ικανοποιητικά αποτελέσματα. Η επέμβαση με το θρεπτικό υπόστρωμα Trypton Soy Broth (TSB) στο οποίο αναπτύσσονταν οι καλλιέργειες των βακίλων (ως μάρτυρας) δε φαίνεται να επιδρά στο βακτήριο και υποδηλώνει ότι δεν υπήρχε συνεργιστική δράση με εκείνη των βακτηριακών στελεχών.

Οι επεμβάσεις με το σύνολο των εκχυλισμάτων της κομπόστας από διάφορα οργανικά υλικά, όπως επίσης και με τρία (d1, d3, d9) από τα εικοσιένα επιλεγμένα ανταγωνιστικά βακτηριακά στελέχη βακίλων που δοκιμάστηκαν, έδωσαν πολύ ικανοποιητικά αποτελέσματα, αφού σε καμία περίπτωση δεν παρατηρήθηκε ανάπτυξη του παθογόνου βακτηρίου στο εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα για τουλάχιστον 21 μέρες μετά την εφαρμογή ης επέμβασης. Το γεγονός αυτό σίγουρα υποδηλώνει ότι τουλάχιστον εξωτερικά του σπόρου οι συγκεκριμένες επεμβάσεις είχαν ως αποτέλεσμα την θανάτωση του βακτηρίου. Επίσης, δεδομένου του τρόπου εφαρμογής των επεμβάσεων, δεν πρέπει να αποκλειστεί και η πιθανότητα θανάτωσης του παθογόνου στο εσωτερικό του σπόρου.

Το γεγονός ότι η επέμβαση με χαλκό $Cu(OH)_2$ σε συγκέντρωση 0,003 g/ml έδωσε παρόμοια αποτελέσματα, δηλαδή απόλυτη προστασία του σπόρου, σε συνδυασμό με το υψηλό ποσοστό μόλυνσης του σπόρου, συνηγορούν στην άποψη αυτή.

Από την παρούσα μελέτη δεν μπορούμε να συμπεράνουμε που οφείλεται η αποτελεσματικότητα των επεμβάσεων με τα εκχυλίσματα κομπόστας και με τα τρία στελέχη των βακίλων. Όμως σε παρόμοιες μελέτες αναφέρεται ότι τόσο τα εκχυλίσματα κομπόστας όσο διάφορα βακτήρια του γένους *Bacillus* spp. μπορεί να προκαλέσουν ανεξάρτητα ή σε συνδυασμό την άμεση ενεργοποίηση ορμονών, την παραγωγή αντιβιοτικών, την επαγωγή των μηχανισμών της αντοχής των φυτών. Εξάλλου είναι γνωστή η ευεργετική επίδραση τόσο των εκχυλισμάτων κομπόστας όσο και ορισμένων βακίλων τόσο στη βλαστικότητα των σπόρων όσο και στην εν γένει βελτίωση της ανάπτυξης των σπορόφυτων σε διάφορες καλλιέργειες. Επιπλέον, γνωστή είναι η δράση και των δύο στον περιορισμό της ανάπτυξης διαφόρων φυτοπαθογόνων δρώντας με έναν από τους προαναφερθέντες τρόπους, με αποτέλεσμα τη μερική ή ολική προστασία των φυτών από διάφορους φυτοπαθογόνους μικροοργανισμούς (Weltzien, 1991; Leifert *et al*., 1995; Kavroulakis *et al.*, 2005).

Η επέμβαση με τα νιτρώδη δεν έδωσε σταθερά αποτελέσματα, παρά το γεγονός ότι και στα δύο πειράματα η μείωση του ποσοστού της εμφάνισης του παθογόνου ήταν σημαντική. Συγκεκριμένα, το ποσοστό ανάπτυξης του βακτηρίου από 35% στον μάρτυρα μειώθηκε στο 0-4% και από 41% στο 4-14%, ανεξάρτητα από τον χρησιμοποιηθέντα συνδυασμό νιτρώδους και χρόνου εφαρμογής του. Οι μειώσεις αν και σημαντικές και πιθανώς αξιοποιήσιμες σε περιπτώσεις άλλων φυτοπαθογόνων, δεν είναι στην περίπτωση του Cmm όπου επιζητείται η πλήρης απαλλαγή του σπόρου, αφού ένας μολυσμένος σπόρος σε 10.000 μπορεί να προκαλέσει σημαντικά προβλήματα ιδιαίτερα στα φυτώρια (Παναγόπουλος, 2000).

Τα νιτρώδη αντιδρούν με τις αμίνες και τις αμίδες στο ανθρώπινο στομάχι και μπορούν να σχηματίζουν καρκινογενετικές ενώσεις (Duncan *et al*., 1995). Όμως, πρόσφατες εργασίες αποκάλυψαν ότι η οξείδωση των νιτρικών στο στομάχι έχει ευεργετικά αποτελέσματα καθώς παρεμποδίζει σημαντικά την ανάπτυξη παθογόνων όπως η *Candida albicans* και το *Escherichia coli* (Duncan *et al*., 1997).

Σε γενικές γραμμές και λαμβάνοντας υπ' όψιν τα αποτελέσματα των πειραμάτων που έγιναν μπορούμε να θεωρήσουμε ότι οι εναλλακτικές μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη έδωσαν αρκετά ικανοποιητικά αποτελέσματα. Εφόσον η επίδρασή τους ενάντια στο *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* μεταδιδόμενο από

σπόρο κυμάνθηκε στα ίδια επίπεδα με τον χαλκό, είναι σε θέση να αποτελέσουν νέες εναλλακτικές μεθόδους για την καταπολέμησή του. Τέλος, καλό θα ήταν τα ίδια πειράματα να εφαρμοστούν σε φυσικώς μολυσμένους σπόρους τομάτας, καθώς υπάρχει το ενδεχόμενο τα αποτελέσματα να διαφοροποιηθούν.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Anonymous 2004. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Διαθέσιμο από: http://www.eppo.org/QUARANTINE/bacteria/Clavibacter_m_michiganensis.html

Antoniou P. P., Tjamos E. C., & Panagopoulos C. G., 1995. Use of soil solarization for controlling bacterial canker of tomato in plastic houses in Greece. *Plant Pathology*, **44**: 438-447.

Baker K. F., 1987. Evolving concepts of biological control of plants pathogens. Ann. Rev. Phytopathology **25**: 67-85.

Carlton W.M., Braun E. J., and Gleason M. L., 1998. Ingress of *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis* into tomato leaves through hydathodes. Phytopathology **88**:525-529.

Claus D., Berkeley R. C. W.,1986. Genus *Bacillus* Cohn 1872. In: Sneath PHA, ed. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Section 13, Vol. 2 Baltimore, MD, USA: Williams & Wilkins Co, 1105-39.

Cook J. R. & Baker K. F., 1983. The nature and practice of biological control of plant pathogens. APS: St. Paul.

Cook J. R., 1993. Making greter use of introduced microorganisms for biological control of plant pathogens. Ann. Rev. Phytopathology **31**:53-80.

Duncan C., Dougall H., Johnston P., Green S., Brogan R., Leifert C., Smith L., Golden M. & Benjamin N. 1995. Chemical generation of nitric oxide in the mouth from enterosalivary circulation of dietary nitrate. Nature Medicine 1 (6):546-551.

Duncan C., Li H., Dykhuizen R., Frazer R., Macknight G., Johnston P., Smith L., Lamza K., Mckenzie H., Batt L., Kelly D., Golden M., Benjamin N. and Leifert C., 1997. Protection against oral and gastrointestinal diseases: Importance of dietary intake, oral nitate reduction and enterosalivary nitrate circulation. Comp. Biochem. Physiol. 118A (4):939-948.

Elad Y., 1996. Mechanisms involved in the biological control of *Botrytis cinerea* incited diseases. Eur. J. Plant Pathology **102**: 719-732 (Review).

Fatmi M., Schaad N.W, 1991. Seed treatments for eradicating *Clavibacter michiganensis* subsp. *miciganensis* from naturally infected tomato seeds. Plant disease 75 (4):383-385.

Fessehaie A., De Boer S. H., and Levesque A., 2003. An oligonucleotide for the identification and differentiation of bacteria pathogenic of potato. Phytopathology **93**:262-269.

Γκούμας Δ., 2004. Από την έρευνα στην παραγωγή: Τα αντιβιοτικά στην αντιμετώπιση των φυτοβακτηριώσεων. Εφημερίδα Πατρίδα, 7/10/2004.

Gleason M., Gitaitis R., Ricker ., 1993. Recent progress in understanding and controlling Bacterial Canker of tomato in eastern North America.

Hausbeck M. K., Bell J., Medina-Mora C., Podolsky R., and Fulbright D. W., 2000. Effect of bactericides on population sizes and spread of *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis* on tomatoes in the greenhouse and on disease development and crop yield in the field. Phytopathology **90**:38-44.

Hausbeck M. K., Bell J., Werner N. A., Podolsky R., and Fulbright D. W., 2002. Limiting populations and spread of *Clavibacter michiganensis* ssp. *Michiganensis* on seedling tomatoes in the greenhouse. Plant Disease **86**:535-542.

Huang R., and Tu J. C., 2001. Effects of nutrient solution pH on the survival and transmission of *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis* in hydroponically grown tomatoes.

Hoitink H.A.J. and Boehm M.J., 1999. Biocontrol within the context of soil microbial communities: a substrate-dependent phenomenon. Ann Rev Phytopathol. **37,** 427-446.

Kavroulakis N., Ehaliotis C., Ntougias S., Zervakis G. I. and Papadopoulou K. K., 2005. Local and systemic resistance against fungal pathogens of tomato plants elicited by a compost derived from agricultural residues. Physiological and Molecular Plant Pathology **66***, 163-174.*

Kloepper J. W., Rodriguez- Kabana R., Zehnder G. W., Murphy J. F., Sikora E., Fernandez C., 1999. Plant root- bacterial interactions in biological control of soilborne diseases and potential extension to systemic and foliar diseases. Australian Plant Pathology **28**, 21-6.

Krebs B., Hoding B., Kubart S., Alemayehu Workie M., Junge H., Schmiedeknecht G., Grosch R., Bochow H., Hevesi M., 1998. Use of *Bacillus subtilis* as biological control agent. I. Activities and characterization of *Bacillus subtilis* strains. Journal of Plant Disease and Protection **105**, 181-97.

Kwok O.C.H., Hoitink H.A.J. and Chen W., 1987. Characterization of bacteria involved in suppression of Phythium damping-off. *(Abstr.)* Phytopathology **77**, 1707.

Leifert C., Li H., Chidsburee S., Hampson S., Workman S., Sigee D., Epton H.A.S., and Harbour A., 1995. Antibiotic production and biocontrol activity by *Bacillus subtilis* CL27 and *Bacillus pumilus* CL45.

Loeffler W., Tschen J. S.-M., Vanittanakom N., Kugler M., Knorpp E., Hsieh T.-F., and Wu T.-G., 1986. Antifungal effects of Bacilysin and Fengymycin from *Bacillus subtilis* F-29-3. A comparison with activities of other *Bacillus* antibiotics. Phytopathology, **115**, 204-213.

Macnab A., 2004. Tomato bacterial canker (some reference material). Plant Pathology Department.

Mercier J. & Arul J., 1993. Induction of systemic-disease resistance in carrot roots by pre-inoculation with storage pathogens. Can. J. Pl. Pathology **15**:281-283.

McKellar M.E. and Nelson E.B., 2003. Compost-induced suppression of Pythium damping-off is mediated by fatty-acid-metabolizing seed-colonizing microbial communities. Appl Environ Microbiol **69**, 452–460.

Παναγόπουλος Χ., 2000. Ασθένειες κηπευτικών καλλιεργειών. Εκδόσεις Σταμούλη, Αθήνα.

Sigee D. C., 1993. Cell and molecular aspects. Bacterial Plant Pathology, 279-303.

Singh U.P., Maurya S. and Singh D.P., 2003. Antifungal activity and induced resistance in pea by aqueous extract of vermicompost and for control of powdery mildew of pea and balsam. J Plant Dis Protect **110**, 544–553.

Stabb W. V., Jacobson L. M., Handelsman J., 1994. Zwittermicin A- producing strains of *Bacillus Cereus* from diverse soils. Applied and Environmental Microbiology **60**, 4404-12.

Todar K., 1997. The control of microbial growth. University of Wisconsin Department of Bacteriology.

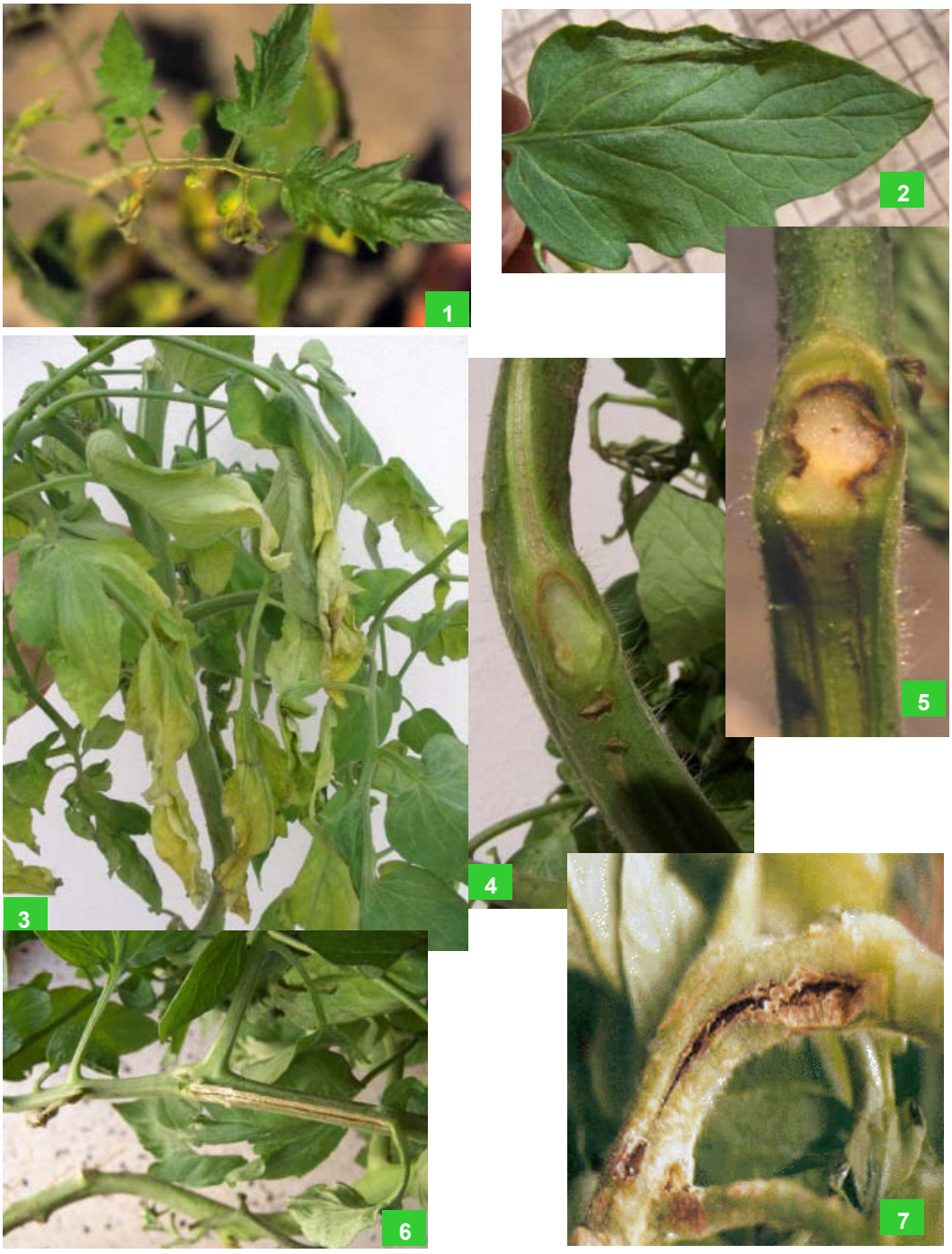
Utkhede R., and Koch C., 2004. Biological treatments to control bacterial canker of greenhouse tomatoes. Biocontrol **49**:305-314.

VanLoon L. C., 1997. Induced resistance in plants and the role of pathogenesis- related proteins. Europ. J. Pl. Pathology **103(9)**: 753-765.

Walker R., Powell A. A. & Seddon B., 1998. *Bacillus* isolates from the spermosphere of peas and dwarf French beans with antifungal activity against *Botrytis cinerea* and *Pythium* species. J Appl. Microbiology **84**: 791-801.

Wulff E. G., Mguni C. M., Mansfeld- Giese K., Fels J., Lubeck M., & Hockenhull J., 2002. Biochemical and molecular characterization of *Bacillus amyloliquefaciens*, *B. subtilis* and *B. pumilus* isolates with distinct antagonistic potential against *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. Plant Pathology **51**, 574-584.

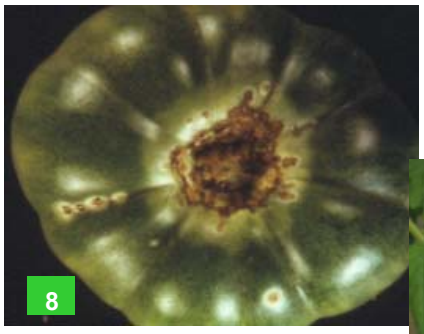
Φωτογραφικό υλικό

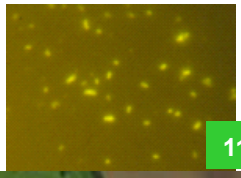


Clavibacter michiganensis* ssp. *Michiganensis (διασυστηματική μόλυνση)

ΕΙΚΟΝΑ 1. Σύμπτωμα ημιπληγίας (μονόπλευρη ξήρανση-μάρανση) σε φύλλο τομάτας.
ΕΙΚΟΝΑ 2. Περιφερειακή μάρανση σε φυλλάριο τομάτας.
ΕΙΚΟΝΑ 3. Τυπικά συμπτώματα σε ανεπτυγμένο φυτό.
ΕΙΚΟΝΑ 4 & 5. Καστανός μεταχρωματισμός σε σχήμα «πετάλου ίππου».
ΕΙΚΟΝΑ 6 & 7. Έλκη σε μίσχο και βλαστό.

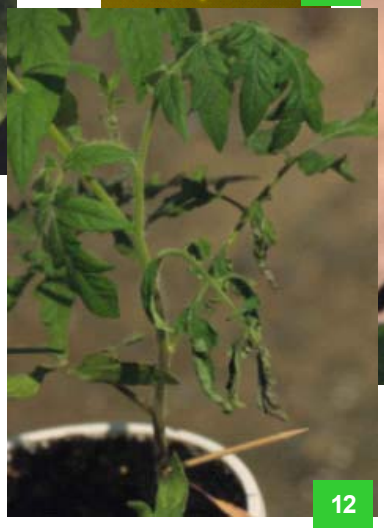
Φωτογραφικό υλικό









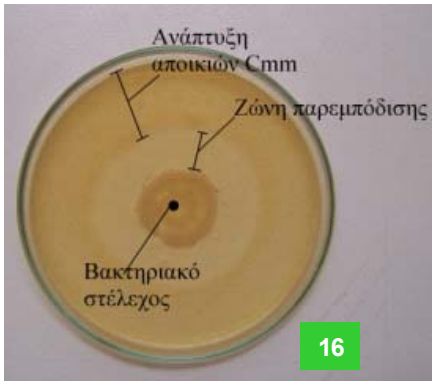


Clavibacter michiganensis* ssp. *Michiganensis (Δευτερογενείς μολύνσεις)
ΕΙΚΟΝΑ 8 & 9. Τυπικές κηλίδες «μάτι πηνού» και προσβολή του καρπού στο σημείο του ποδίσκου.
ΕΙΚΟΝΑ 10. Μικρά έλκη και καστανές κηλίδες σε βλαστό τομάτας από δευτερογενή προσβολή.
ΕΙΚΟΝΑ 11. Ανίχνευση του παθογόνου με ανοσοφθορισμό.
ΕΙΚΟΝΑ 12. Δοκιμή παθογένειας σε φυτό τομάτας.





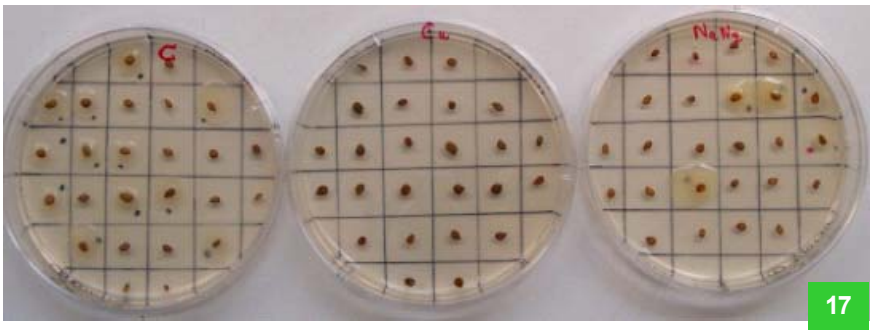




ΕΙΚΟΝΑ 13, 14 & 15. Ανάπτυξη της καλλιέργειας και των αποικιών του Cmm σε εκλεκτικά θρεπτικά υπόστρωμα m-SCM, CNS και NAG αντίστοιχα.

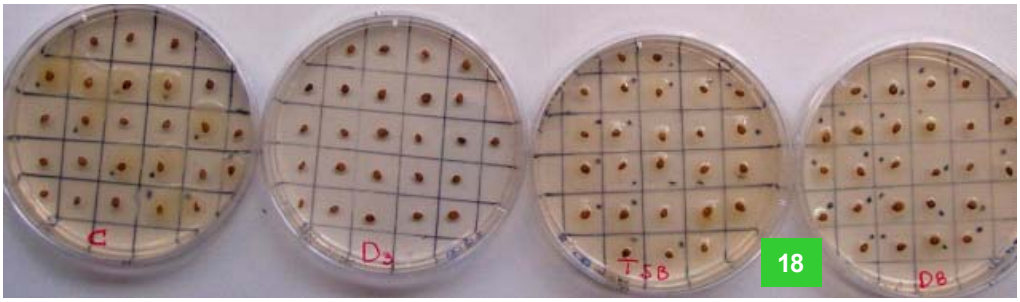
ΕΙΚΟΝΑ 16. ¨Ελεγχος ανταγωνιστικής δράσης βακτηριακού στελέχους έναντι του *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis* Δημιουργία ζώνης παρεμπόδισης.

Φωτογραφικό υλικό

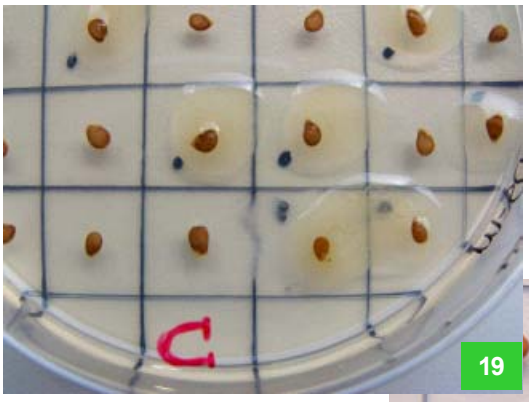


17

ΕΙΚΟΝΑ 17. Επέμβαση με nitrite (NaN_2). Τυπική ανάπτυξη της καλλιέργειας του *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis* σε εκλεκτικό υπόστρωμα m- SCM από σπόρους τομάτας: μολυσμένους χωρίς επέμβαση (C= μάρτυρας) και στην επέμβαση με nitrite (NaN_2) και απουσία ανάπτυξης στην επέμβαση με χαλκό (Cu).



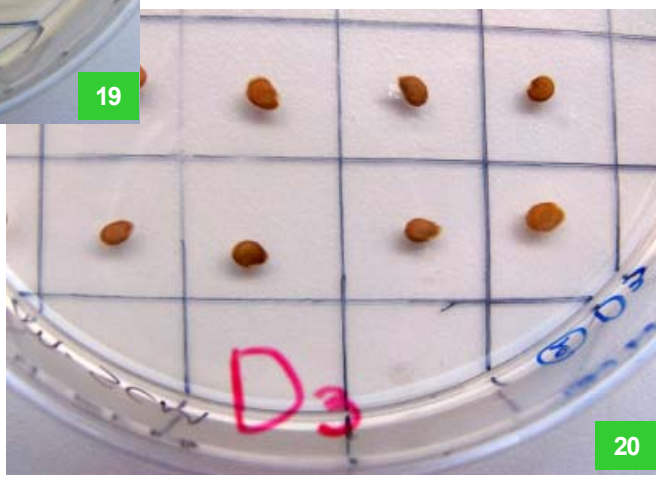
18



19

ΕΙΚΟΝΑ 18. Επέμβαση με ανταγωνιστικά βακτηριακά στελέχη (βάκιλοι). Τυπική ανάπτυξη της καλλιέργειας του *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis* σε εκλεκτικό υπόστρωμα m- SCM από σπόρους τομάτας: μολυσμένους χωρίς επέμβαση (C= μάρτυρας) και στις επεμβάσεις με το βάκιλο D8 και με το υπόστρωμα TSB (tryptone soy broth) και απουσία ανάπτυξης στην επέμβαση με το βάκιλο D3.

ΕΙΚΟΝΑ 19 & 20. Λεπτομέρειες από την εικόνα 18



20