

# Φυτοπροστασία κρίσιμα θέματα - πρόληψη

Δημήτρης Γκούμας  
Καθηγητής Φυτοπαθολογίας, ΕΛΜΕΠΑ

# Η σημασία

Η γεωργική παραγωγή στη χώρα μας αποτελεί αξιόλογο τομέα και έχει ως στόχο αφενός την κάλυψη των αναγκών της εσωτερικής αγοράς και αφετέρου την πραγματοποίηση εξαγωγών για εκείνα τα είδη που επιζητούνται στις αγορές του εξωτερικού και επιτυγχάνουν υψηλές τιμές

# Οι ασθένειες στα φυτά



**Στόχος** της γεωπονίας, της αγροτικής πολιτικής αλλά και των ίδιων των παραγωγών πρέπει να είναι η μείωση των απωλειών τροφίμων και η βελτίωση της ποιότητάς τους προστατεύοντας όμως ταυτόχρονα την ανθρώπινη υγεία και το περιβάλλον

## **Να θυμάμαι**

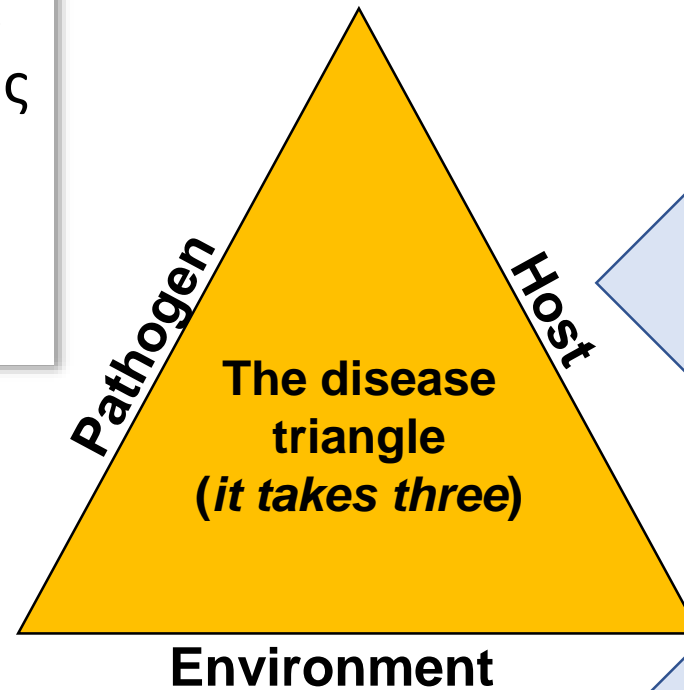
30 - 40% απώλειες από εχθρούς – παθογόνα – ζιζάνια

15% μετασυλλεκτικές απώλειες

# Τι οδηγεί μια αλληλεπίδραση σε ασθένεια; (Τρίγωνο ασθένειας)

Τα φυτά εκτίθενται σε πληθώρα μικροβίων, αλλά πολύ, πολύ λίγες από αυτές τις αλληλεπιδράσεις οδηγούν σε ασθένειες. Γιατί;

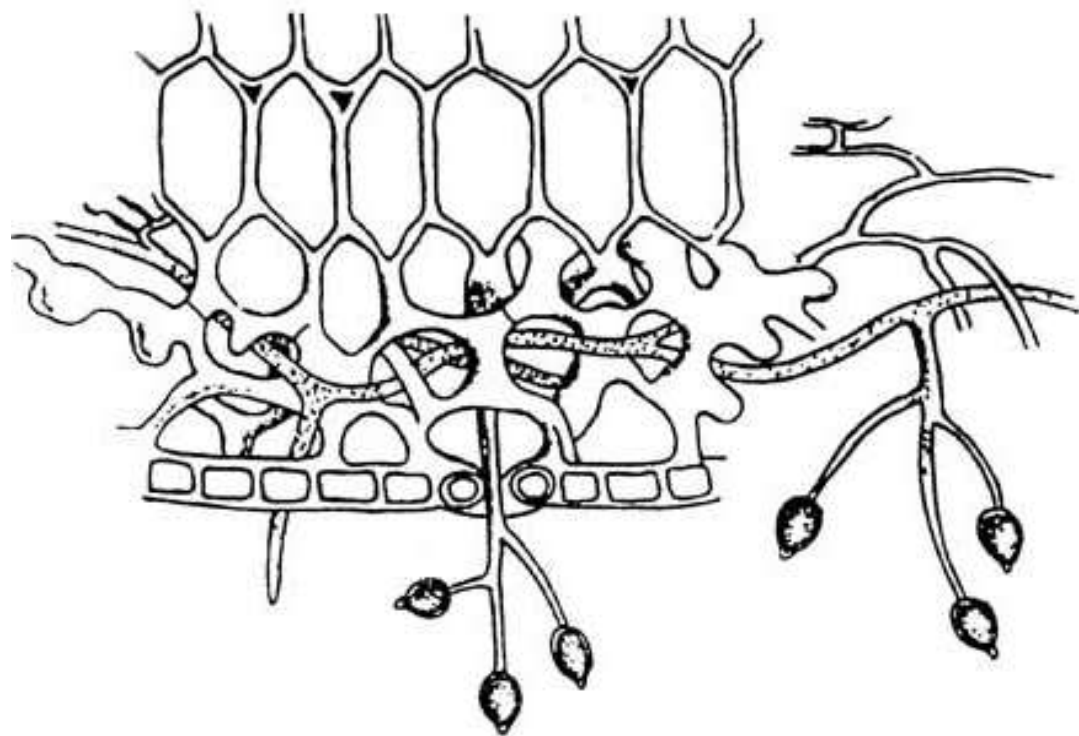
Το παθογόνο πρέπει να είναι σε θέση να υπερνικήσει την άμυνα των φυτών



Το φυτό ξενιστής πρέπει να είναι ευαίσθητο στο παθογόνο

Το περιβάλλον πρέπει να ανατρέψει την ισορροπία υπέρ του παθογόνου

# Φυτά και Παθογόνα

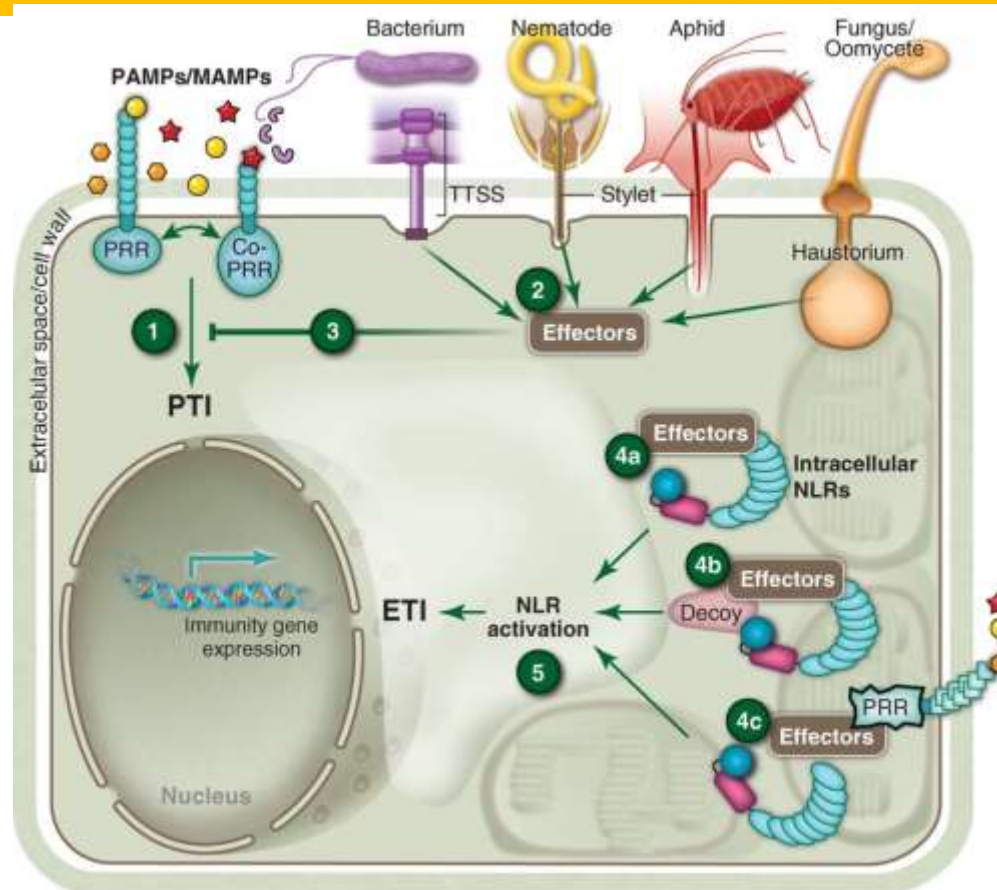


- **Οι ασθένειες των φυτών** προκαλούν σημαντικές απειλές για την παραγωγή τροφίμων
- **Τα παθογόνα** έχουν διαφορετικούς τρόπους παθογένειας και ταχέως αναπτυσσόμενους τελεστές
- **Τα φυτά** δεν είναι παθητικά θύματα - έχουν εξελιγμένους μηχανισμούς επιτήρησης και άμυνας
- **Οι ανθρώπινες πρακτικές**, ιδιαίτερα οι μετακινήσεις και οι μονοκαλλιέργειες, έχουν συμβάλει στο μέγεθος των φυτικών ασθενειών

# Φυτά και Παθογόνα

## Current model of plant–pathogen interactions

1. Membrane-localized receptors recognize the invader and trigger defense (PTI)
2. Pathogens produce effectors
3. Effectors suppress defense
4. R proteins recognize effectors directly or indirectly
5. Activated R proteins (nucleotide-binding leucine-rich repeat; NLR) trigger ETI and further defense

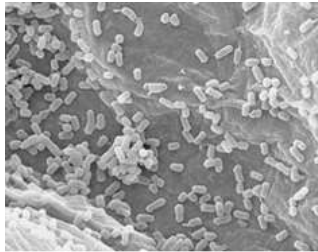


# ΚΑΤΑΠΟΛΕΜΗΣΗ:

ΠΡΕΠΕΙ να βασίζεται  
κυρίως στην  
ΠΡΟΛΗΨΗ και  
λιγότερο στη  
ΘΕΡΑΠΕΙΑ



# Σε περίπτωση προσβολής που συνήθως είναι ο κανόνας



Το πρώτο βήμα για σωστή  
αντιμετώπιση

Έγκαιρη και έγκυρη  
αναγνώριση  
συμπτωμάτων !!!!!



# Γενικές έννοιες στην αντιμετώπιση των ασθενειών (1)

- **Αποφυγή της ασθένειας:** επιλογή χρόνου σποράς, αλλά και της θέσης εγκατάστασης μιας φυτείας, όπου επικρατούν δυσμενείς συνθήκες για τη μόλυνση από συγκεκριμένο παθογόνο
- **Αποκλεισμός:** μείωση του ποσού του αρχικού μολύσματος που εισάγεται στον αγρό από εξωτερικές πηγές, παρεμπόδιση εισαγωγής ενός παθογόνου σε μία περιοχή, χώρα ή ήπειρο και αφορά κυρίως τα μέτρα **φυτοκαραντίνας**
- **Καταστροφή:** εξαφάνιση, εξολόθρευση ή αδρανοποίηση των μολυσμάτων
- **Προστασία ξενιστή:** επίτευξη μέσω των ψεκασμών με τοξικές ενώσεις ή άλλους παρεμποδιστές της μόλυνσης, για την παρεμπόδιση της μόλυνσής του με **μείωση του ρυθμού μόλυνσης**
- **Αξιοποίηση αντοχής** των φυτών σε συγκεκριμένα παθογόνα
- **Θεραπεία** προσβεβλημένων ήδη φυτών

# Γενικές έννοιες στην αντιμετώπιση των ασθενειών (2)

- Παλαιότερα ο στόχος ήταν ο εκμηδενισμός της ασθένειας (αποκλεισμός, παρεμπόδιση, εξολόθρευση), ..... ωστόσο δεν έχει πρακτική σημασία μιας και είναι ανέφικτη και οικονομικά ασύμφορη
- Το ζητούμενο είναι η **μείωση της ταχύτητας προέλασης και πολλαπλασιασμού του παθογόνου** και κατ' επέκταση **η συγκράτηση της ανάπτυξης της ασθένειας** μέσα σε αποδεκτά επίπεδα
- Η σύγχρονη αντίληψη είναι ο συνδυασμός των ανωτέρω με τις αρχές της επιδημιολογίας, για την επίτευξη της ολιστικής προσέγγισης της αντιμετώπισης των ασθενειών των φυτών

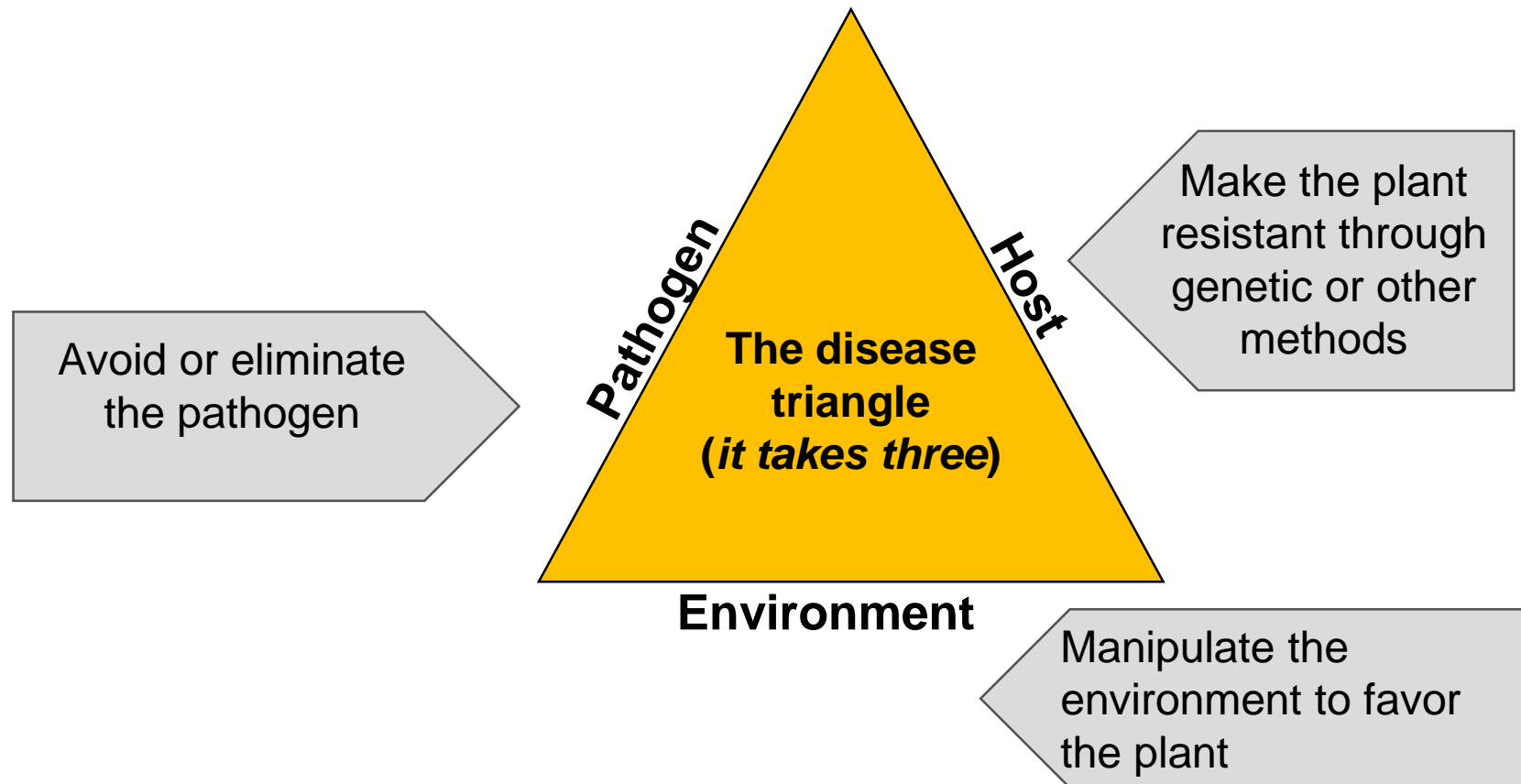
# Αρχές αντιμετώπισης των ασθενειών

- Παραδοσιακές μέθοδοι αντιμετώπισης των ασθενειών είναι:
- Χρήση ανθεκτικών ή ανεκτικών ποικιλιών, υβριδίων, υποκειμένων
- Καλλιεργητικές πρακτικές, π.χ. αμειψισπορά
- Εφαρμογή κανόνων φυτοϋγιεινής (καταστροφή υπολειμμάτων καλλιέργειας, απομάκρυνση ασθενών φυτών, αποφυγή δημιουργίας πληγών, απομάκρυνση προσβεβλημένων οργάνων, καθαρισμός απολύμανση εργαλείων μηχανημάτων, ηλιοαπολύμανση εδάφους, κατάλληλες συνθήκες αποθήκευσης)
- Χημική καταπολέμηση (Όμως η αλόγιστη χρήση τους έχει πολλές φορές προκαλέσει δυσάρεστες επιπτώσεις τόσο στον άνθρωπο όσο και στο περιβάλλον)

# Ολοκληρωμένη Διαχείριση

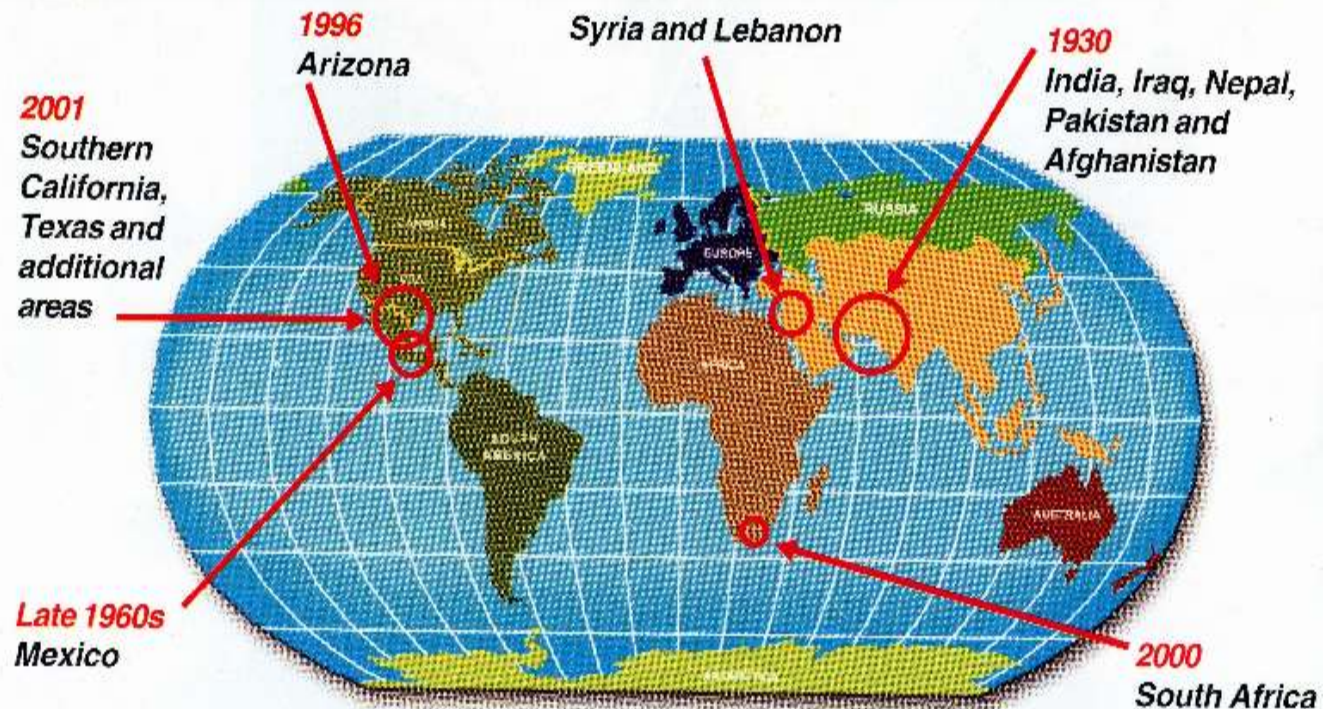
- Είναι το σύστημα που χρησιμοποιεί όλες τις διαθέσιμες μεθόδους σε ένα αρμονικά συμβατό συνδυασμό για την αντιμετώπιση μιας ασθένειας όπου λαμβάνεται υπόψη η οικολογική και κοινωνική διάσταση έτσι ώστε η ζημιά που θα προέρχεται από την ασθένεια να κρατείται κάτω από το επίπεδο της οικονομικής ζημιάς.
- Η ολοκληρωμένη διαχείριση των ασθενειών περιλαμβάνει τη χρησιμοποίηση των ακόλουθων μεθόδων
  - **Βιολογικές μέθοδοι**
  - **Χημική αντιμετώπιση** (Μεγάλη εκλεκτικότητα για τον οργανισμό - στόχο, ελαχίστη επίδραση στους οργανισμούς - μη στόχους (χειριστές, καταναλωτές, μέλισσες, ωφέλιμα αρθρόποδα, πτηνά, ψάρια κ.λπ.), μικρό βαθμό έκπλυσης στα νερά, ταχύ ρυθμό αποδόμησης σε μη τοξικές ουσίες και μειωμένο κίνδυνο εμφάνισης ανθεκτικότητας)
  - **Καλλιεργητικά μέτρα**

# Στρατηγικές πρόληψης και διαχείρισης φυτονόσων



# Καραντίνα επιβραδύνει την εξάπλωση του *Tilletia indica*, αιτιολογικού παράγοντα του Karnal bunt

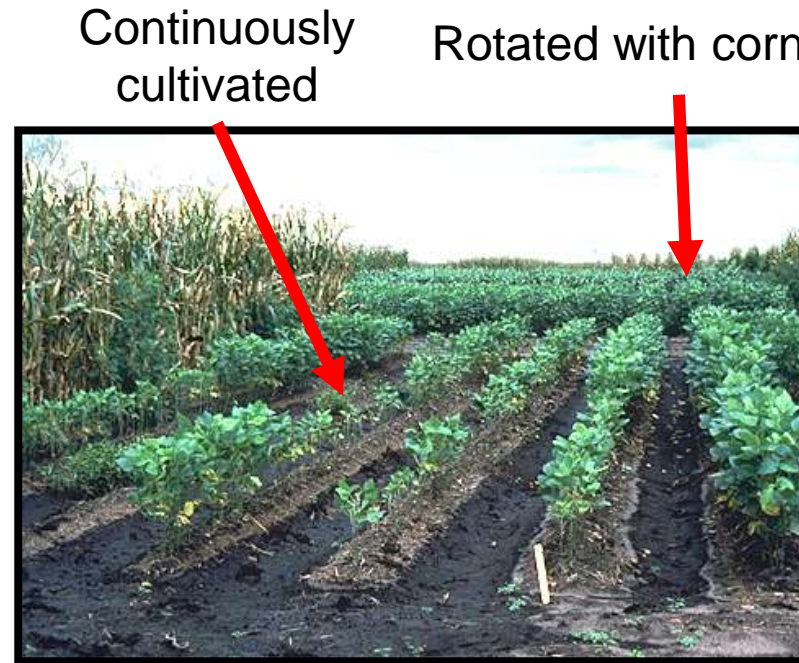
*Tilletia indica* is a fungus that attacks wheat kernels. Since first found in **1930 in India**, it has been spreading worldwide. Strict quarantine and inspection policies have kept it out of the EU and Australia (so far)....



# Οι επιπτώσεις των παθογόνων μπορούν να ελαχιστοποιηθούν με την υγιεινή και την αμειψισπορά



Removing and burning an infected citrus grove to eradicate bacterial canker



Rotating crops helps reduce pathogen load in soils

For pathogens that cannot survive long without a host, crop rotation is effective because the pathogens die during the time the field is planted with a non-host plant

# Χρησιμοποίηση πιστοποιημένου σπόρου ή φυτών χωρίς παθογόνα

Wheat seeds being propagated in a “pathogen free” field that is rigorously quarantined and inspected



Sterile tissue culture of vegetatively propagated banana and sweet potato plants

Checking seeds for fungal spores



# Καλλιεργητικές πρακτικές μπορούν να βοηθήσουν στην προστασία των φυτών από παθογόνα



Plants are more susceptible to disease when they are malnourished; here wheat succumbs to *Pythium* in phosphate-deficient soil

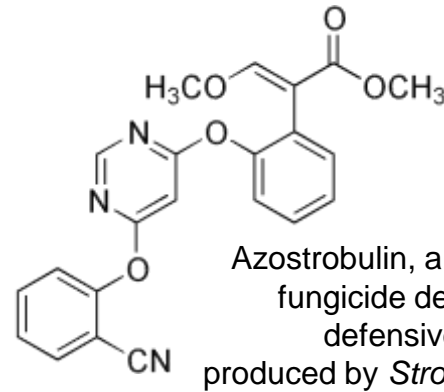


Phosphate deficient soil



Plastic sleeves on bananas to protect against pests and decay fungi

# Οι επεμβάσεις με χημικά συμβάλλουν στην εξάλειψη των παθογόνων

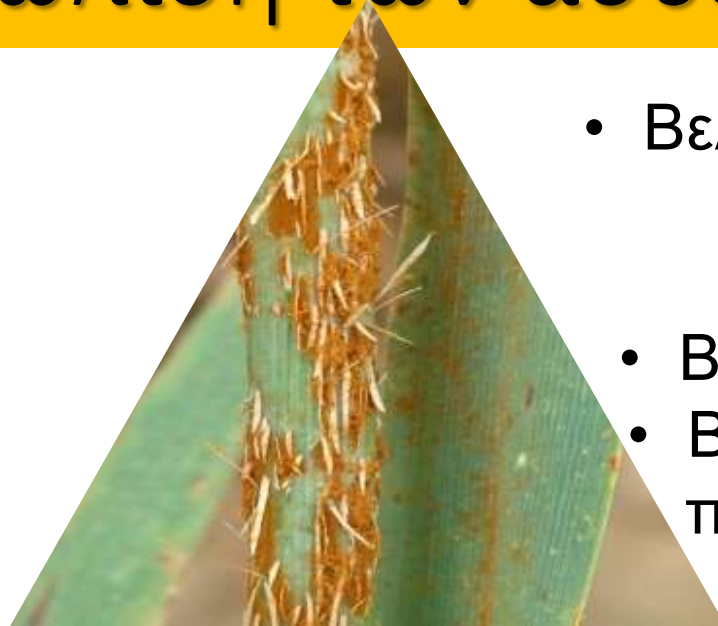


Οι επεμβάσεις πρέπει να είναι ασφαλείς και αποτελεσματικές και πρέπει να ακολουθούνται πρωτόκολλα εφαρμογής για να επιβραδύνεται η ανάπτυξη αντοχής

Επειδή τα παθογόνα αναπτύσσουν αντοχή, η εύρεση νέων ενώσεων για την εξάλειψη των παθογόνων είναι μια συνεχής διαδικασία

# Τι επιφυλάσσει το μέλλον για την αντιμετώπιση των ασθενειών

- Γρήγορες μέθοδοι ανίχνευσης και διάγνωσης παθογόνου
- Βελτιωμένη κατανόηση της «παθογένειας»
- Αποτελεσματικές μέθοδοι εκρίζωσης και βιοελέγχου



- Βελτιωμένη κατανόηση του τι κάνει τα φυτά ευπαθή ή ανθεκτικά
- Βελτιωμένη γενετική αντοχή
- Βελτιωμένες καλλιεργητικές πρακτικές για την υγεία των φυτών

**Προκλήσεις:** Αύξηση των απαιτήσεων λόγω της αύξησης του πληθυσμού και της κατανάλωσης κρέατος  
**Παγκόσμια αλλαγή**

**Ευκαιρίες:** Εργαλεία γονιδιωματικής και βιοτεχνολογίας για την επιτάχυνση της έρευνας  
**Βελτιώσεις στην εκπαίδευση και την πρόσβαση στην πληροφόρηση**

# Φυτοπροστασία

- Στο πλαίσιο της φυτοπροστασίας υφίσταται πλήθος μέτρων και μέσων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν στο επίπεδο αγρού, ανάλογα με το σύστημα καλλιέργειας (συμβατική, βιολογική, ολοκληρωμένη διαχείριση). Τα μέτρα αυτά ταξινομούνται σε διάφορες κατηγορίες
- καλλιεργητικά, χημικά, βιολογικά, βιοτεχνολογικά-βιοτεχνικά, φυσικά-οικολογικά, μηχανικά, νομοθετικά-διοικητικά ή ρυθμιστικές μέθοδοι, τα οποία μπορούν ανάλογα την περίπτωση του παθογόνου καραντίνας να σημειώσουν μικρότερη ή μεγαλύτερη επιτυχία.

# Φυτοπροστασία - παθογόνα καραντίνας

- Για τα παθογόνα καραντίνας τα πιο δραστικά μέτρα ανήκουν στην κατηγορία των νομοθετικών-διοικητικών μέτρων.
- Τα παθογόνα καραντίνας, ή επιβλαβείς οργανισμοί όπως περιγράφονται στη σχετική νομοθεσία, είναι διάφοροι (μικρο)οργανισμοί (έντομα, ακάρεα, νηματώδεις, φανερόγαμα παράσιτα, βακτήρια, μύκητες, ιοί, ιοειδή, σπειροπλάσματα και φυτοπλάσματα), των οποίων η παρουσία σε μια χώρα/γεωγραφική περιοχή, αφενός κρίνεται ως επιβλαβής στα φυτά και στα φυτικά προϊόντα και αφετέρου η εμφάνιση και εξάπλωσή τους μπορεί να επηρεάσει άμεσα και τάχιστα δυσμενώς καλλιέργειες οικονομικής σημασίας ή και να προκαλέσει ζημιές σε ενδημικά φυτά, χώρους πρασίνου, δάση κ.τ.λ. με αρνητικές επιπτώσεις στο περιβάλλον και στη χλωρίδα ενός τόπου.

# Φυτοπροστασία - φυτοϋγειονομικοί έλεγχοι

- Για αυτό το λόγο λοιπόν, διενεργούνται από τις αρμόδιες Κρατικές Υπηρεσίες **φυτοϋγειονομικοί έλεγχοι** στα εισαγόμενα, παραγόμενα και διακινούμενα φυτά, φυτικά προϊόντα και λοιπά αντικείμενα (π.χ. ξυλεία) σύμφωνα με το ΠΔ 365/ΦΕΚ 307Α/10-12-2002, με το οποίο έχει ενσωματωθεί στο εθνικό δίκαιο η οδηγία 2000/29/ΕΚ του Συμβουλίου, **με στόχο** τη μείωση του κινδύνου εισαγωγής και διάδοσης επιβλαβών οργανισμών καραντίνας στην εκάστοτε χώρα και στην ΕΕ.
- Η νομοθεσία αυτή καθορίζει **το φυτοϋγειονομικό καθεστώς** των Κρατών μελών και **τις φυτοϋγειονομικές απαιτήσεις** της για φυτά, φυτικά προϊόντα ή άλλα αντικείμενα που εισάγονται από Τρίτες Χώρες.

# Φυτοπροστασία - φυτοϋγειονομικός έλεγχος

- Ειδικότερα, **ο φυτοϋγειονομικός έλεγχος** περιλαμβάνει:
- Την εγγραφή στο Φυτοϋγειονομικό Μητρώο των παραγωγών, εισαγωγέων, εξαγωγέων των φυτών, φυτικών προϊόντων και άλλων αντικειμένων του Παραρτήματος V, Μέρος Α, του σχετικού ΠΔ και για την έκδοση, όπου απαιτείται, **Φυτοϋγειονομικών Διαβατηρίων**,
- **Επισκοπήσεις** (surveys) για τη διαπίστωση της παρουσίας ή μη ορισμένων επιβλαβών οργανισμών και
- **Λήψη επίσημων μέτρων** για την εξάλειψη ή τον περιορισμό των επιβλαβών οργανισμών καραντίνας. Επίσης, ενδεικτικά αναφέρονται βασικές φυτοϋγειονομικές απαιτήσεις:

# Φυτοπροστασία-βασικές φυτοϋγειονομικές απαιτήσεις

- **Τα διακινούμενα, εντός της χώρας και την ΕΕ**, φυτά, φυτικά προϊόντα και λοιπά αντικείμενα τα οποία περιλαμβάνονται στο Παράρτημα V, Μέρος Α, του ΠΔ 365/ΦΕΚ 307Α/10-12-2002 συνοδεύονται με Φυτοϋγειονομικό Διαβατήριο.
- **Τα εισαγόμενα από τρίτες Χώρες** φυτά, φυτικά προϊόντα και λοιπά αντικείμενα τα οποία περιλαμβάνονται στο Παράρτημα V, Μέρος Β, του ΠΔ 365/ΦΕΚ 307Α/10-12-2002 συνοδεύονται με Πιστοποιητικό Φυτοϋγείας.
- Οι διακινούμενες πατάτες θα πρέπει να φέρουν επί της συσκευασίας τον αριθμό φυτοϋγειονομικού μητρώου του παραγωγού ή συσκευαστή.
- Οι διακινούμενοι καρποί εσπεριδοειδών με φύλλα και ποδίσκους πρέπει να συνοδεύονται με Φυτοϋγειονομικό Διαβατήριο.
- Όλα τα εξαγόμενα σε τρίτες Χώρες φυτά, φυτικά προϊόντα και λοιπά αντικείμενα πρέπει να συνοδεύονται με **Πιστοποιητικό Φυτοϋγείας** το οποίο να πληροί τις φυτοϋγειονομικές απαιτήσεις της χώρας εισαγωγής.
- Όλα τα ξύλινα μέσα που συνοδεύουν φορτία που εισάγονται στη χώρα ή εξάγονται σε τρίτες χώρες εκτός ΕΕ, θα πρέπει να φέρουν σήμανση σύμφωνα με το Διεθνές πρότυπο ISPM 15.

# Φυτοπαθογόνο καραντίνας

- Ο επιβλαβής οργανισμός καραντίνας είναι ο ικανός οργανισμός να προκαλέσει οικονομικής σημασίας ζημιά σε καλλιέργειες μιας περιοχής και ο οποίος είτε δεν υπάρχει στην περιοχή, είτε υπάρχει σε περιορισμένη μόνο έκταση και η παρουσία του ελέγχεται επισήμως βάσει σχετικής νομοθεσίας.


# Καραντίνα

- ❖ Term “**Quarantine**” means – **Forty (40) i.e.**, The forty days period of detention of ships arriving from other countries.
  - ❖ In early years, Quarantine was made for epidemic diseases such as **Bubonic plague, Cholera** and **Yellow fever etc.**
  - ❖ In general, The Quarantine is a ‘ **method of exclusion** ’ enforced through certain **legal measures** and **prevent the entry of new diseases (plants or animals) into a new area.**
-

# Ορισμός καραντίνας

- ❖ Plant quarantine may be defined as “ **Rules and regulations promulgated by government to regulate the introduction of plants, planting materials, plant products, soil, living organism etc. with a view to prevent exotic pests, weeds and pathogens harmful to the agriculture or the environments of any country or region.**
- ❖ Plant quarantine is thus designed as **a safeguard against harmful pests/pathogens** exotic to a country or a region.

# Στόχοι καραντίνας

- 1. Inspection of imported agricultural commodities** for preventing the introduction of exotic pests and diseases hostile to Indian fauna and flora through implementation of DIP Act, 1914 and the Plant Quarantine (Regulation of Import into India) Order, 2003.
  - 2. Inspection of plants and plant material meant for export** as per the requirements under International Plant Protection Convention (IPPC) 1951,.
  - 3. Detection of exotic pests and diseases for their containment by adopting domestic quarantine regulations, if introduced**
- 

# Τύποι καραντίνας

❖ Two types of plant quarantine in India-

## 1. Domestic or Local Quarantine:-

- It is enacted to prevent the spread of certain pathogen within the political boundary of a country or from state to state in a same country.
- Regulated by **Agriculture Pests and Diseases Acts.**

## 2. National Quarantine:-

- It is enacted to prevent the migration of undesirable pathogens from other countries or outside the countries.
- Regulated by **Destructive Insects and Pests (DIP) Acts, 1914.**

# Ανθεκτικές ποικιλίες – Γιατί ??

- **Οικονομικότερο και καλύτερο αποδεκτό τρόπο για την καταπολέμηση των ασθενειών των φυτών**
  - Επιτυγχάνεται σταθερή προστασία - ποιότητα στις καλλιέργειες
  - Μείωση κόστους παραγωγής λόγω μειωμένης χρήσης φυτοφαρμάκων
  - Δεν προκαλούν παρενέργειες στο οικοσύστημα
  - Ιδιαίτερα απαραίτητη στην περίπτωση παθογόνων που αδυνατούμε να αντιμετωπίσουμε (ιώσεις, αδρομυκώσεις, σήψεις του λαιμού και των ριζών, περονόσποροι, ωίδια)
  - Ουσιαστικά χρησιμοποιούμε φυτά που μπορούν να **μειώσουν** το ρυθμό παραγωγής μολύσματος, το ρυθμό της μόλυνσης και το ρυθμό ανάπτυξης του παθογόνου

# Καλλιεργητικά μέτρα

- **Αμειψισπορά:** Αποτελεί ένα αξιόλογο καλλιεργητικό μέτρο μείωσης του μολυσματικού δυναμικού ενός παθογόνου σε ένα έδαφος, με την προϋπόθεση ότι το παθογόνο δεν επιβιώνει σαπροφυτικά στο έδαφος επί μακρύ χρονικό διάστημα και δε σχηματίζει υπνοσπόρια ή σκληρώτια.

Σοβαρό πρόβλημα δημιουργείται, κατά την εφαρμογή της αμειψισποράς ως μεθόδου καταπολέμησης, αν το παθογόνο είναι πολυφάγο, όπως π.χ. είναι οι μύκητες *Sclerotium rolfsii*, *Rhizoctonia solani* και *Verticillium dahliae* και το βακτήριο *Ralstonia solanacearum*

# Μέτρα που εμποδίζουν την είσοδο & την επιβίωση του παθογόνου

- **Καταστροφή των υπολειμμάτων της καλλιέργειας.**

Αποτελεί πολύ αξιόλογο μέτρο μείωσης των πηγών μόλυσματος. Ο πλέον ενδεδειγμένος τρόπος καταστροφής των υπολειμμάτων είναι με τη φωτιά. Τα υπολείμματα δεν πρέπει να δίνονται σαν τροφή στα ζώα ούτε να ενσωματώνονται στον κοπροσωρό, γιατί διαφορετικά είναι δυνατή η εκ νέου επάνοδος του παθογόνου στο χωράφι.



# Μέτρα που εμποδίζουν την είσοδο του παθογόνου

## Τήρηση στοιχειωδών μέτρων υγιεινής

- Μην υποτιμάτε τα συνήθη μέτρα υγιεινής και προφύλαξης.
- **Σκοπός:** μείωση του ποσού του αρχικού μολύσματος που εισάγεται στον αγρό από εξωτερικές πηγές



# Ο καλύτερος τρόπος για την πρόληψη της ασθένειας είναι να κρατήσετε μακριά τα παθογόνα

Agricultural inspectors check imported plants for pest and pathogens, but many pathogens are spread by wind and water....



*Phytophthora ramorum* causes sudden oak death

County Fire Department.

# Μέτρα που εμποδίζουν την είσοδο & διασπορά του παθογόνου - Απολύμανση εργαλείων

Απολυμαίνετε όσο το δυνατόν συχνότερα τις μικρές συσκευές και τα εργαλεία κλαδέματος. Η χρησιμοποίηση περισσότερων του ενός εργαλείων σας διευκολύνει να τηρείτε τον απαιτούμενο χρόνο εμφάνισης για την απολύμανση. Χρησιμοποιείτε διάλυμα αιθανόλης 70% ή άλλων προϊόντων (χλωρίνη 10%)



# 1ο ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑ

Χρησιμοποιώντας ένα μολυσμένο εργαλείο

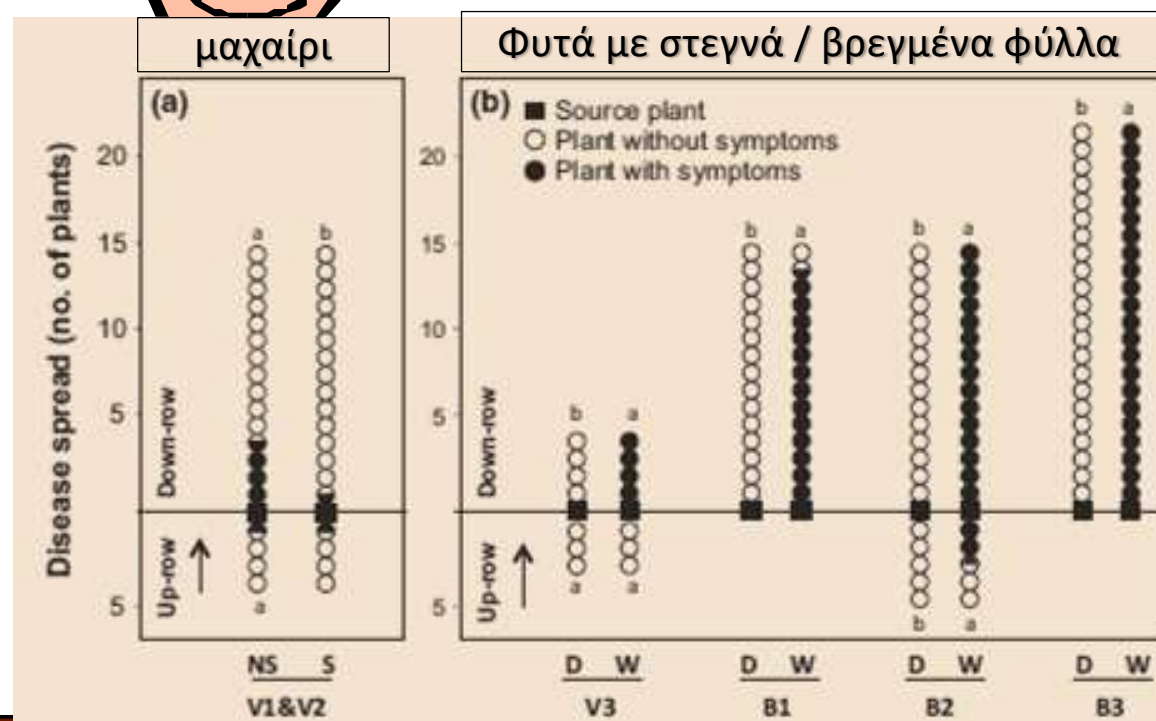
Βακτήρια	ΜΟΛΥΝΣΗ
$10^6$	100%
$10^4$	50%
$10^2$	0%

## 2ο ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑ



### Δευτερογενής διασπορά

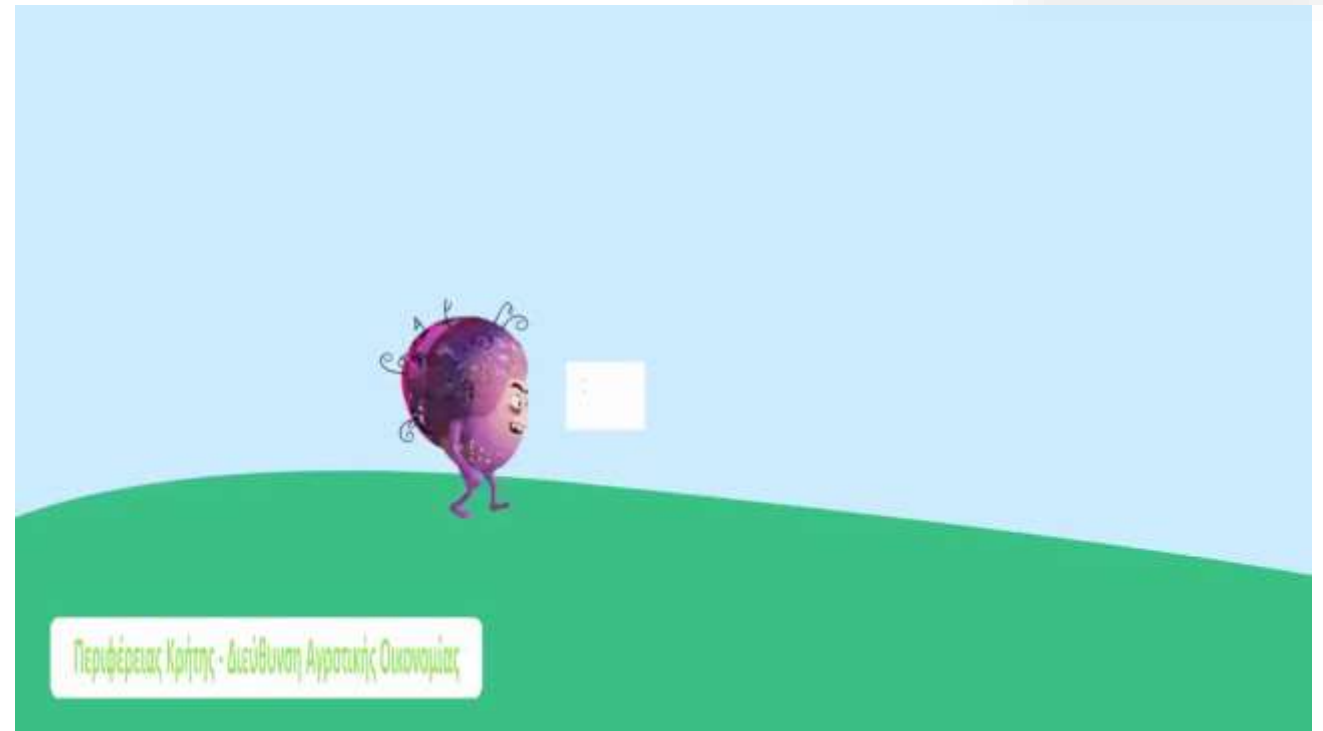
1. Χρήση μολυσμένου εργαλείου
2. Εργασία σε βρεγμένα φυτά



# Μέτρα που εμποδίζουν την είσοδο & τη διασπορά του παθογόνου

- **Καταστροφή των φυτών εθελοντών. – ζιζανίων ξενιστών.** Σε πολλές ασθένειες τα μολύσματα των αρχικών μολύνσεων προέρχονται από φυτά “εθελοντές” (Δεξαμενές φυτοπαθογόνων)
- **Χρησιμοποίηση υγιούς σπόρου.** (Φυτοϋγειονομικός έλεγχος Ε.Ε. - Φυτουγειονομικό Διαβατήριο, Πιστοποιητικό Φυτοϋγείας Τρίτες Χώρες **καραντίνα**)
- **Χρησιμοποίηση υγιών σπορόφυτων/εμβολιασμένων**
- **Επισήμανση και καταστροφή των ασθενών και ύποπτων φυτών !!!!!**
- **Μείωσης της υγρασίας στην καλλιέργεια**
- **Επίδραση της λίπανσης (Κ/Ν) αλατότητα εδάφους, pH .....**

# ΕΝΗΜΕΡΩΣΗ



# Φυτοπαθγόνα βακτήρια καραντίνας

EPPO A1 List of pests recommended for regulation as quarantine pests

- version 2022-09 –[https://www.eppo.int/ACTIVITIES/plant\\_quarantine/A1\\_list](https://www.eppo.int/ACTIVITIES/plant_quarantine/A1_list)

**Bacteria and phytoplasmas** (links to the EPPO Global Database)

[Acidovorax citrulli](#)

['Candidatus Liberibacter solanacearum'](#) (Solanaceae haplotypes) and its vector [Bactericera cockerelli](#)

['Candidatus Phytoplasma americanum'](#) (Potato purple-top wilt)

['Candidatus Phytoplasma phoenicium](#) (Almond witches' broom)

['Candidatus Phytoplasma pruni'](#) (Western X disease)

['Candidatus Phytoplasma ulmi'](#) (Elm phloem necrosis – transmitted by [Scaphoideus luteolus](#))

Citrus huanglongbing (citrus greening) and its vectors [Diaphorina citri](#) (A1) and [Trioza erytreae](#) (now A2)

['Ca. Liberibacter africanus'](#)

['Ca. Liberibacter americanus'](#)

['Ca. Liberibacter asiaticus'](#)

[Coconut lethal yellowing phytoplasma](#) (and its putative vector [Haplaxius crudus](#))

[Peach rosette phytoplasma](#)

[Peach yellows phytoplasma](#)

[Ralstonia syzygii](#)

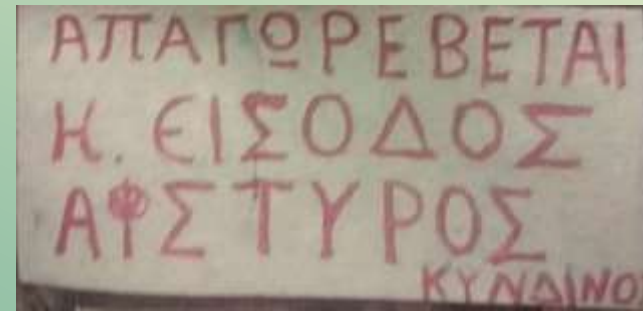
[Xanthomonas citri](#) subsp. [citri](#) and [Xanthomonas citri](#) subsp. [aurantifolii](#)

[Xanthomonas euvesicatoria](#) pv. [allii](#)

[Xanthomonas oryzae](#) pv. [oryzae](#)

[Xanthomonas oryzae](#) pv. [oryzicola](#)

# Η ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ?



41

## Η ανάπτυξη μιας ασθένειας προκύπτει:

- ▶ **Εισαγωγές (56 %)** → **ΦΥΤΟΪΓΕΙΟΝΟΜΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ - ΕΠΙΣΚΟΠΗΣΕΙΣ ΟΡΓΑΝΩΣΗ ΣΕ ΟΛΗ ΤΗΝ ΕΛΛΑΔΑ**
- ▶ **Καιρικές συνθήκες & Κλιματική αλλαγή (25 %)**
- ▶ **Καλλιεργητικές πρακτικές (9%)** → (μείωση στρες, εγκατάλειψη ... χημικά )
- ▶ **Αλλαγές στον πληθυσμό του φορέα (7 %)** → (διερεύνηση αυτοχθόνων φορέων...)
- ▶ **Γενετική εξέλιξη (2%)**
- ▶ **Διαταραχές των οικοθέσεων (1%)**



# Update on the situation of *Acidovorax citrulli* in Greece with findings on tomato

- *Acidovorax citrulli* (EPPO A1 List) is the causal agent of bacterial fruit blotch disease of cucurbits. In Greece, it was first detected causing fruit blotch in watermelon (*Citrullus lanatus*) in 2005 and further outbreaks were then detected in 2006 and 2008 (EPPO RS 2009/216). In a recent scientific article, Malliarakis *et al.* (2020) report the detection of *A. citrulli* in symptomatic tomato seedlings (*Solanum lycopersicum*) in two transplant houses in June 2019 and April 2020. Tomato leaves presented necrotic black spots, often with chlorotic haloes. Economic losses were considered to be serious as 20-30% of seedlings were diseased. *A. citrulli* had previously been detected on tomato and eggplant (*S. melongena*) in Israel (Chalupowicz *et al.*, 2020). The NPPO of Greece recently informed the EPPO Secretariat that in watermelon cultivation, only sporadic infections have been reported. It also added that the finding on tomato occurred in the regional unit of Imathia (region of Central Macedonia), and that all tomato seedlings were destroyed. Tracing back studies are being conducted to identify the origin of this outbreak. The NPPO of Greece considers that *A. citrulli* is transient.
- The pest status of *Acidovorax citrulli* in Greece is officially declared as: **Transient, few occurrences.**  
Sources
- NPPO of Greece (2021-01).
- Malliarakis D, Mpalantinaki E, Pagoulatou MG, Lorenzou K, Goumas DE (2020) First report of *Acidovorax citrulli* causing a leaf spot disease on tomato plants in Greece. *Journal of Plant Pathology*. <https://doi.org/10.1007/s42161-020-00677-1>

# Φυτοπαθογόνα βακτήρια καραντίνας

EPPO A2 List of pests recommended for regulation as quarantine pests

- version 2022-09 – [https://www.eppo.int/ACTIVITIES/plant\\_quarantine/A2\\_list](https://www.eppo.int/ACTIVITIES/plant_quarantine/A2_list)



## Bacteria and phytoplasmas

['Ca. Phytoplasma mali'](#) (Apple proliferation)

['Ca. Phytoplasma pyri'](#) (Pear decline)

['Ca. Phytoplasma solani'](#) (Stolbur)

[Clavibacter michiganensis subsp. insidiosus](#)

[Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis](#)

[Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus](#)

[Curtobacterium flaccumfaciens pv. flaccumfaciens](#)

[Dickeya dianthicola](#)

[Erwinia amylovora](#)

[Grapevine flavescence dorée phytoplasma](#)

[Pantoea stewartii](#)

[Paraburkholderia caryophylli](#)

[Pseudomonas syringae pv. actinidiae](#)

[Pseudomonas syringae pv. persicae](#)

[Ralstonia solanacearum](#)

[Ralstonia pseudosolanacearum](#)

[Xanthomonas arboricola pv. corylina](#)

[Xanthomonas arboricola pv. pruni](#)

[Xanthomonas axonopodis pv. poinsettiicola](#)

[Xanthomonas citri pv. fuscans](#)

[Xanthomonas cynarae pv. gardneri](#)

[Xanthomonas euvesicatoria pv. euvesicatoria](#)

[Xanthomonas euvesicatoria pv. perforans](#)

[Xanthomonas fragariae](#)

[Xanthomonas phaseoli pv. dieffenbachiae](#)

[Xanthomonas phaseoli pv. phaseoli](#)

[Xanthomonas translucens pv. translucens](#)

[Xanthomonas vesicatoria](#)

[Xylella fastidiosa](#)

[Xylophilus ampelinus](#)

## ΜΕΤΡΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΠΙΤΗΡΗΣΗ ΤΟΥ ΦΥΤΙΚΟΥ ΚΕΦΑΛΑΙΟΥ

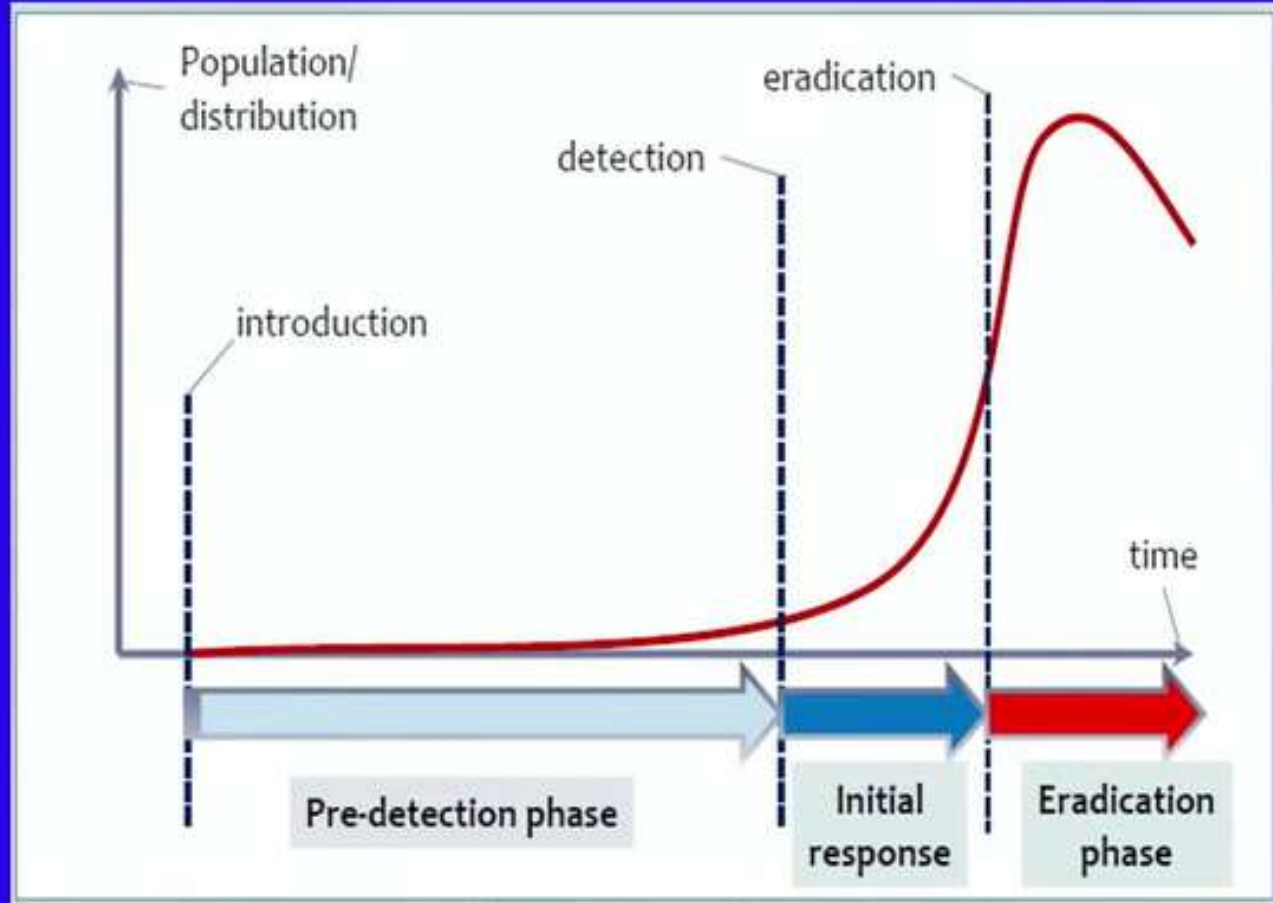
- Διακίνηση υγιούς πολλαπλασιαστικού υλικού (φυτά προς φύτευση) .
- Διενέργεια αυτοελέγχων από τους επαγγελματίες .
- Τήρηση συστήματος ιχνηλασιμότητας από τους επαγγελματίες .
- Δήλωση ενδοκοινοτικής απόκτησης φυτών, φυτικών προϊόντων και άλλων αντικειμένων στις αρμόδιες αρχές φυτοϋγειονομικού ελέγχου της Χώρας.
- Συνεργασία επαγγελματιών με τις αρμόδιες αρχές φυτοϋγειονομικού ελέγχου της Χώρας.
- Διενέργεια φυτοϋγειονομικών ελέγχων στην εσωτερική αγορά .
- Υλοποίηση προγράμματος επισκοπήσεων από τις αρμόδιες αρχές φυτοϋγειονομικού ελέγχου της Χώρας .

## ΣΗΜΕΙΟ ΚΛΕΙΔΙ Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΩΝ

- Σωστή πληροφόρηση για τους επιβλαβείς οργανισμούς ανάλογα με τα φυτικά είδη που παράγουν.
- Προσεκτική επιλογή και αξιολόγηση των προμηθευτών της επιχείρησης (καλλιεργητικά υποστρώματα, αρχικό φυτωριακό υλικό, γλάστρες, λιπάσματα, κ.λ.π)
- Καθημερινή εφαρμογή και καταγραφή συνθηκών υγιεινής.
- Τήρηση συστήματος ιχνηλασιμότητας.
- Συχνός καθαρισμός και απολύμανση των χώρων παραγωγής.
- Εκπαίδευση του προσωπικού.
- Καθημερινή παρακολούθηση των φυτών για εχθρούς και ασθένειες (π.χ. παγίδες)
- Ενημέρωση των αρχών φυτοϋγειονομικού ελέγχου σε περίπτωση διαπίστωσης προβλημάτων φυτοϋγείας.

## Τρία στάδια στην διαχείριση Επιβλαβών Οργανισμών

- Πριν την διαπίστωση.
- Αρχική αντίδραση.
- Στάδιο εξάλειψης



# ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΕΠΙΣΚΟΠΗΣΕΩΝ

1. Στη Χώρα μας υλοποιείται πρόγραμμα επισκοπήσεων το οποίο είναι υποχρέωση μας, η οποία προκύπτει από :

- Συμφωνίες με Τρίτες Χώρες, IPPC .
- Τον Καν. (ΕΕ) 2016/2031 και συγκεκριμένα από τα άρθρα 19, 22, 23, 24 & 34
- Ειδικές εκτελεστικές αποφάσεις και κανονισμούς της Ε.Ε.
- Το άρθρο 2 του Καν.(ΕΕ) 2017/625 .

2. Το πρόγραμμα επισκοπήσεων είναι συγχρηματοδοτούμενο [Καν.(ΕΕ) 2021/690] σε ποσοστό 75% από την Ε.Ε.

3. Το πρόγραμμα σχεδιάζεται και υλοποιείται με τη συνεργασία του Υπ.Α.Α.Τ./ Δνση Προστασίας Φυτικής Παραγωγής (Κεντρική Αρμόδια Αρχή) και του Μπενάκειου Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου (Εθνικό Εργαστήριο Αναφοράς).

# Σύμφωνα με την υφιστάμενη νομοθεσία :

Το αρμόδιο υπουργείο κάθε κράτους καταρτίζει **σχέδιο έκτακτης ανάγκης** με τις ενέργειες που απαιτούνται στην περίπτωση **επιβεβαίωσης της παρουσίας** ή **υπόνοιας παρουσίας** του φυτοπαθογόνου οργανισμού.

Στο σχέδιο δράσης περιλαμβάνονται:

- **Ρόλοι** και **αρμοδιότητες** της Αρμόδιας Αρχής
- **Κανόνες** για την ανταλλαγή πληροφοριών
- **Επίσημα εργαστήρια** για εργαστηριακές αναλύσεις/ανίχνευση της *X.f*
- **Πρωτόκολλα** που περιγράφουν μακροσκοπική εξέταση, δειγματοληψία και εργ. δοκιμές
- **Κανόνες για την κατάρτιση του προσωπικού** των φυτοϋγειονομικών ελέγχων
- **Οικονομικοί πόροι** που πρέπει να προβλεφθούν και να διατεθούν

Για την Ελλάδα το «**Σχέδιο δράσης για τον επιβλαβή οργανισμό καραντίνας *Xylella fastidiosa***» καταρτίστηκε το **2019**.





# Οριοθέτηση ζώνης: Μόλυνσης, Περιορισμού (ανάσχεσης) & Ουδέτερης

- Εντατική επισκόπηση

Ζώνη Μολυσμένη

- Καταστροφή φυτών ξενιστών
- Εντατική επισκόπηση
- Αντιμετώπιση εντόμων φορέων & ζιζανίων
- Απαγόρευση φύτευσης φυτών ξενιστών

- Περιορισμοί διακίνησης φυτωριακού υλικού
- Εντατική επισκόπηση
- Αντιμετώπιση εντόμων φορέων & ζιζανίων

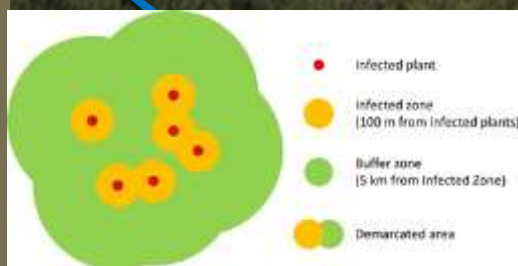
Ζώνη Περιορισμού

ουδέτερη ζώνη

100 m

5 Km

10 Km



# Μελέτη μιας περίπτωσης - Δακτυλιωτή σήψη πατάτας



- Foliar symptoms of bacterial ring rot:
- (a) leaflet margin necrosis
- (b) interveinal chlorosis
- (c) early dwarfing,
- (d) upright stem flagging
- (e) whole stem green wilt in

# Μελέτη μιας περίπτωσης - Δακτυλιωτή σήψη πατάτας



- Bacterial ring rot symptoms in tubers
- external tuber cracking & bacterial ooze (red circle area)
- Visual evidence of dry rot that is not associated with bacterial ring

*Το βακτήριο*  
*Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*  
στην Κρήτη

1997 -2023 → 26 χρόνια

# Το πρόβλημα

Η διαπίστωση της παρουσία του βακτηρίου *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* που εντοπίστηκε στο Οροπέδιο Λασιθίου **το 1997** (Εργαστήριο Βακτηριολογίας Ινστιτούτο Προστασίας Φυτών Ηρακλείου)



# Υφιστάμενη κατάσταση - Γεωργικό Προφίλ Οροπεδίου Λασιθίου

- Γεωργική γη στο Οροπέδιο Λασιθίου ανέρχεται σε 2.400 ha
- Κατανέμεται σε 7.000 περίπου αγροτεμάχια
- Υπάρχουν 1.100 αγροτικές εκμεταλλεύσεις που χαρακτηρίζονται από μικρή έκταση και πολύ-τεμαχισμό (M.O = 7 αγροτεμ / εκμετάλ)
- Η καλλιέργεια πατάτας αποτελεί σχεδόν μονοκαλλιέργεια
  - Το 1997 (εμφάνιση Cms) καλλιέργεια πατάτας 1000 – 1200 ha/έτος
  - Σήμερα < 800 ha/έτος
  - Σε αγρανάπαυση ή αμειψισπορά με σιτηρά 800 – 1000 ha/έτος

**Η οικονομία της περιοχής βασίζεται αποκλειστικά στην καλλιέργεια της πατάτας.**

# Ιστορικό - στοιχεία για το Cms στην Κρήτη

**Εφαρμογή μέτρων (Οδηγία 93/85/ΕΕC)  
Από το 2005 και μετά εφαρμόζονται χωρίς παρεκκλίσεις**

- Για την αντιμετώπιση του Cms εκδόθηκε το 1998 σχετική Υ.Α. η οποία τροποποιήθηκε με την υπ' αριθ. 94837/ΦΕΚ 654/Τ.β' /2000 η οποία ισχύει έως και σήμερα

**Εφαρμογή μέτρων (Οδηγία 93/85/ΕΕC)  
Από το 2005 και μετά εφαρμόζονται χωρίς παρεκκλίσεις**

- Η πατάτα φαγητού της Κρήτης δεν διακινείται εκτός Κρήτης
- Συνεχίζεται η από το 1997 απαγόρευση σποροπαραγωγής το Κέντρο Σποροπαραγωγής Οροπεδίου Λασιθίου
- Εφαρμόζεται 2ετης ή και 3ετης αμειψισπορά

- Το διάστημα 2007 -2015 διακινήθηκαν στην Κρήτη 11.327,27 ton ελεγμένου πατατόσπορου που ελέγχθηκε στο σύνολό του.
- Κατά τους διενεργηθέντες σχετικούς ελέγχους πριν το 2007, όσον αφορά στον ενδοκοινοτικά διακινούμενο πατατόσπορο, ελέγχθηκαν εργαστηριακά και απερρίφθησαν ως θετικά προς το Cms, τα παρακάτω φορτία πατατοσπόρου.

ΕΤΟΣ	ΚΑΤΗΓΟΡΙΑ ΠΑΤΑΤΟΣΠΟΡΟΥ	ΠΟΣΟΤΗΤΑ (Kg)	ΧΩΡΑ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΣΠΟΡΟΜΕΡΙΔΑΣ
1998	ΠΙΣΤΟΠΟΙΗΜΕΝΟΣ	5500	ΓΑΛΛΙΑ	108-01-0003
1999	ΠΙΣΤΟΠΟΙΗΜΕΝΟΣ	15000	ΙΤΑΛΙΑ	N.60/97-003
2002	ΒΑΣΙΚΟΣ	1925	ΒΕΛΓΙΟ	01/27184/10
	ΠΙΣΤΟΠΟΙΗΜΕΝΟΣ	7200		01/53890/08

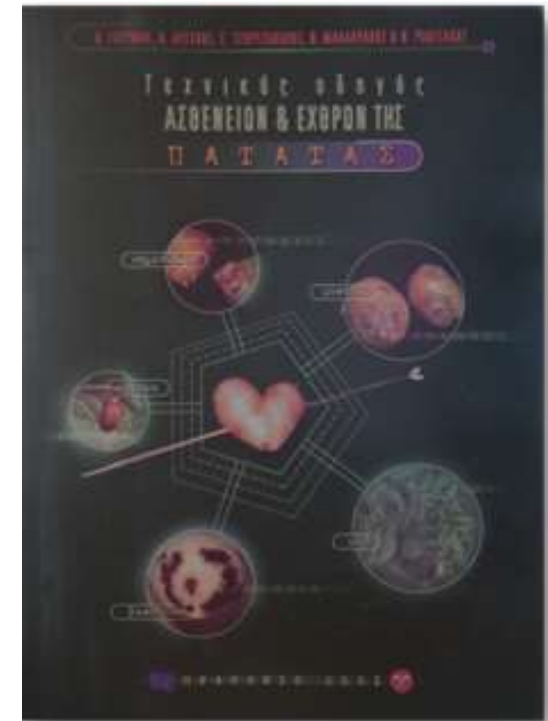
## **Εφαρμογή μέτρων (Οδηγία 93/85/ΕΕC)**

**Από το 2005 και μετά εφαρμόζονται χωρίς παρεκκλίσεις**

- **Η απολύμανση εγκαταστάσεων και μηχανημάτων τηρείται. Προς τον σκοπό αυτό έχουν γίνει σχετικές εκπαιδεύσεις – ενημερώσεις**
- **Συστηματικός έλεγχος των φυτών εθελοντών με πρόγραμμα ζιζανιοκτονίας**
- **Αποφεύγεται το κόψιμο, του προς φύτευση πατατόσπορου**

## Εφαρμογή μέτρων (Οδηγία 93/85/ΕΕC) Από το 2005 και μετά εφαρμόζονται χωρίς παρεκκλίσεις

- Η **σήμανση** πραγματοποιείται με τη χρήση των **στιγμάτων GPS** που είναι καθολική
- Υπάρχει **συνεργασία** των αρμόδιων υπηρεσιών ελέγχου με τους **παραγωγούς** και τον **Συνεταιρισμό** του Οροπεδίου Λασιθίου.



## Εφαρμογή μέτρων (Οδηγία 93/85/ΕΕC)

Από το 2005 και μετά εφαρμόζονται χωρίς παρεκκλίσεις

- Χρησιμοποιείται πιστοποιημένος και ιδιοπαραγόμενος πατατόσπορος ο οποίος κατά βάση ελέγχεται.
- Αναγκαίος πατατόσπορος ανά έτος είναι περίπου 1.000 τόνοι (8.000 στρεμ. X 130 kg/στρεμ.) και εκτιμούμε με βάση και τη σχετική ενημέρωση από τους βασικούς διακινητές στην περιοχή ότι διατίθενται περί τους 600 τόνους πιστοποιημένου πατατόσπορου

# ΕΠΙΣΚΟΠΗΣΕΙΣ

- **Χρονική περίοδος 1997 -2015**
  - **Οροπέδιο Λασιθίου**
  - **Μάλια**
  - **Μεσσαρά**

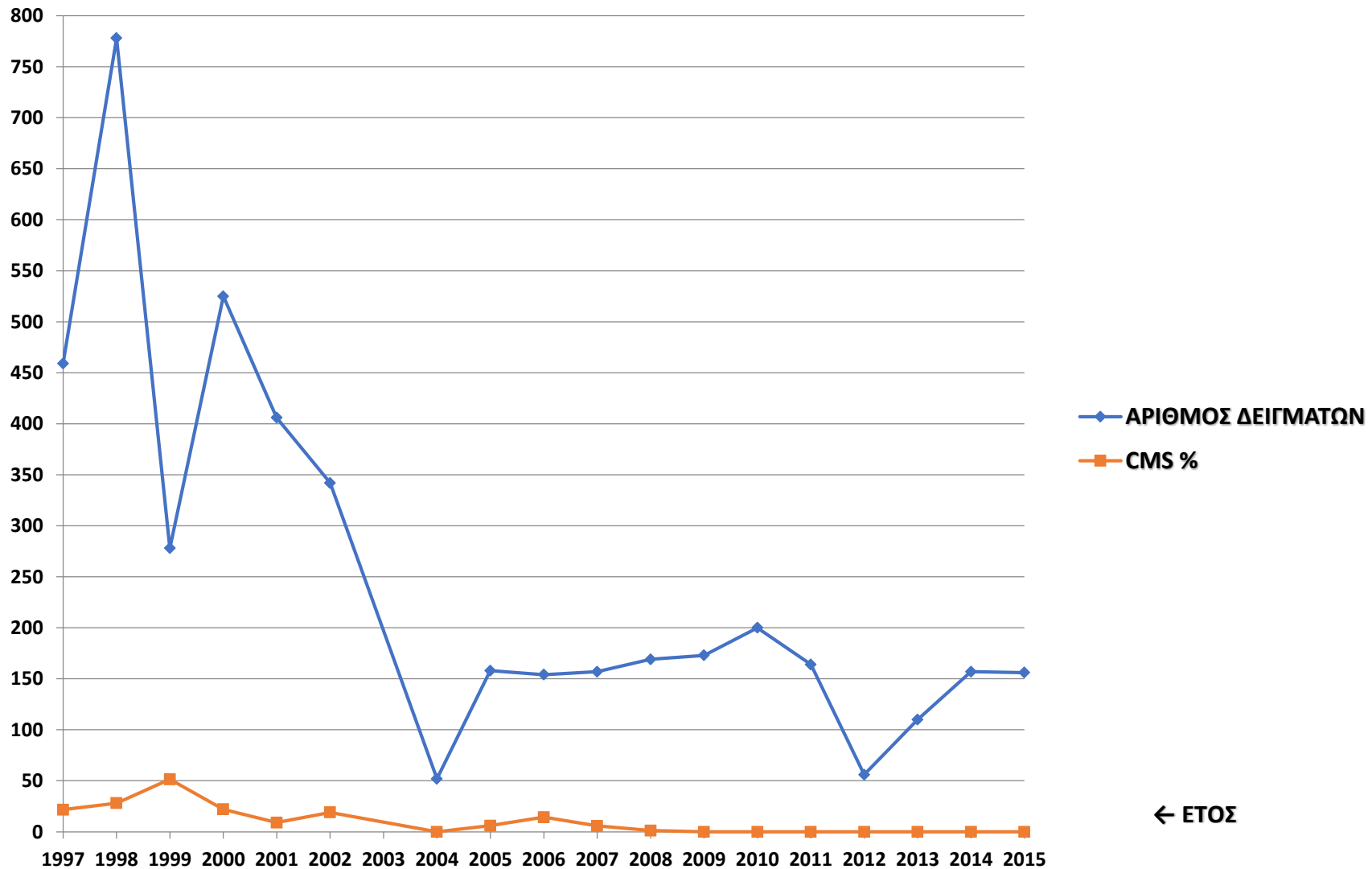
# Δειγματοληψίες - Αποτελέσματα (1997 -2015)

(*Clavibacter michiganensis* spp. *sepedonicus*)

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΩΝ ΕΛΕΓΧΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΠΑΤΑΤΑΣ			
ΕΤΟΣ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	ΘΕΤΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ Cms	ΠΟΣΟΣΤΟ ΘΕΤΙΚΩΝ %
1997	459	99	21,7%
1998	778	219	28,15%
1999	278	143	51,4%
2000	525	116	22,09%
2001	406	36	9%
2002	342	63	19%
2003	-	-	-
2004	52	0	0%
2005	158	10	6%
2006	154	22	14,29%
2007	157	9	5,73%
2008	169	2	1,18%
2009	173	0	0%
2010	200	0	0%
2011	164	0	0%
2012	56	0	0%
2013	110	0	0%
2014	157	0	0%
2015	158	0	0%

# ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΩΝ ΕΛΕΓΧΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΠΑΤΑΤΑΣ ΑΠΟ ΤΟ ΟΡΟΠΕΔΙΟ ΛΑΣΙΘΙΟΥ ΣΕ ΣΧΕΣΗ ΜΕ ΤΗΝ ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΤΟΥ CMS

Ο  
Ρ  
Ο  
Π  
Ε  
Δ  
Ι  
Ο  
  
Λ  
Α  
Σ  
Ι  
Θ  
Ι  
Ο  
Υ



# ΥΨΗΛΗ ΠΥΚΝΟΤΗΤΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑΣ

ΕΤΟΣ	ΠΥΚΝΟΤΗΤΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑΣ ha / ΔΕΙΓΜΑ	ΕΤΟΣ	ΠΥΚΝΟΤΗΤΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑΣ ha / ΔΕΙΓΜΑ
1997	2,17	2007	6,36
1998	1,30	2008	5,91
1999	3,59	2009	4,62
2000	1,90	2010	4,00
2001	2,46	2011	4,88
2002	2,92	2012	14,29
2003	-	2013	7,27
2004	19,2	2014	5,1
2005	6,32	2015	5,13
2006	6,49		

# Συνολική αποτύπωση του πλήθους των δειγματοληψιών με στίγμα GPS (2009 – 2015)

Δειγμάτα πατάτας για έλεγχο clavibacter έτων 2009-2015 στην περιοχή του Οροπεδίου Λασιθίου

Επιστολή: Περιφέρεια Ενότια Λασιθίου - ΔΑΟΚ Αγ. Νικολάου  
Υπόμνημα

- ◆ Θέση δειγμ. 2015
- ◆ Θέση δειγμ. 2014
- ◆ Κεντροειδές δειγμ. 2013
- ◆ Κεντροειδές δειγμ. 2012
- ▲ Κεντροειδές δειγμ. 2011
- ▶ Θέση δειγμ. 2010 ΕΓΣΑ
- ▶ Θέση δειγμ. 2010
- ◆ Θέση δειγμ. 2009

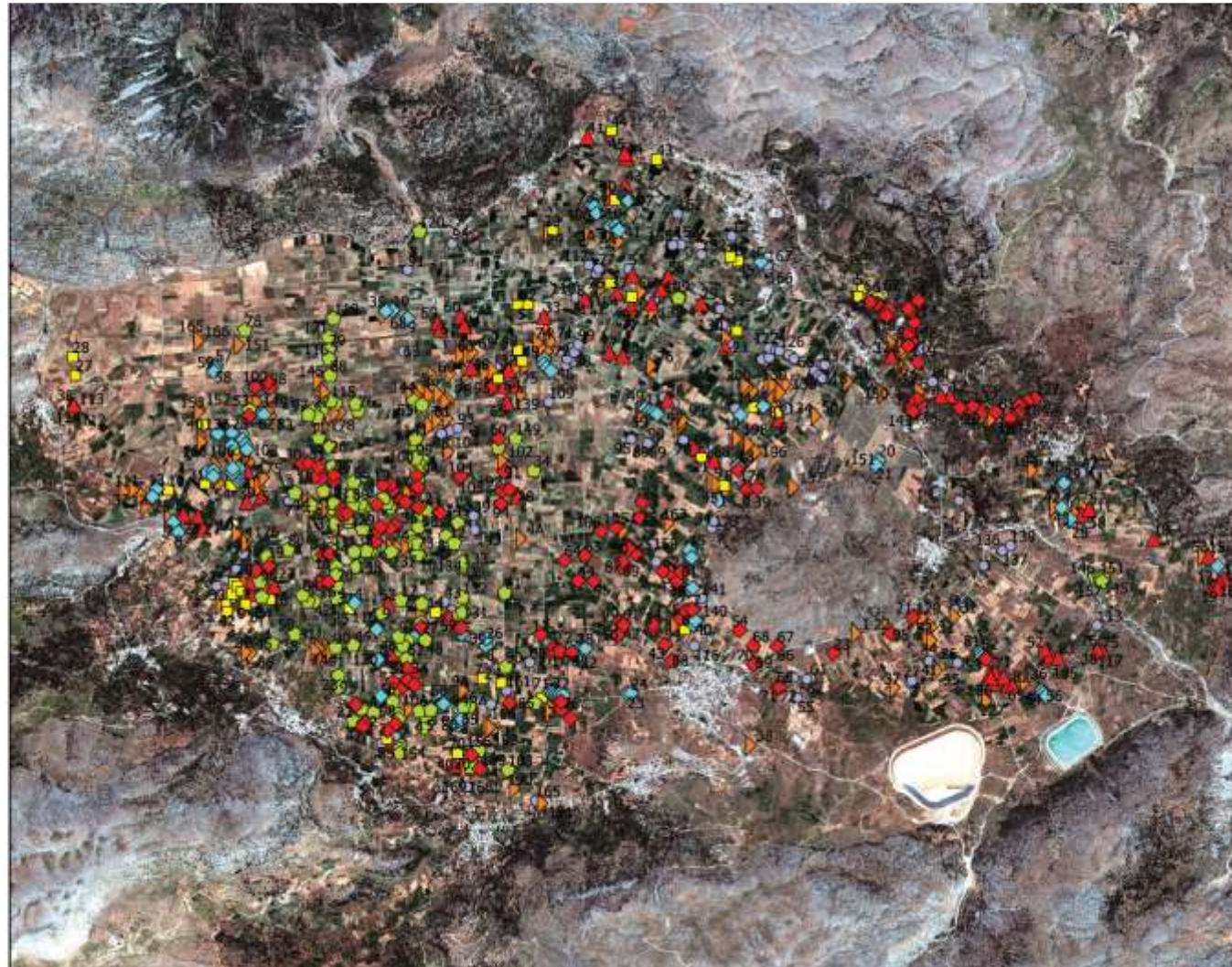
Δορυφ. εικόν. Οροπεδίου

ημερ.: 12/11/2015

κλίμακα 1:38.205  
KBS: GGRS87 / Greek Grid

Χαρτογραφική απτύπωση:

Αγροτικός Συν/μος Οροπεδίου  
Λασιθίου  
τηλ.: 28440-22124  
e-mail: info@oropediocoop.gr  
web: www.oropediocoop.gr



# ΜΑΚΡΟΣΚΟΠΙΚΟΙ ΕΛΕΓΧΟΙ

## Οροπέδιο Λασιθίου

### Σε φυτά πατάτας

- Από το 1997 – 2015 ποτέ δεν παρατηρήθηκαν συμπτώματα του Cms κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας σε φυτά πατάτας
- Ουδέποτε συσχετίστηκαν συμπτώματα που ομοιάζαν με εκείνα του Cms με την παρουσία του βακτηρίου

### Σε κονδύλους πατάτας

- Συμπτώματα σε κονδύλους παρατηρήθηκαν μόνο κατά τα πρώτα έτη της ασθένειας σε (έως το 2000)
- Ουδέποτε παρατηρήθηκαν στο εργαστήριο τα τυπικά της ασθένειας συμπτώματα κατά τον δειγματοληπτικό τεμαχισμό τους

# Υπόλοιπη Κρήτη – Μεσσαρά & Μάλια

## Εκτάσεις καλλιέργειας

- Το έτος 2000 η έκταση στα Μάλια ήταν της τάξεως των 200 ha και στη Μεσσαρά των 400 ha, ενώ το 2015 στα Μάλια εκτιμάται στα περίπου 40 ha στη Μεσσαρά στα 150 ha
- Σε Μεσσαρά και Μάλια η καλλιέργεια της πατάτας, δεν αποτελεί μονοκαλλιέργεια και οι παραγωγοί διαθέτουν αρκετές λύσεις για εναλλαγή καλλιεργειών

## Εφαρμογή μέτρων

- Στις παραπάνω περιοχές ήταν εφικτό και εφαρμόσθηκαν όλα τα προβλεπόμενα από την σχετική Υ.Α μέτρα και ιδίως αυτό της χρήσης πιστοποιημένου πατατόσπορου

## Συμπερασματικά

- Από το 2006 για τα Μάλια και το 2007 για την Μεσσαρά, δεν έχουν βρεθεί εργαστηριακά θετικά δείγματα στο Cms

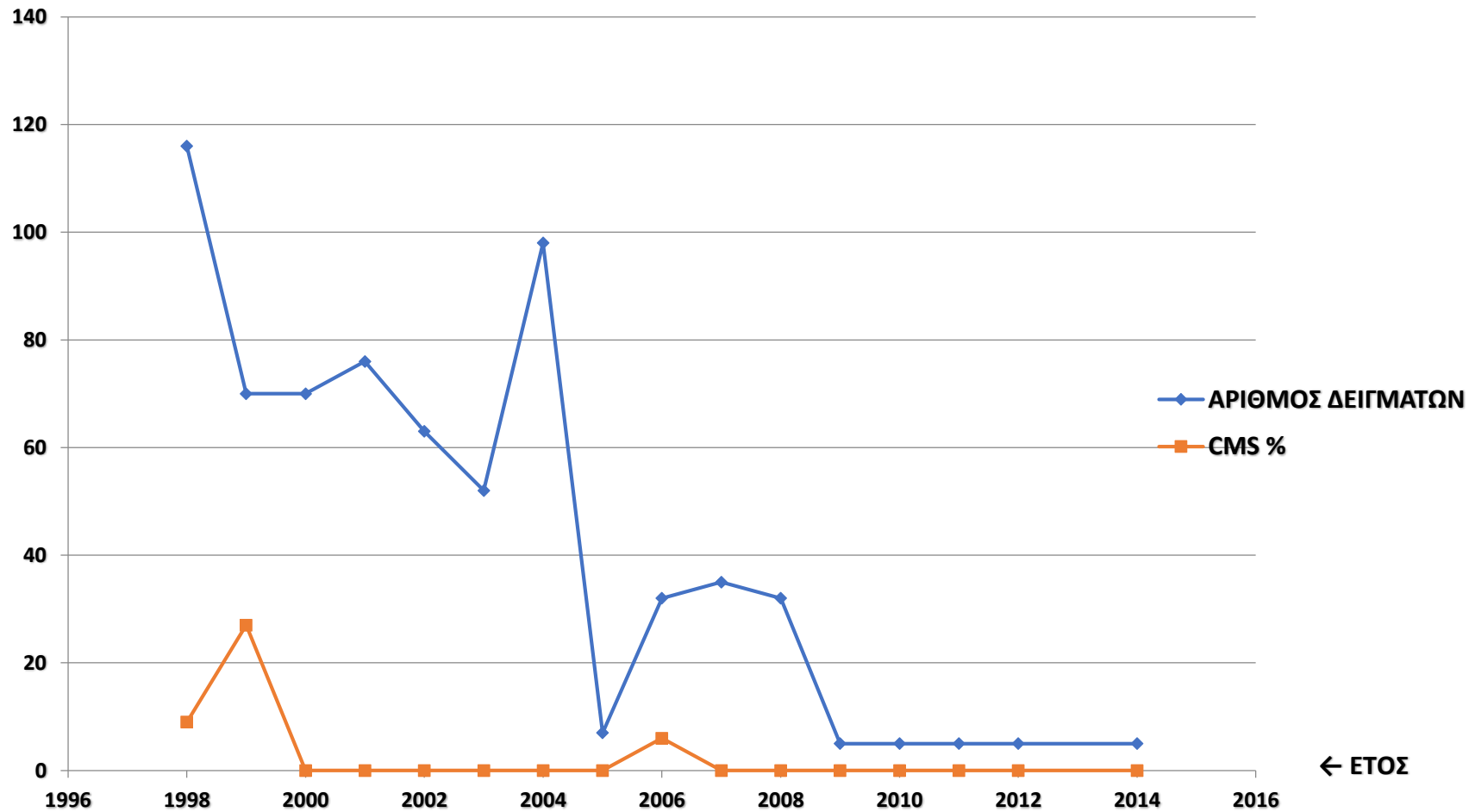
**ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΩΝ ΕΛΕΓΧΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΠΑΤΑΤΑΣ  
ΓΙΑ ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΤΟΥ CMS ΓΙΑ ΤΑ ΕΤΗ 1998-2015**

ΕΤΟΣ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	ΘΕΤΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ Cms	ΠΟΣΟΣΤΟ ΘΕΤΙΚΩΝ %
1998	116	11	9
1999	70	19	27
2000	70	0	0
2001	76	0	0
2002	63	0	0
2003	52	0	0
2004	98	0	0
2005	7	0	0
2006	32	2	6
2007	35	0	0
2008	32	0	0
2009	5	0	0
2010	5	0	0
2011	5	0	0
2012	5	0	0
2014	5	0	0

**Μ  
Α  
Λ  
Ι  
Α**

# ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΩΝ ΕΛΕΓΧΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΠΑΤΑΤΑΣ ΣΕ ΣΧΕΣΗ ΜΕ ΤΗΝ ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΤΟΥ CMS

Μ  
Α  
Λ  
Ι  
Α



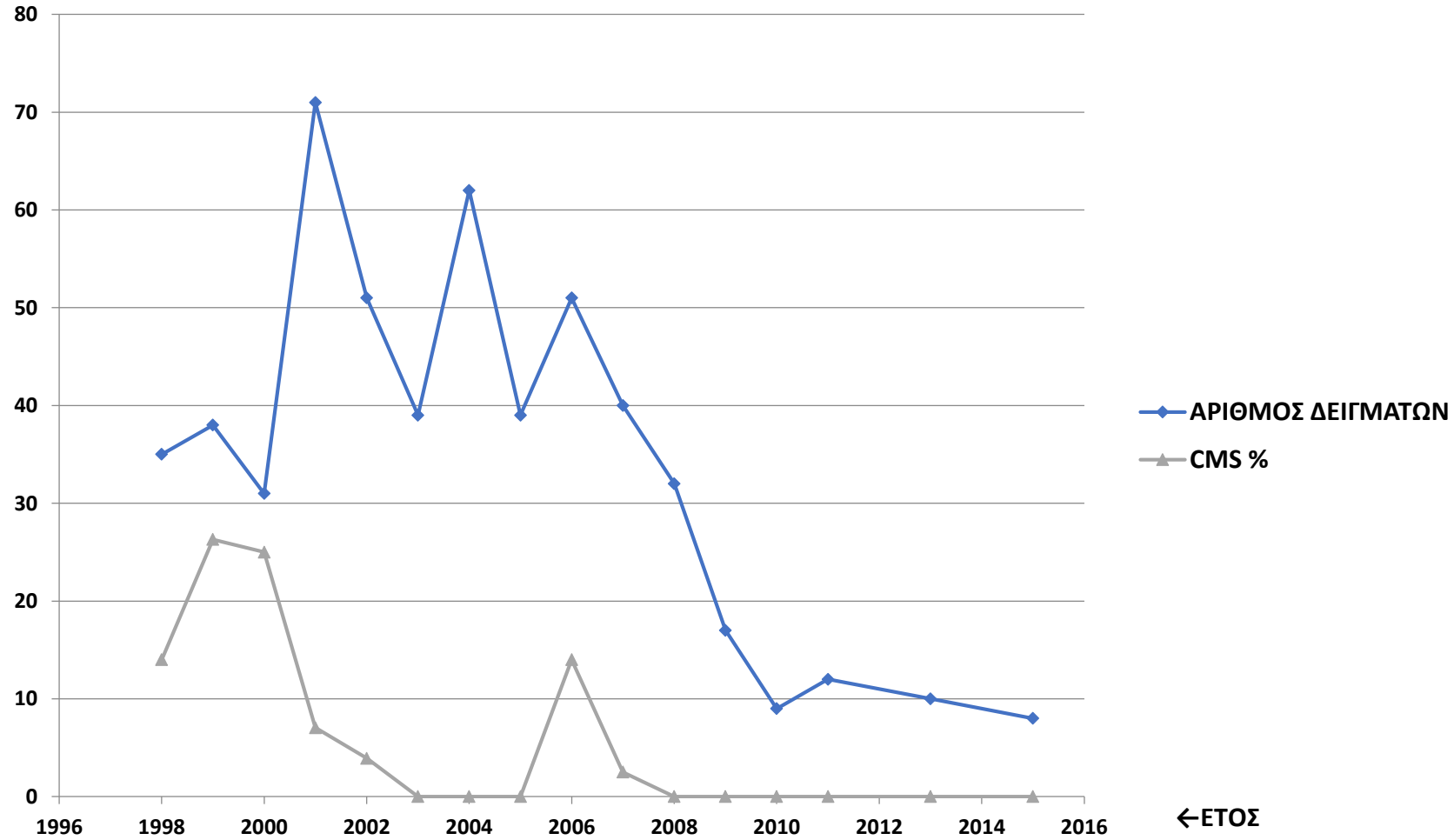
**ΜΕΣΣΑΡΑ: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΩΝ ΕΛΕΓΧΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΠΑΤΑΤΑΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΤΟΥ CMS ΚΑΤΑ ΤΑ ΕΤΗ 1998-2015**

**Μ  
Ε  
Σ  
Σ  
Α  
Ρ  
Α**

ΕΤΟΣ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	ΘΕΤΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ Cms	ΠΟΣΟΣΤΟ ΘΕΤΙΚΩΝ %
1998	35	5	14
1999	38	10	26,3
2000	31	8	25
2001	71	5	7,04
2002	51	2	3,92
2003	39	0	0
2004	62	0	0
2005	39	0	0
2006	51	7	14
2007	40	1	2,5
2008	32	0	0
2009	17	0	0
2010	9	0	0
2011	12	0	0
2012	-	-	-
2013	10	0	0
2014	-	-	-
2015	8	0	0

# ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΩΝ ΕΛΕΓΧΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΠΑΤΑΤΑΣ ΑΠΟ ΤΗΝ ΠΕΡΙΟΧΗ ΜΕΣΣΑΡΑΣ ΣΕ ΣΧΕΣΗ ΜΕ ΤΗΝ ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΤΟΥ CMS

Μ  
Ε  
Σ  
Σ  
Α  
Ρ  
Α



# Στοιχεία Βιολογίας του *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*

- **Δεδομένα για το Cms**
- Το Cms είναι **παθογόνο** σχετικά **ψυχρών περιοχών**, έχει σχετικά χαμηλή βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης (21-23 °C) και περιορίζεται κυρίως σε ψυχρές περιοχές καλλιέργειας της πατάτας
- Ενώ οι **χαμηλές θερμοκρασίες** συμβάλλουν στην **επιβίωση** του παθογόνου, οι υψηλές ευνοούν στην εκδήλωση των **συμπτωμάτων** της ασθένειας (Van der Wolf et al, 2005)
- Το βακτήριο **δεν επιβιώνει στα επιφανειακά νερά** για περισσότερο από δέκα μέρες, ενώ επίσης δεν επιβιώνει ευχερώς στο έδαφος παρά μόνο σε φυτικά υπολείμματα και σε φυτά εθελοντές (Van der Wolf & Van Beckhoven, 2004; Van der Wolf et al, 2005)

## Στοιχεία Βιολογίας του *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*

- Επιπλέον, είναι γνωστό ότι **οι πληθυσμοί του παθογόνου μειώνονται έντονα** σε θερμοκρασία εδάφους μεγαλύτερη των 15 °C σε συνδυασμό με επίπεδα υγρασίας μεγαλύτερα του 50% της υδατοϊκανότητας του εδάφους (Nelson , 1979 & 1980)
- Η **επιβίωση** του παθογόνου σε εξωτερικούς χώρους, στα **μέσα** και στα **εργαλεία** κατά τη διάρκεια του χειμώνα δεν είναι πολύ πιθανή λόγω των παρατεταμένων χαμηλών θερμοκρασιών και του υγρού καιρού (Nelson, (1978).

# Στοιχεία Βιολογίας του *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*



- Συνθήκες οροπεδίου Λασιθίου
- Από τα στοιχεία βροχόπτωσης της περιοχής διαπιστώνεται ότι **κάθε χρόνο για μεγάλα χρονικά διαστήματα ένα μεγάλο τμήμα των καλλιεργούμενων χωραφιών παραμένει σε κατάκλιση**, γεγονός που συμβάλλει στην ταχύτερη αποδόμηση των τυχόν φυτικών υπολειμμάτων και των κονδύλων που παραμένουν μετά τη συλλογή, αλλά θεωρητικά και στην πολύ μεγάλη αραίωση των πιθανολογούμενων μολυσμάτων του παθογόνου



## Στοιχεία Βιολογίας του *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*

- Στην **καταστροφή των φυτών εθελοντών** (groundkeepers) συμβάλλει και η εφαρμογή συστηματικής ζιζανιοκτονίας μεταφυτρωτικά και η κατά παράδοση, λόγω της κτηνοτροφίας, ακολουθούμενη στην περιοχή αμειψισπορά με σιτηρά
- **Γίνεται φανερό ότι οι ιδιαίτερες συνθήκες που επικρατούν κατά την περίοδο καλλιέργειας της πατάτας στο Οροπέδιο Λασιθίου (Μάιος – Σεπτέμβριος) δεν ευνοούν την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό του παθογόνου, ενώ αντίθετα ευνοούν την πιθανή εκδήλωση των συμπτωμάτων της ασθένειας**

- Εκτιμάται ότι τα τελευταία χρόνια το **30 – 40 %** του πιστοποιημένου πατατόσπορου που φυτεύεται είναι **μικρού διαμετρήματος κονδύλοι**, άρα δεν τεμαχίζεται.
- Επίσης, κατά παράδοση και για οικονομικούς λόγους, οι αγρότες της περιοχής όταν χρησιμοποιούν **«δικούς τους κονδύλους»** επιλέγουν προς φύτευση τους **μικρού διαμετρήματος μη εμπορεύσιμους κονδύλους**
- Ο **τεμαχισμός** πιστοποιημένων ή μη κονδύλων πραγματοποιείται χειρονακτικά από τον ίδιο τον καλλιεργητή, ο οποίος πλέον **έχει εκπαιδευτεί** στην απολύμανση των μέσων και των υλικών που χρησιμοποιεί αλλά και στην αναγνώριση των τυχόν συμπτωμάτων που προκαλούνται από τα διάφορα παθογόνα των κονδύλων της πατάτας, αποφεύγοντας για προφανείς λόγους την χρησιμοποίησή τους
- Τέλος, οι **φυτευτικές μηχανές δεν είναι τύπου picker** και έτσι αποφεύγεται η δημιουργία πληγών και η τυχόν επιμόλυνση υγιών κονδύλων

- Η **18ετής** πορεία της εξέλιξης της ασθένειας **επιβεβαιώνει τη μαζική εισαγωγή** του παθογόνου με το πολλαπλασιαστικό υλικό κατά το έτος 1996 και την περιορισμένη διασπορά του λόγω της φύτευσης μη πιστοποιημένου σπόρου
- **ΑΛΛΑ** επιβεβαιώνει και την **αδυναμία εγκατάστασης του στην περιοχή** λόγω των μη ευνοϊκών συνθηκών για την ανάπτυξη του παθογόνου, παρά τη μη ορθολογική εφαρμογή όλων των αναγκαίων μέτρων κατά τα πρώτα χρόνια εμφάνισης της ασθένειας και την καθυστερημένη εφαρμογή των στη συνέχεια

# Συμπεράσματα

## Λαμβάνοντας υπόψη:

- Τα εργαστηριακά αποτελέσματα των δειγματοληψιών που έλαβαν χώρα τόσο στο Οροπέδιο Λασιθίου, όσο και στις περιοχές Μαλίων - Μεσσαράς και τα οποία ήταν στο σύνολο τους αρνητικά το διάστημα 2008- 2015 όσον αφορά την παρουσία του *Clavibacter michiganensis* subsp.*sepedonicus*
- Τους επιτόπιους μακροσκοπικούς ελέγχους κατά τους οποίους δεν παρατηρήθηκαν ύποπτα συμπτώματα σε φυτά πατάτας ως προς την εμφάνιση του *Clavibacter michiganensis* subsp.*sepedonicus*
- Τα μέτρα που έχουν ληφθεί και εφαρμόζονται βάση Υ.Α. 94837/2000
- Τη βιολογία του παθογόνου και την περιορισμένη δυνατότητα επιβίωσης του σε σχέση με επικρατούσες τοπικές συνθήκες τόσο στο Οροπέδιο Λασιθίου όσο και στις περιοχές Μαλίων και – Μεσσαράς

**Φαίνεται ότι το βακτήριο**

***Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* έχει πλέον εκριζωθεί  
από τις περιοχές καλλιέργειας της πατάτας στην Κρήτη**

**Οι Αρμόδιες υπηρεσίες θα εξακολουθήσουν να πραγματοποιούν σχετικούς  
ελέγχους στο πλαίσιο των Επισκοπήσεων**

tests, involving the key EU laboratories.

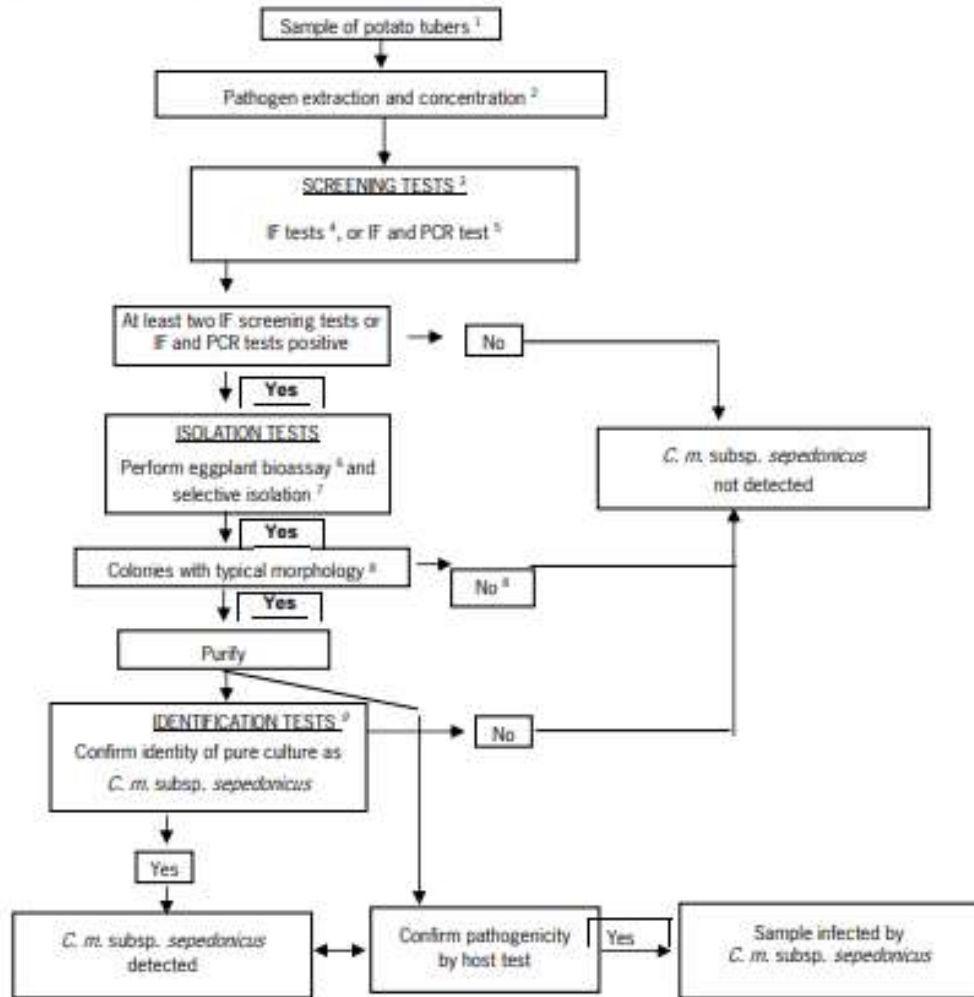
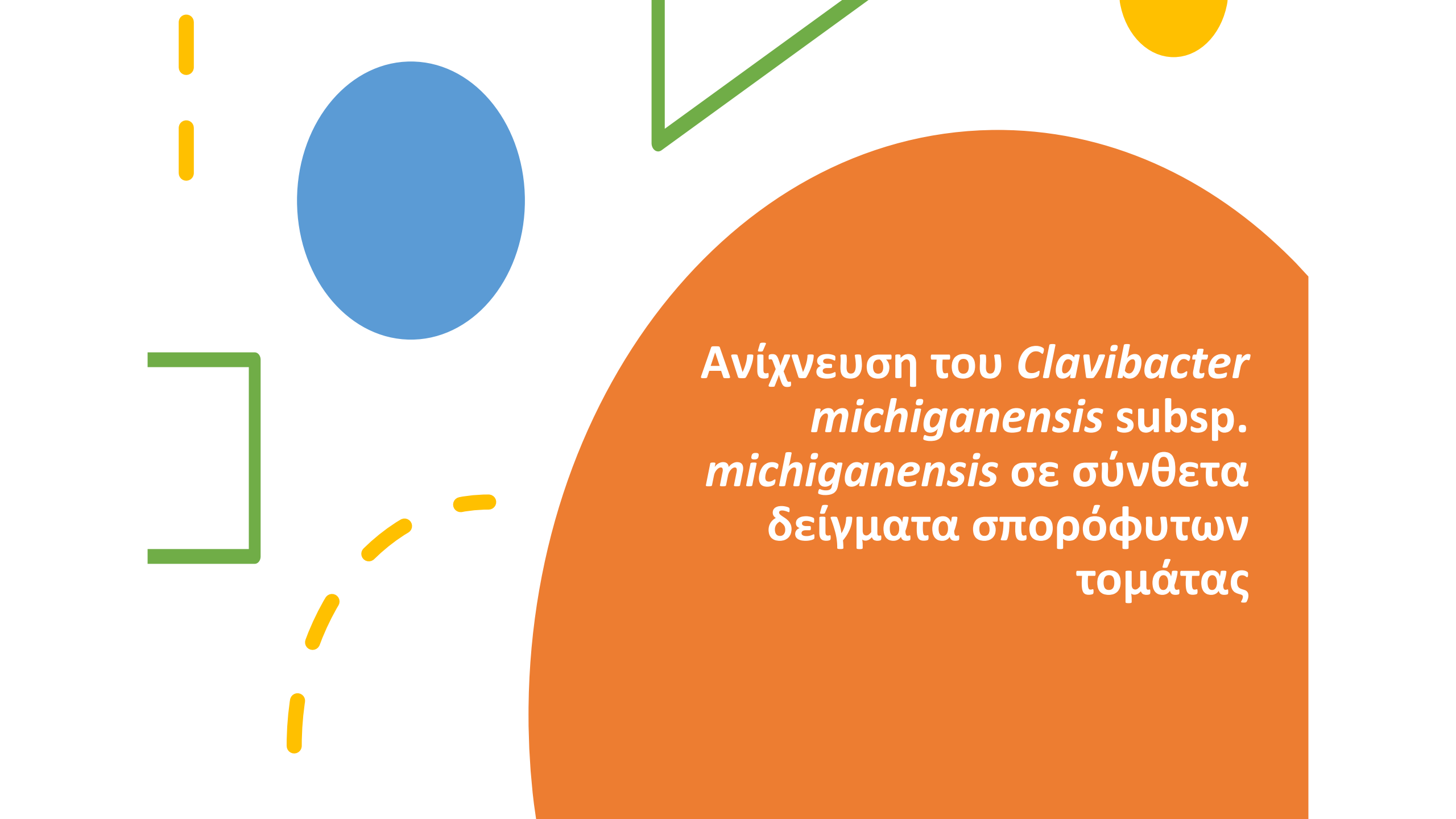


Fig 6.1.4.1. Scheme for detection and identification of *Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus* in samples of potato tubers.

- Footnote 1 The standard sample size is 200 tubers. 2 Cores containing vascular tissue are removed from the tuber heel ends processed and the resulting pellet is re-suspended in 1.5 ml 10mM phosphate buffer. 3 Two screening tests, preferably based on different biological principles (antibody and DNA technology) are performed. 4 The immunofluorescence (IF) test involves staining the target bacterial cells with specific antibodies to which are bound fluorescent markers (Janse & van Vaerenbergh, 1987). Selective binding of the antibodies to the cell walls of the ring rot bacteria allow them to be observed under UV microscopy. Two separate assays are used which incorporate either polyclonal or monoclonal antibodies. The pleomorph cells and the existence of coccoid shaped cells (apart from rods) may be confusing in IF microscopy. 5 A polymerase chain reaction (PCR) assay is performed as an additional confirmatory screening test. The PCR test involves highly specific and sensitive amplification and detection of DNA sequences (from ribosomal RNA gene targets) which are highly specific to the ring rot bacterium. This allows detection of potential false-positive IF results which sometimes occur due to non-specific binding of the antibodies to bacteria other than the ring rot bacterium. 6 Following positive results in screening tests, a bioassay in eggplants (*Solanum melongena*) is used to assist in the isolation of the ring rot bacterium. This involves injection of the potato extract pellet into the stems and incubation under quarantine glasshouse conditions at 18-24 °C for up to 28 days. During this period, the plants are observed for the development of typical wilting symptoms and isolation of the bacterium from symptomatic and asymptomatic plants is attempted. 7 A selective isolation medium (MTNA) is used for isolation of the ring rot bacterium from inoculated eggplants as well as directly from serial dilutions of the potato extract pellet (Jansing & Rudolph, 1998). Typical colonies can be obtained 3-7 days after plating but the slow-growing pathogen is easily overgrown by faster-growing saprophytic bacteria. It is therefore often more effective to isolate the bacterium after selective enrichment in the inoculated eggplants. 8 Because of the fastidious nature of the ring rot bacterium it is sometimes difficult to obtain a pure culture of the pathogen. In such cases, following positive IF and/or PCR results, the stock should be resampled (if necessary more intensively) and the whole process repeated with a view to obtaining a pure culture. 9 Once a culture of the bacterium has been obtained and purified, it is identified e. g. using IF-test, a combination of specific PCR assays, whole-cell fatty-acid profiling and a pathogenicity test on eggplants which involves injection of the pure culture into the stems, incubation at 18-24 °C, observation of typical symptoms and re-isolation of the organism from the diseased plants. T



Ανίχνευση του *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* σε σύνθετα δείγματα σπορόφυτων τομάτας

# Εισαγωγικά

## ***Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm)**

- Προκαλεί το βακτηριακό έλκος της τομάτας (bacterial canker of tomato)
- Χαρακτηρίζεται ως επιβλαβής οργανισμός από την Ευρωπαϊκή Ένωση (Annex II A, section II of Directive 2000/29/EC as amended)
- Αποτελεί μια από τις μεγαλύτερες απειλές για τις χώρες καλλιέργειας τομάτας παγκοσμίως έχοντας προκαλέσει καταστροφικές εξάρσεις ανά τα χρόνια με σοβαρές οικονομικές απώλειες

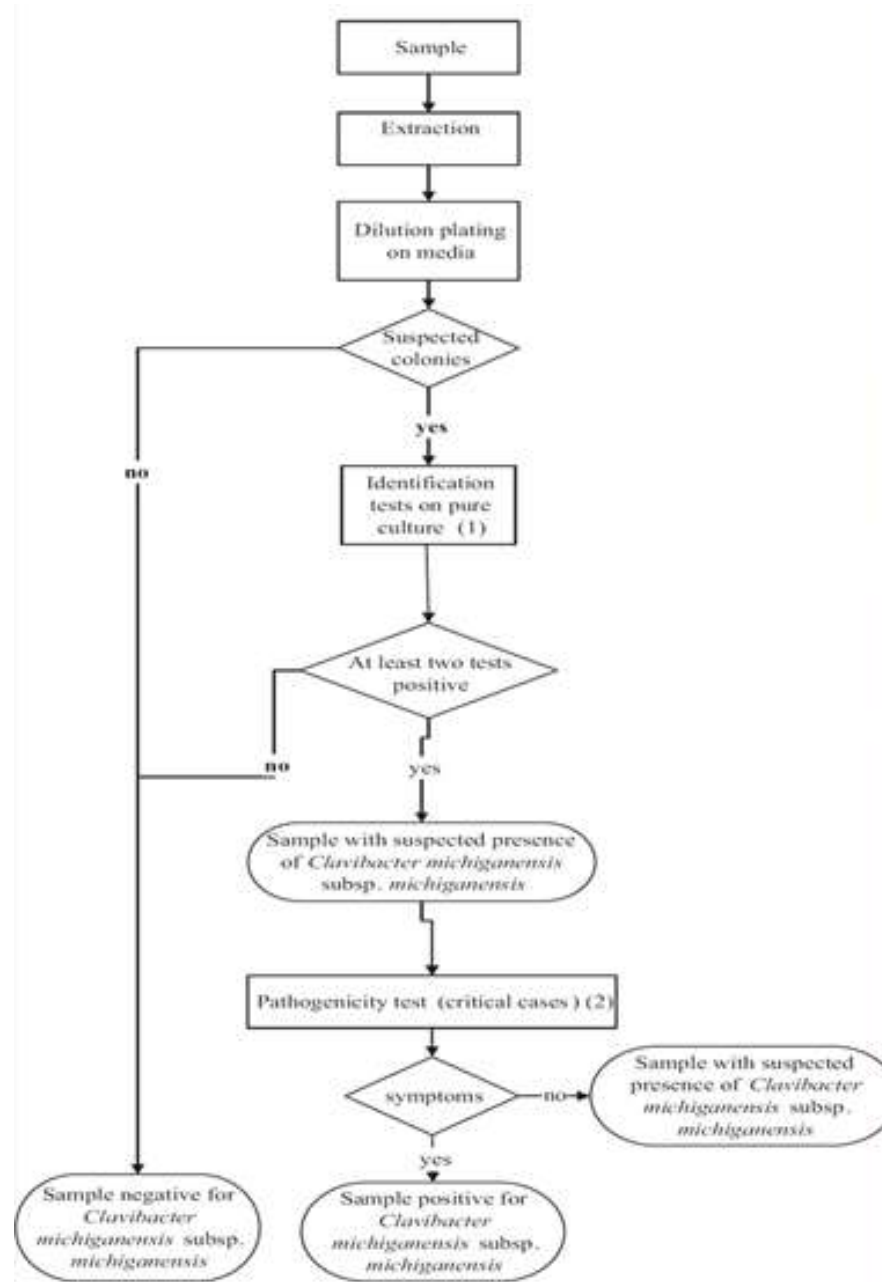
# Εισαγωγικά

- Μέχρι στιγμής, ο μόνος τρόπος αντιμετώπισής του είναι η **πρόληψη** μέσω του ελέγχου της υγείας των σπόρων και των σπορόφυτων
- Για το λόγο αυτό είναι σημαντική η **έγκαιρη και αποτελεσματική ανίχνευσή** του σε περίπτωση προσβολής από αυτό, **πριν ακόμα εμφανιστούν τα συμπτώματα της ασθένειας** στην καλλιέργεια
- Η διαθεσιμότητα **ευαίσθητων, αξιόπιστων, γρήγορων** και **μη δαπανηρών** μεθόδων ανίχνευσης, είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη και την εφαρμογή αποτελεσματικών στρατηγικών διαχείρισης της ασθένειας

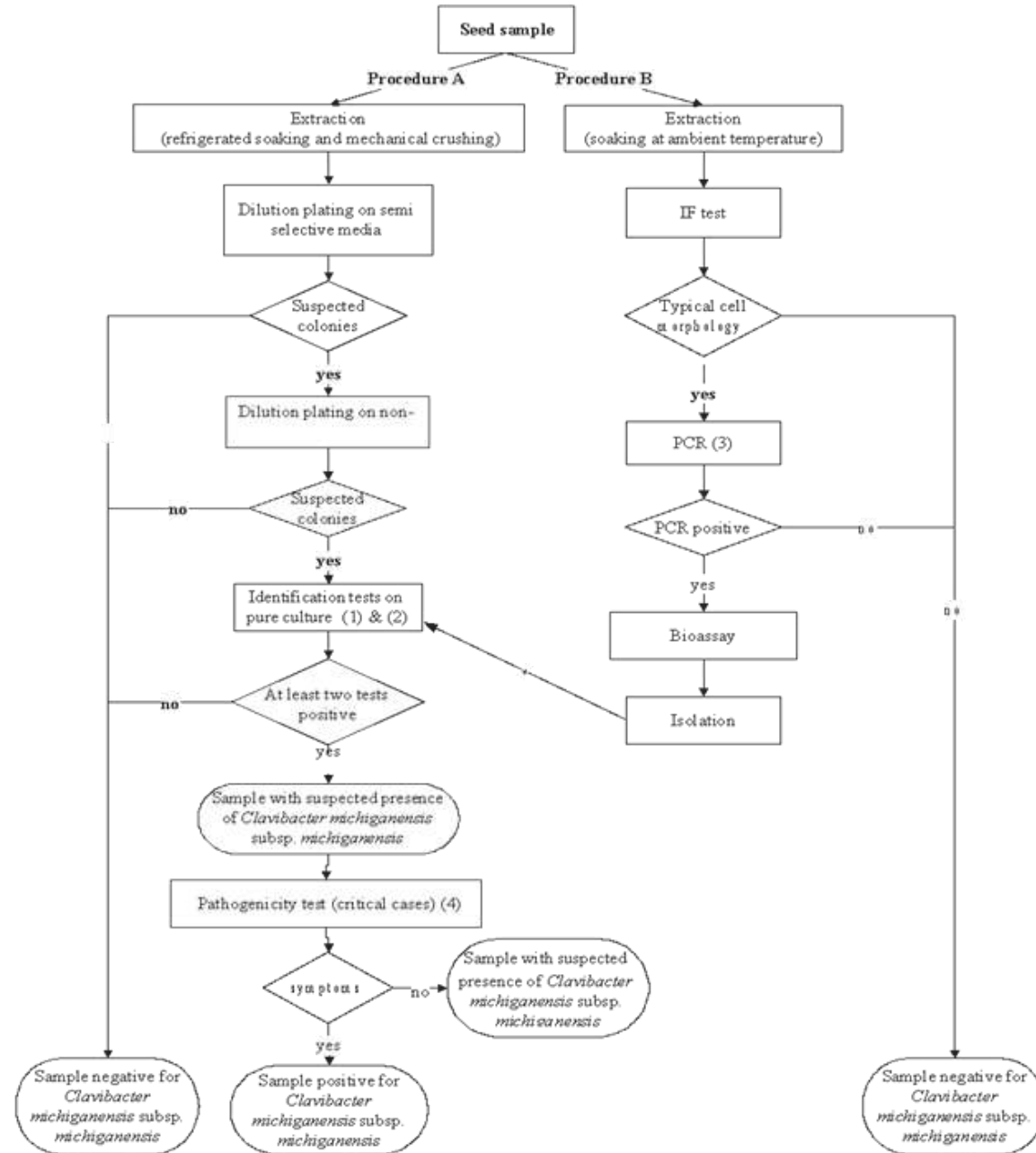
# Εισαγωγικά

- Η ανίχνευση προσβολών από το Cmm σε φυτώρια χωρίς εμφανή συμπτώματα είναι ασταθής
- αφού η επίπτωση των λοιμώξεων και η κατανομή του παθογόνου στο φυτό (ρίζες, στέλεχος, φύλλα) μπορεί να μεταβάλλεται ανάλογα με τις συνθήκες καλλιέργειας
- Προς το παρόν δεν υπάρχουν επικυρωμένα πρωτόκολλα για την ανίχνευση του Cmm από σπορόφυτα τομάτας με λανθάνοντες μολύνσεις (ασυμπτωματικά φυτά)
- Επιπλέον, ο έλεγχος πιθανών μολυσμένων φυτών σε φυτώρια για το παθογόνο αυτό, δεν πραγματοποιείται τακτικά, εξαιτίας του μεγάλου αριθμού φυτών που πρέπει να ληφθούν για την δειγματοληψία για μια εύλογη και αξιόπιστη ανίχνευση

Διάγραμμα ροής για την ανίχνευση και ταυτοποίηση του *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, σε **συμπτωματικά δείγματα** (“PM 7/42 (3) Cmm, EPPO Bulletin,” 2016)



Διάγραμμα ροής δύο διαφορετικών διαγνωστικών διαδικασιών για την ανίχνευση και ταυτοποίηση του *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, σε δείγματα σπόρων (“PM 7/42 (3) Cmm, EPPO Bulletin,” 2016)



# Μέθοδοι ανίχνευσης του Cmm

- Διασπορά αραιώσεων σε εκλεκτικά θρεπτικά μέσα
  - ✓ Ημικλεκτικό (SCM)
  - ✓ Ελάχιστο ημικλεκτικό (mSCM),
  - ✓ Γρήγορο ημικλεκτικό (SCM-fast)
  - ✓ Εκλεκτικό (CNS)
  - ✓ Μη εκλεκτικά (YDS, NBY)
- Μέθοδοι ανοσοδιάγνωσης
  - ✓ Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)
  - ✓ Immunofluorescence (IF)
  - ✓ Immunofluorescence Colony staining (IFC)
  - ✓ Immunomagnetic bead Separation (IMS)
- Μοριακές μέθοδοι
  - ✓ PCR
  - ✓ Bio-PCR
  - ✓ Real time PCR
  - ✓ TaqMan RT-PCR
- Βιοδοκιμές
  - ✓ μόλυνση ευαίσθητων φυτών τομάτας με αμιγή βακτηριακή καλλιέργεια και στη συνέχεια επαλήθευση για την ανάπτυξη τυπικών συμπτωμάτων που προκαλούνται από το Cmm
- Ανίχνευση με σύστημα AmplifyRP® Isothermal amplification
  - ✓ Χρησιμοποιεί την τεχνολογία της ισοθερμικής ενίσχυσης,
  - ✓ Βασίζεται στην μεθοδολογία Recombinase Polymerase Amplification (RPA)
  - ✓ Είναι μία μέθοδος ενίσχυσης DNA σε σταθερή θερμοκρασία (37-39°C), χρησιμοποιώντας 8 ένζυμα/αντιδραστήρια (Recombinase, DNA πολυμεράση, SSBP και άλλες πρωτεΐνες),
  - ✓ χωρίς την εκχύλιση DNA ή RNA
  - ✓ για ανίχνευση φθορισμού σε πραγματικό χρόνο

# Πλεονεκτήματα - Μειονεκτήματα μεθόδων

- Οι **μέθοδοι ανοσοδιάγνωσης** (ορολογικές), είναι σχετικά γρήγορες και φθηνές, αλλά υπάρχει ο κίνδυνος διασταυρωτών αντιδράσεων (μη εξειδίκευση) με άλλους μικροοργανισμούς (ψευδώς θετικά). Επιπλέον, η ευαισθησία τους είναι περιορισμένη και μπορεί να οδηγήσει σε ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα
- Οι **μοριακές** τεχνικές μπορούν επίσης να παράγουν ψευδώς θετικά ή ψευδώς αρνητικά εάν υπάρχουν αναστολείς της PCR
- Στην καλλιέργεια σε **θρεπτικά**, η ανάπτυξη του Ctm μπορεί να παρεμποδιστεί από οργανισμούς μη στόχους ή να υπερεκτιμηθεί ως αποτέλεσμα βακτηρίων με παρόμοιο φαινότυπο, οπότε η παρουσία του παθογόνου πρέπει να επιβεβαιωθεί χρησιμοποιώντας συμπληρωματικές μεθόδους
- Καθαρές βακτηριακές καλλιέργειες απαιτούνται για **βιοδοκιμές** και οι διαδικασίες απαιτούν αρκετό χρόνο για να ολοκληρωθούν
- Μπορούν να χρησιμοποιηθούν διαφορετικές μέθοδοι ή ένας συνδυασμός μεθόδων για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση του Ctm, ανάλογα με τη φύση των δειγμάτων (σπόροι ή φυτά), εάν ο σκοπός είναι ανίχνευση ή ο ποσοτικός προσδιορισμός και ανάλογα με τον απαιτούμενο χρόνο

# Σκοπός

Σκοπός της μελέτης ήταν η συγκριτική αξιολόγηση της ευαισθησίας ανίχνευσης της παρουσίας του *Cmm* σε σύνθετα δείγματα σποροφύτων τομάτας. Αξιολογήθηκαν συγκριτικά μοριακές (σύστημα AmplifyRP® XRT, PCR και RT-PCR) και ορολογικές (ELISA, IF) μέθοδοι ανίχνευσης καθώς και η ανάπτυξη του *Cmm* σε ημικλεκτικό μέσο

Εκτός από την ευαισθησία ανίχνευσης, εκτιμήθηκε το κόστος και ο χρόνος που απαιτείται για την ανίχνευση του *Cmm* με την κάθε μέθοδο, καθώς και επιπλέον παράμετροι

# Υλικά και Μέθοδοι

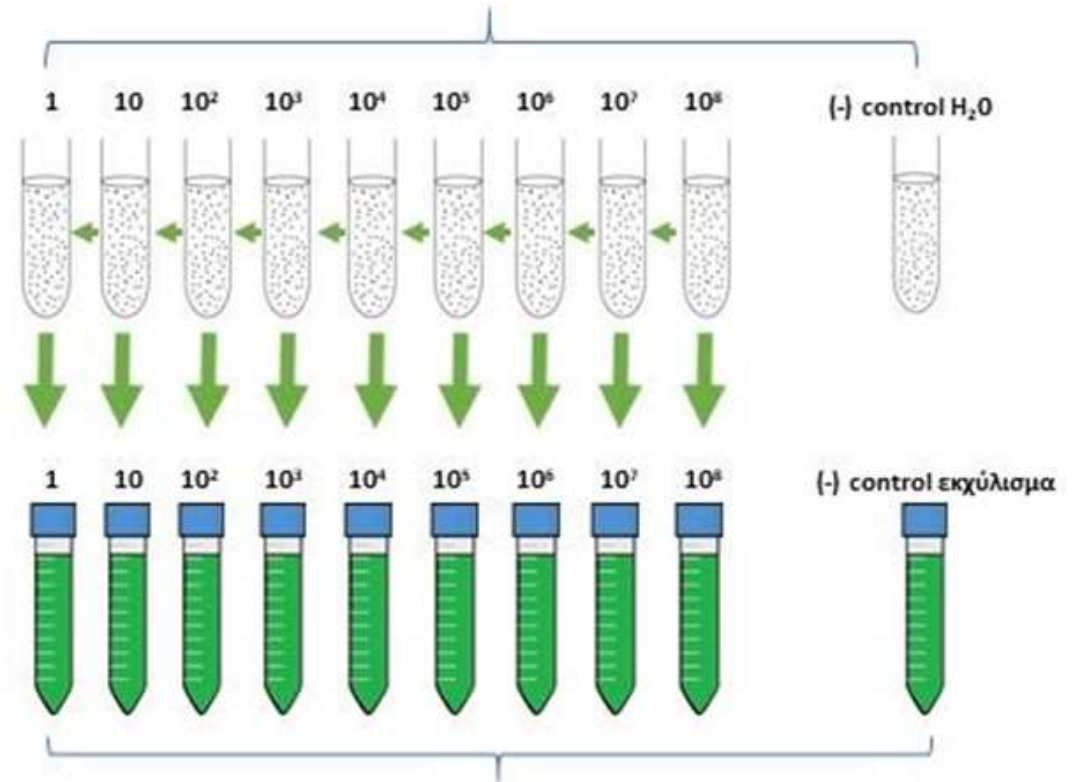
## Τεχνικές ανίχνευσης που ακολουθήθηκαν:

- ✓ ανοσοφθορισμός (Immunofluorescence, IF)
- ✓ ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay),
- ✓ Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR)
- ✓ Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real-Time Polymerase Chain Reaction, RT-PCR)
- ✓ Καλλιέργεια ημικλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα (SCM-fast: semi-selective medium on basis of SCM, SCMF)
- ✓ ανίχνευση με το σύστημα AmplifyRP® XRT

# Υλικά και Μέθοδοι

## Προετοιμασία αιωρημάτων:

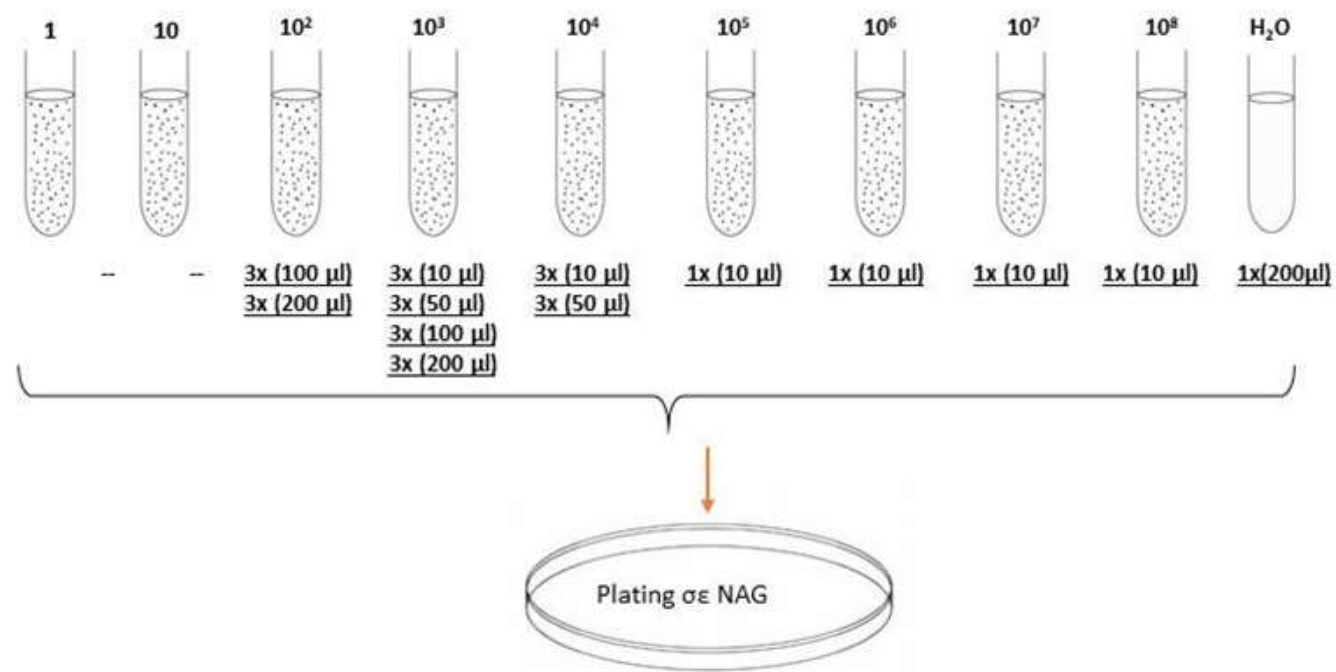
- ✓ 15mL βακτηριακού αιωρήματος καθαρής καλλιέργειας του στελέχους Cmm HMU4783 σε αποστειρωμένο H<sub>2</sub>O με συγκέντρωση 10<sup>8</sup> cfu/mL
- ✓ Η συγκέντρωση προσδιορίστηκε με φωτομέτρηση (OD600= 0,2)
- ✓ διαδοχικές αραιώσεις 1:10 της αρχικής καλλιέργειας
- ✓ έτσι ώστε να πάρουμε συγκεντρώσεις από 1 έως 10<sup>8</sup> cfu/mL
- ✓ ένα δείγμα ως μάρτυρας με H<sub>2</sub>O
- ✓ φυγοκέντρηση 10.000g για 10 λεπτά
- ✓ επαναιώρηση στο αντίστοιχο διάλυμα εκχύλισης για την κάθε τεχνική



# Υλικά και Μέθοδοι

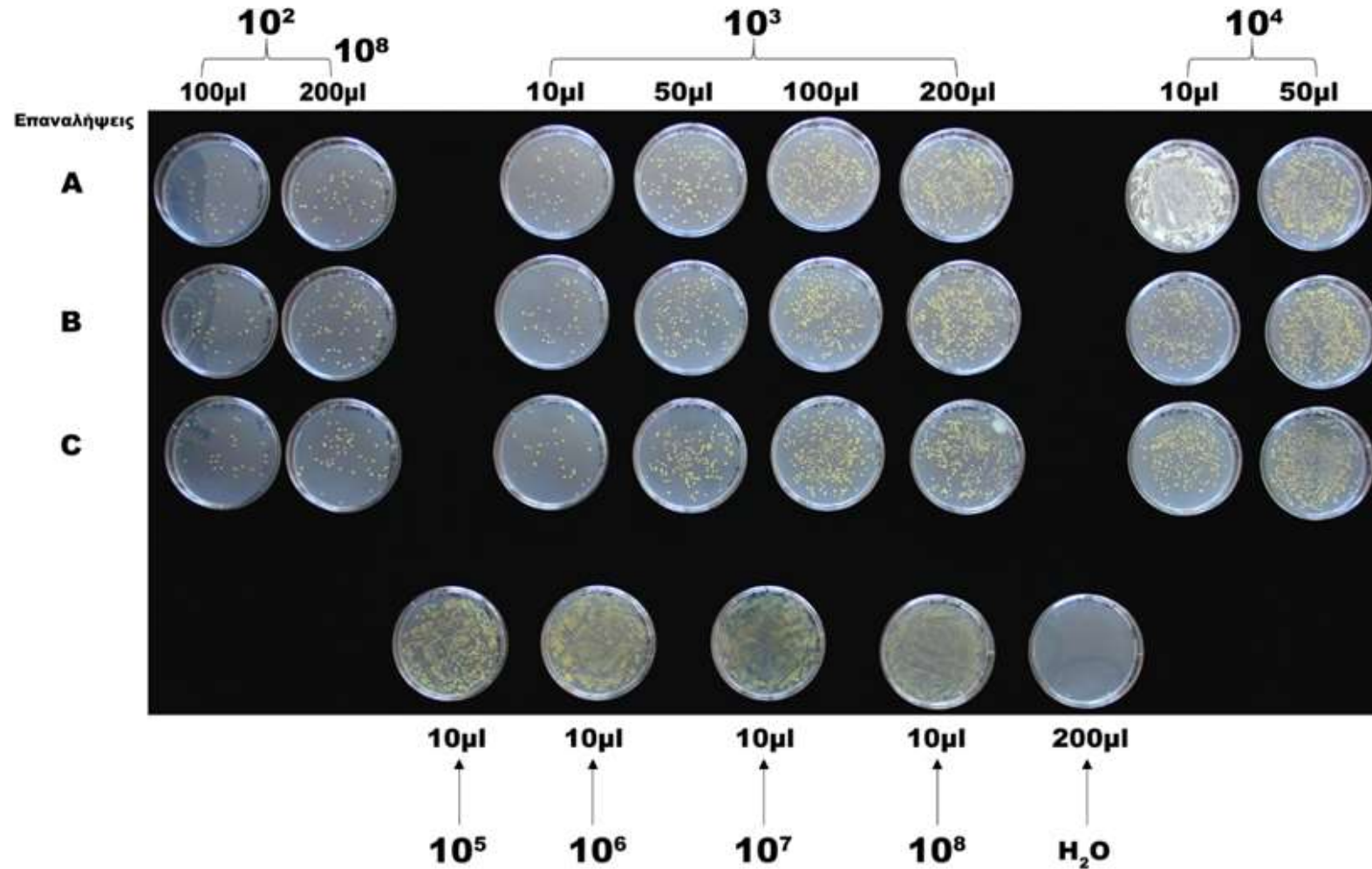
## Υπολογισμός συγκέντρωσης αρχικού αιωρήματος

- ✓ Για την επιβεβαίωση της συγκέντρωσης του αρχικού αιωρήματος πραγματοποιήθηκε διασπορά (plating) των βακτηριακών αιωρημάτων που παρασκευάστηκαν με τη μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων (από 1 έως  $10^8$  cfu/mL) σε μη εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα NAG
- ✓ Οι συγκεντρώσεις στις οποίες πραγματοποιήθηκε διασπορά ήταν από  $10^2$  έως  $10^8$  cfu/mL καθώς και στον αρνητικό μάρτυρα ( $H_2O$ )
- ✓ Τα δείγματα στη συνέχεια επωάστηκαν σε θάλαμο στους  $26^\circ C$  για διάστημα τεσσάρων ημερών
- ✓ Στη συνέχεια έγινε καταμέτρηση των αποικιών σε κάθε μία από τις επαναλήψεις και υπολογίστηκε η συγκέντρωση του αρχικού αιωρήματος ( $10^8$  cfu/mL)



# Αποτελέσματα

- Υπολογίστηκε ότι η συγκέντρωση του αρχικού αιωρήματος το οποίο χρησιμοποιήθηκε στις διάφορες τεχνικές για την συγκέντρωση  $10^8$ , ήταν  $3,16 \times 10^8$ , με τυπική απόκλιση  $1,18 \times 10^7$  cfu/mL



# Υλικά και Μέθοδοι

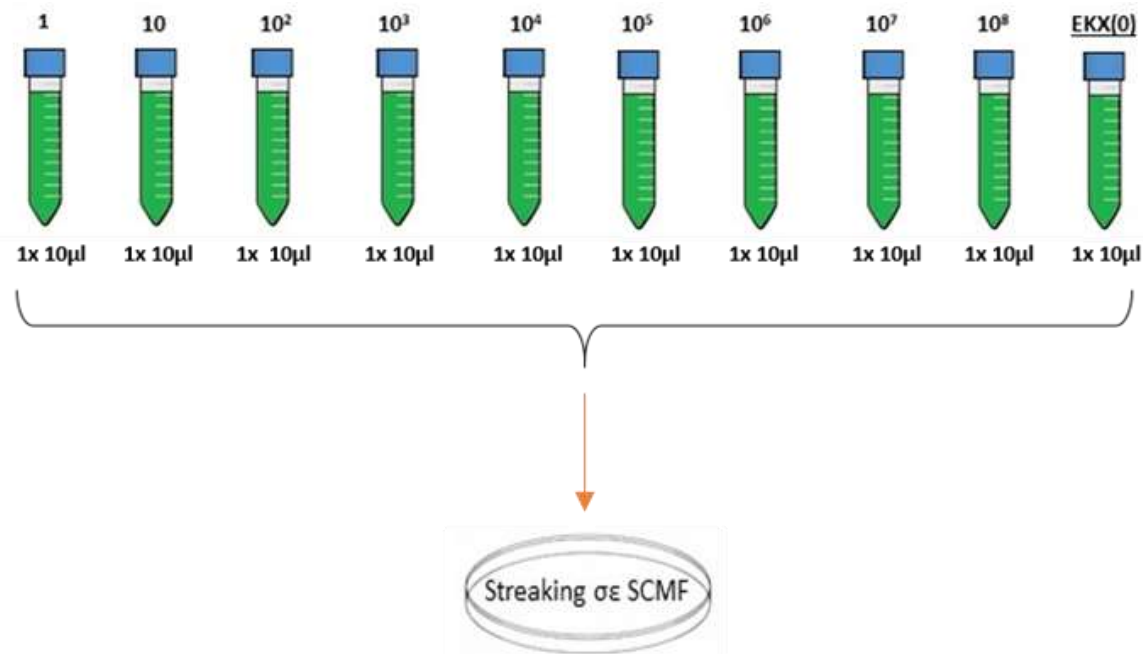
## Προετοιμασία σύνθετων δειγμάτων (εκχυλίσματα)

- ✓ Φυτικός ιστός προερχόμενος από ροδέλες στελεχών περίπου 50 διαφορετικών σποροφύτων τομάτας
- ✓ Στο στάδιο του δεύτερου πραγματικού φύλλου
- ✓ Ομογενοποίηση σε αποστειρωμένο νερό με ημιαυτόματο ομογενοποιητή Homex 6, με τελική αναλογία 0,2g ιστού/mL H<sub>2</sub>O (2:10)
- ✓ Τα εκχυλίσματα μεταφέρθηκαν στα tubes που υπήρχαν οι πελέτες από τις διαφορετικές συγκεντρώσεις αιωρημάτων του Cmm και ομογενοποιήθηκαν (vortex), έτσι ώστε να έχουμε σύνθετα φυτικά εκχυλίσματα με διαφορετικές συγκεντρώσεις βακτηριακού αιωρήματος Cmm (από 1 έως 10<sup>8</sup>, καθώς και ένα δείγμα ως μάρτυρας με σκέτο εκχύλισμα), όπως και στα αιωρήματα.
- ✓ Τα βακτηριακά αιωρήματα και τα φυτικά εκχυλίσματα, στη συνέχεια μεταχειρίστηκαν ανάλογα με την τεχνική που ακολουθήθηκε
- ✓ Για όλες τις τεχνικές ανίχνευσης χρησιμοποιήθηκαν τα ίδια δείγματα αιωρημάτων και εκχυλισμάτων

# Υλικά και Μέθοδοι

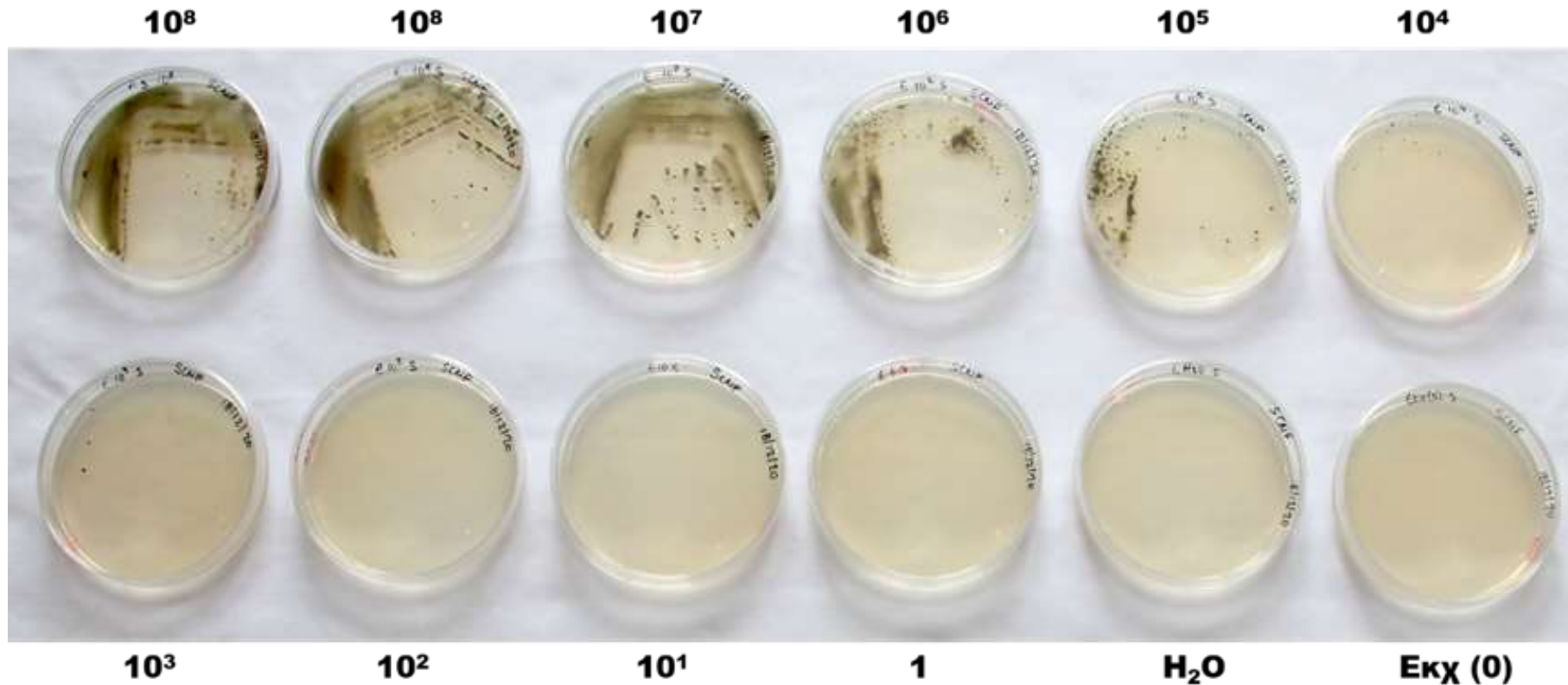
Καλλιέργεια/διασπορά (streaking) σε ημικλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα (SCM-fast: semi-selective medium on basis of SCM, SCMF)

- ✓ Για να διαπιστώσουμε το ελάχιστο όριο ανίχνευσης (ελάχιστη συγκέντρωση) του Cmm στα δείγματα των εκχυλισμάτων με τη μέθοδο διασποράς αραιώσεων σε ημικλεκτικά θρεπτικά μέσα, πραγματοποιήθηκε διασπορά τους, σε ημικλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα SCMF
- ✓ Τα δείγματα παρασκευάστηκαν όπως αναφέρεται παραπάνω και με τη χρήση βακτηριακού κρίκου απλώθηκαν στα τριβλία 10 μl από κάθε συγκέντρωση φυτικών εκχυλισμάτων μολυσμένων με Cmm.
- ✓ Τα δείγματα στη συνέχεια επωάστηκαν σε θάλαμο στους 26°C για διάστημα τεσσάρων ημερών



# Αποτελέσματα

- Σύμφωνα με τα αποτελέσματα από τη διασπορά (streaking) των δειγμάτων (εκχυλίσματα) μολυσμένων με διάφορες συγκεντρώσεις Cmm σε ημικλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα SCMF, διαπιστώθηκε ότι το βακτήριο ανιχνεύεται με τη μέθοδο αυτή έως και τη συγκέντρωση  $10^3$  cfu/mL καθώς το βακτήριο αναπτύχθηκε στα τριβλία μέχρι τη συγκέντρωση αυτή



# Υλικά και Μέθοδοι

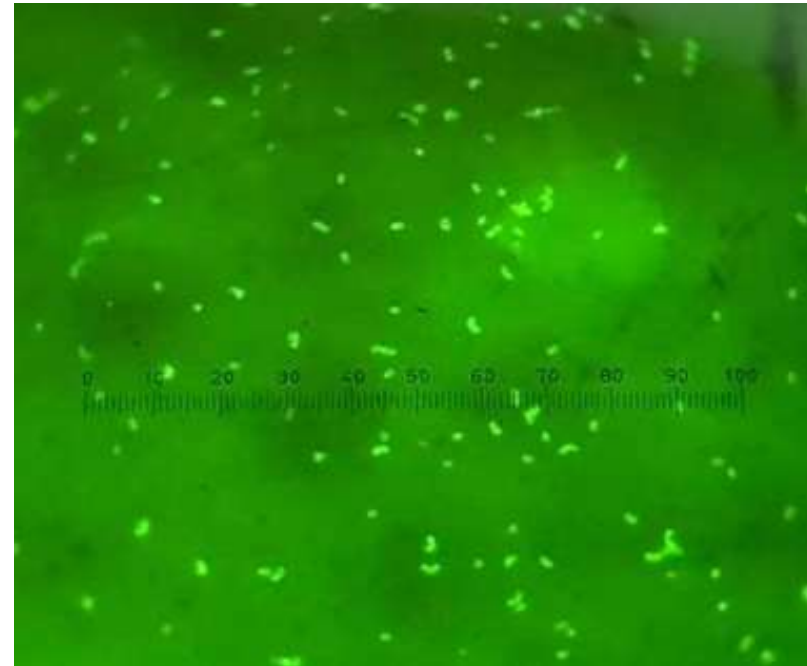
## Ανοσοφθορισμός (Immunofluorescence, IF)

- ✓ Για την τεχνική του ανοσοφθορισμού τα δείγματα μεταχειρίστηκαν με νερό για τη διαδικασία της εκχύλισης
- ✓ στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε η τεχνική του έμμεσου ανοσοφθορισμού
- ✓ χρησιμοποιήθηκαν πολυκλωνικά αντισώματα που έχουν παρασκευαστεί από το εργαστήριο Βακτηριολογίας του ΕΛΜΕΠΑ anti-Clav 782 και anti-Clav 25 (αραίωση 1:1200) και χρησιμοποιούνται σε ανιχνεύσεις ρουτίνας του παθογόνου καθώς και της εταιρείας LOEWE (Cat. No. 07363/01) 0.1mL (αραίωση 1:1000) και το δευτερογενές σημασμένο αντίσωμα (φθοριόχρωμα) CF488A Goat anti-Rabbit IgG (H+L), 2 mg/mL, 0.5 mL (Cat No. 20012, εταιρεία Biotium), που καθιστά την ανίχνευση του συμπλέγματος ορατή, σε αραίωση 1:100
- ✓ Η εξέταση των δειγμάτων έγινε σε μικροσκόπιο φθορισμού με ελαιοκαταδυτικό φακό (X100) και η παρουσία των αντιγόνων στο δείγμα προσδιορίστηκε από τον προκύπτοντα φθορισμό των βακτηριακών κυττάρων. Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε αιώρημα του Cmm στελέχους HMU4521 (108).

# Αποτελέσματα

- Διαπιστώθηκε ότι το ελάχιστο όριο ανίχνευσης στη συγκεκριμένη τεχνική ήταν στη **συγκέντρωση  $10^4$**  για τα δείγματα των αιωρημάτων και των εκχυλισμάτων, καθώς τα βακτηριακά κύτταρα εντοπίστηκαν μέχρι αυτές τις συγκεντρώσεις. Σε ορισμένες συγκεντρώσεις τα βακτηριακά κύτταρα ήταν μη μετρήσιμα (MM) λόγω του μεγάλου πλήθους τους

Μεταχείριση	Εκχυλίσματα		Αιωρήματα	
	Αποτέλεσμα	Κύτταρα/ΟΠ	Αποτέλεσμα	Κύτταρα/ΟΠ
(-) ΕΚΧ (0)	-	0	-	0
1	-	0	-	0
$10^1$	-	0	-	0
$10^2$	-	0	-	0
$10^3$	-	0	-	0
<b><math>10^4</math></b>	<b>+</b>	<b>10/50 ΟΠ</b>	<b>+</b>	<b>3-5</b>
$10^5$	+	2-3	+	5-30
$10^6$	+	20-30	+	MM
$10^7$	+	200	+	MM
$10^8$	+	MM	+	MM



# Υλικά και Μέθοδοι

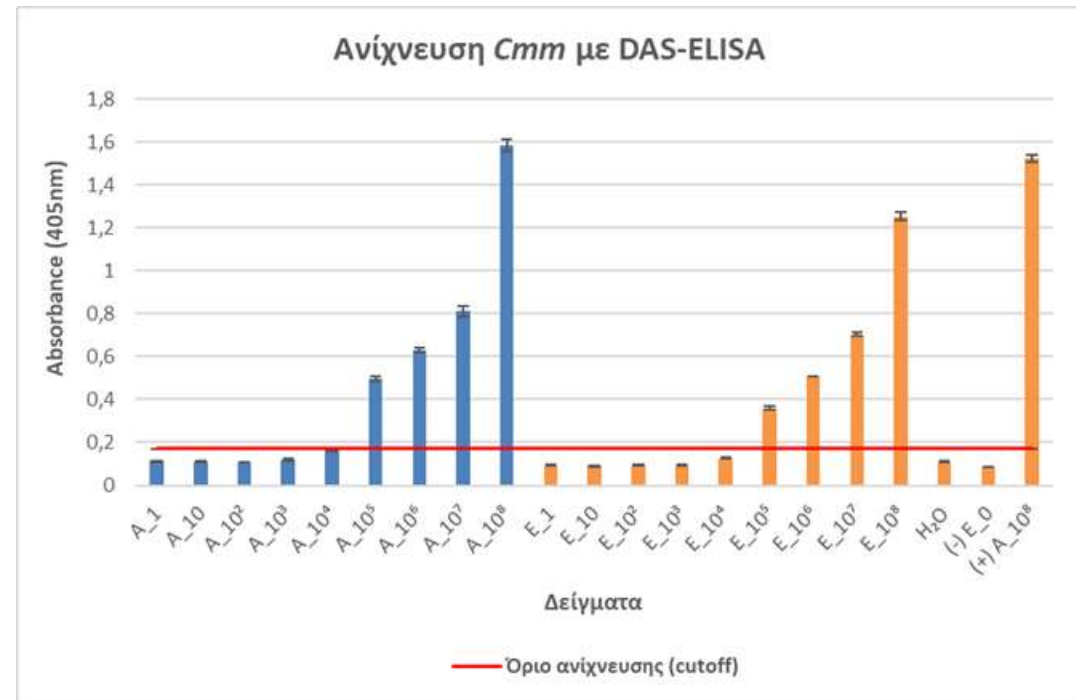
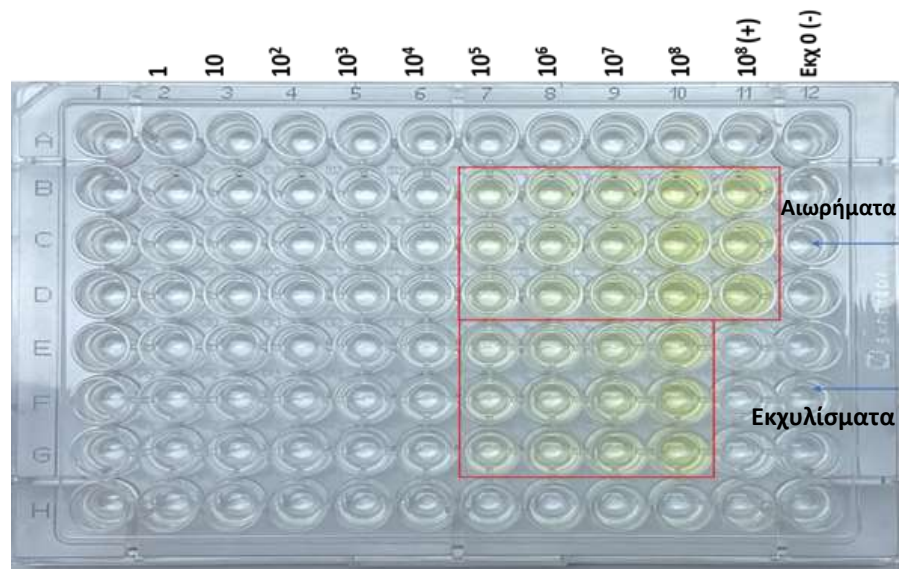
## ELISA (Enzyme-linked ImmunoSorbent Assay)

- ✓ Χρησιμοποιήθηκε παραλλαγή της μεθόδου τύπου Sandwich με χρησιμοποίηση δύο διαφορετικών αντισωμάτων που αναγνωρίζουν διαφορετικούς επιτόπους του αντιγόνου και συγκεκριμένα το πρωτόκολλο της εταιρείας Agdia (Reagent Set DAS ELISA, Alkaline phosphatase label)
- ✓ Η μέτρηση του προϊόντος της χρωμογόνου αντίδρασης πραγματοποιήθηκε με υπολογισμό της οπτικής πυκνότητας (Optical Density, OD) των δειγμάτων, έτσι μετά την ολοκλήρωση της επώασης η πλάκα εξετάστηκε σε iMark™ Microplate Absorbance Reader (Εικ. 6) της εταιρείας Bio-Rad στα 405 nm έως και 60 λεπτά μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας εφόσον τα αρνητικά δείγματα παρέμεναν καθαρά
- ✓ Γενικά, τα θετικά και αρνητικά κατώτατα όρια (thresholds) μπορούν να προσδιοριστούν χρησιμοποιώντας δύο φορές τον υγιή μέσο όρο. Δείγματα με δύο φορές υψηλότερη τιμή OD από τον υγιή μέσο όρο, θεωρούνται θετικά και δείγματα με τιμή OD δύο φορές κάτω από τον υγιή μέσο όρο, αρνητικά
- ✓ Συγκεκριμένα κατώτατο όριο (threshold) ορίστηκε η απορρόφηση (absorbance) 0,17nm, δηλαδή δύο φορές τον μέσο όρο του αρνητικού μάρτυρα ( $2 \times 0,086 \text{ nm} = 0,17 \text{ nm}$ )



# Αποτελέσματα

- Από τα αποτελέσματα διαπιστώθηκε ότι το ελάχιστο όριο ανίχνευσης στη συγκεκριμένη τεχνική ήταν στη **συγκέντρωση  $10^5$**  (από  $10^5$  έως  $10^8$ ) για τα δείγματα των αιωρημάτων καθώς και για τα εκχυλίσματα. Εκτός από την γραφική παράσταση, τα αποτελέσματα ήταν ορατά και με γυμνό μάτι στην πλάκα μικροτιτλοδότησης με αλλαγή του χρώματος των δειγμάτων σε κίτρινο



# Υλικά και Μέθοδοι

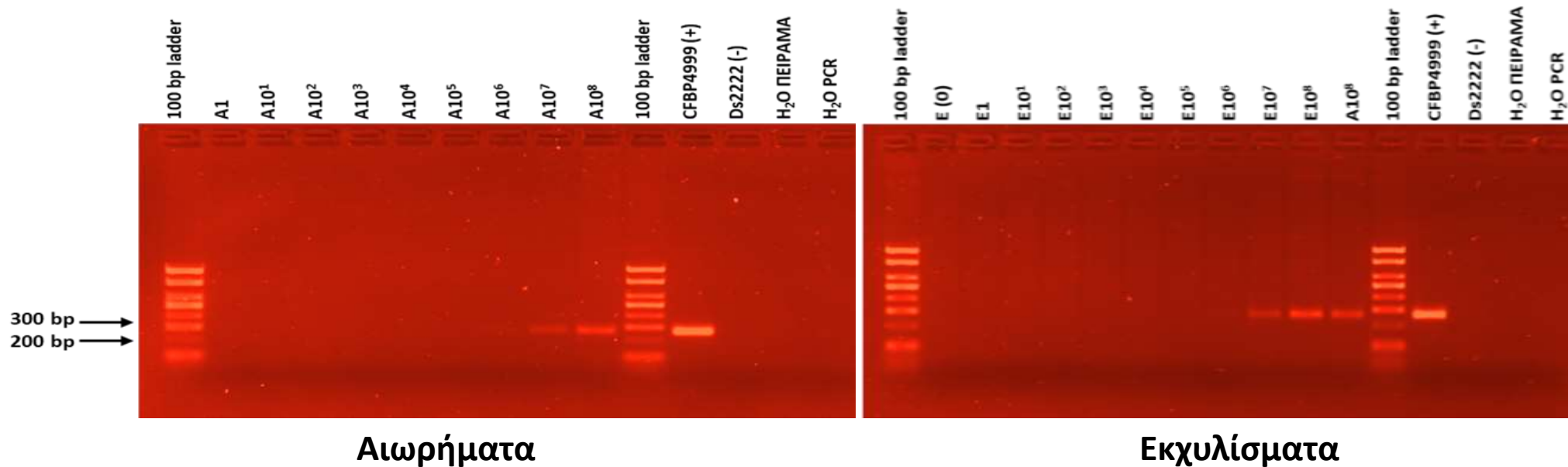
## Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR)

- ✓ Για την εκχύλιση του ολικού DNA χρησιμοποιήθηκε το DNeasy® Blood & Tissue Kit for Gram-positive bacteria (QIAGEN, Germany), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή
- ✓ Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για τις αντιδράσεις της συμβατικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (conventional PCR) ήταν οι PSA-8: 5'-TTGGTCAATTCTGTCTCCCTTC-3'/PSA-R: 5'-TACTGAGATGTTTCACTTCCCC-3' με ενισχυόμενο τμήμα αντίδρασης στα 268bp.
- ✓ Το πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν: αρχική αποδιάταξη για 5 min στους 94°C, ακολουθούμενη από 35 κύκλους με αποδιάταξη για 30 sec στους 95°C, υβριδοποίηση για 20 sec στους 63°C και επιμήκυνση για 45 sec στους 72°C και τελική επιμήκυνση για 5min στους 72°C
- ✓ Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε θερμικό κυκλοποιητή T100™ Thermal Cycler της εταιρείας Bio-Rad



# Αποτελέσματα

- Τα αποτελέσματα της συμβατικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης παρουσιάζονται σε πήκτωμα αγαρόζης 1,7%. Οι εξειδικευμένοι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για τις αντιδράσεις, ήταν οι PSA-8/PSA-R, με ενισχυόμενο τμήμα αντίδρασης στα 268bp. Τη ζώνη αυτή εμφάνισαν τα δείγματα με συγκεντρώσεις  $10^8$ ,  $10^7$  και  $10^6$  στα δείγματα των αιωρημάτων αλλά και των εκχυλισμάτων, ενώ τα υπόλοιπα δείγματα ( $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$ ,  $10^1$  και 1) δεν παρουσίασαν ενίσχυση, άρα το ελάχιστο όριο ανίχνευσης της συγκεκριμένης τεχνικής ήταν η **συγκέντρωση  $10^6$**  για τα αιωρήματα και τα εκχυλίσματα



# Υλικά και Μέθοδοι

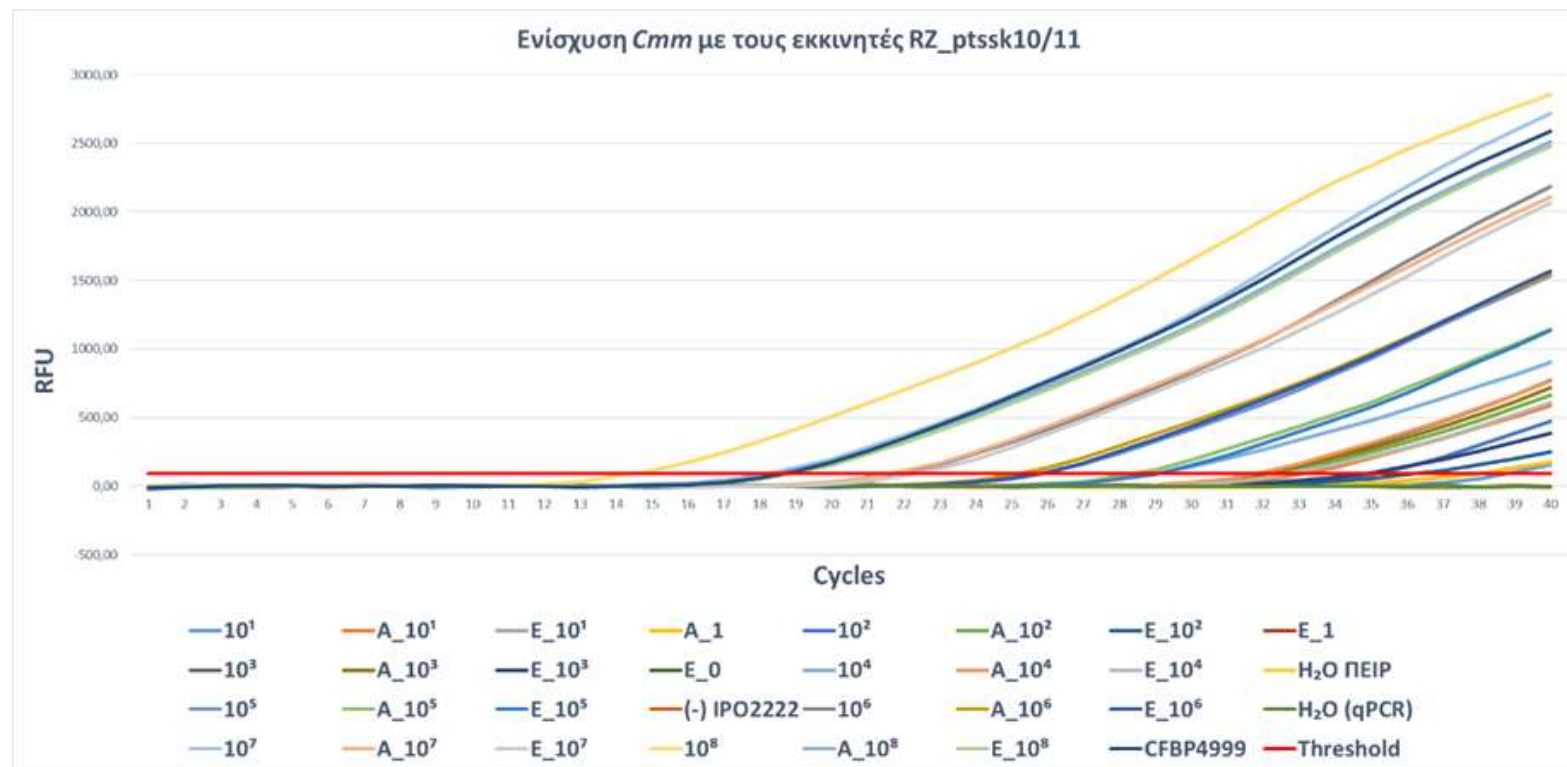
## Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real-Time Polymerase Chain Reaction, RT-PCR)

- ✓ Για την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου η εκχύλιση του DNA πραγματοποιήθηκε με τον ίδιο τρόπο όπως και για τη συμβατική PCR
- ✓ Για την αντίδραση χρησιμοποιήθηκαν οι primers: Forward RZ\_ptssk 10: 5'-GGGGCCGAAGGTGCTGGTG-3'/Reverse RZ\_ptssk 11: 5'-CGTCGCCCCGCCGCTG-3' και ο Probe RZ\_ptssk 12: 6FAM-TGGTCGTCCTCGGCG-MGBNFQ, με ενισχυόμενο τμήμα αντίδρασης στα 132bp
- ✓ Το πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν: αρχική αποδιάταξη 95°C για 10 min, ακολουθούμενη από 40 κύκλους με: 95°C για 15 sec και 60°C για 30 sec, ramp speed: 5°C s<sup>-1</sup>
- ✓ Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν στο Real-Time PCR σύστημα CFX96 Real Time System (Bio-Rad)
- ✓ Οι ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν για τις αντιδράσεις ήταν: 2x TaqMan master mix (Applied Biosystems), 20 μM από τον κάθε primer και τον probe και DNA 2μl, σε τελικό όγκο αντίδρασης 25μl



# Αποτελέσματα

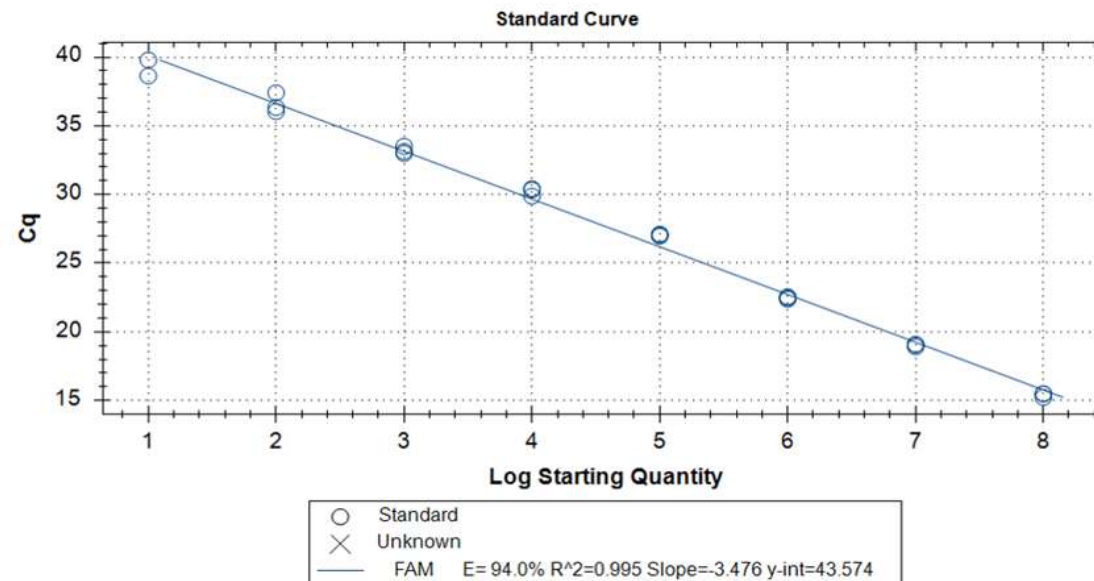
- Από τα αποτελέσματα παρατηρούμε ότι το ελάχιστο όριο ανίχνευσης για τα δείγματα των **αιωρημάτων** ήταν έως και την συγκέντρωση  **$10^1$**
- Για τα δείγματα των **εκχυλισμάτων** το ελάχιστο όριο ανίχνευσης ήταν έως τη συγκέντρωση  **$10^3$**
- Όσα δείγματα παρουσίασαν τιμές μετά τον 35ο κύκλο της αντίδρασης (cutoff), θεωρήθηκαν μη ανιχνεύσιμα (αρνητικά)
- Τα δείγματα αυτά ήταν για τα αιωρήματα ήταν η συγκέντρωση 1 και για τα εκχυλίσματα οι συγκεντρώσεις 1,  $10^1$ , και  $10^2$



# Υλικά και Μέθοδοι

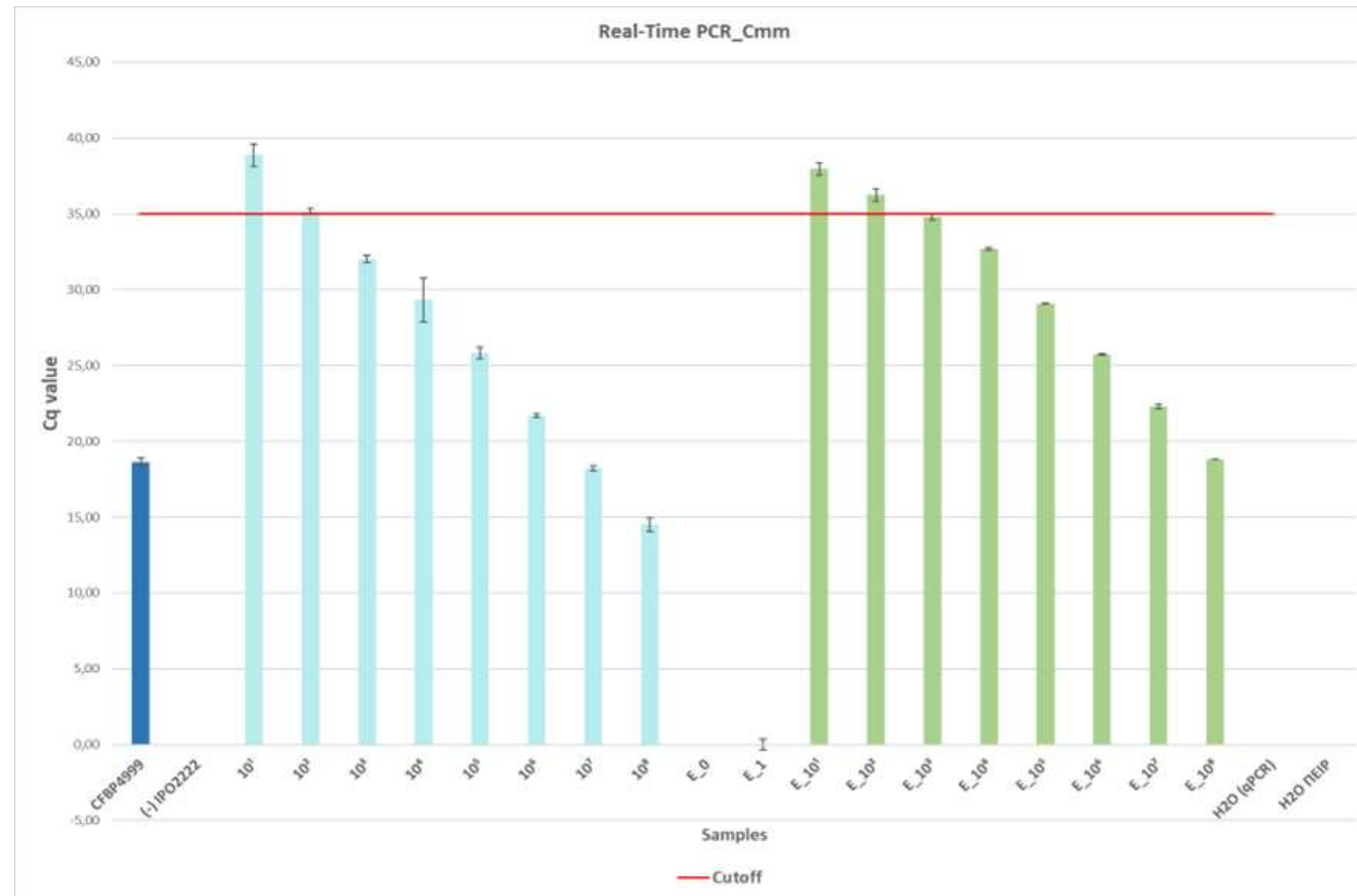
## Πρότυπη καμπύλη RT-PCR

- ✓ Για τον έλεγχο της ευαισθησίας της ανάλυσης και τον υπολογισμό του αριθμού των αντιγράφων των βακτηριακών δειγμάτων, κατασκευάστηκε πρότυπη καμπύλη από διαδοχικές αραιώσεις DNA που απομονώθηκε από καθαρές καλλιέργειες του *Cmm* HMU4787 σε συγκεντρώσεις που κυμαίνονται 1 έως  $10^8$
- ✓ Θεωρήσαμε ως μέγεθος του γονιδιώματος του *Cmm* τα 3,45 MB που έχει προκύψει από το μέσο όρο στελεχών του *Cmm* που έχουν αλληλουχηθεί πλήρως σύμφωνα με τους Thapa et al., 2017
- ✓ Ο υπολογισμός των αντιγράφων έγινε με τον τύπο:  $\text{Copies/ul} = [6.022 \times 10^{23} \text{ (copy/mol)} \times \text{amount (g)}] / [\text{length (bp)} \times 660 \text{ (g/mol/bp)}]$
- ✓ Η τυπική γραμμική παλινδρόμηση ( $E = 94.0\%$   $R^2 = 0.994$   $\text{Slope} = -3.451$   $y\text{-int} = 42.489$ ) ελήφθη με γραφική παράσταση της λογαριθμικής συγκέντρωσης των αντιγράφων *Cmm* στις διαφορετικές αραιώσεις (Y) έναντι των μέσων τιμών Ct (X)
- ✓ Η απόδοση (E) της αντίδρασης PCR σε πραγματικό χρόνο ήταν 94.0% για την πρωτεΐνη kinase (PTSSK) η οποία υπολογίστηκε με τον τύπο  $E = [10^{(-1 / \text{Slope})} - 1]$
- ✓ Οι τιμές κατωφλίου κύκλου  $> 35$  θεωρήθηκαν αρνητικές



# Αποτελέσματα

- Τα δείγματα της πρότυπης καμπύλης με τα δείγματα των εκχυλισμάτων παρουσίασαν αρκετά μεγάλη ομοιότητα στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις



# Υλικά και Μέθοδοι

## AmplifyRP XRT

- ✓ Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν στο σύστημα AmpliFire® Isothermal Fluorometer της εταιρείας Agdia (Cat. No.: AFR 60400), χρησιμοποιώντας το Real-time isothermal amplification kit, AmplifyRP® XRT for Cmm (Catalog No.: XCS 44001/0048), της ίδιας εταιρείας
- ✓ Για τη συγκεκριμένη τεχνική, τα δείγματα μεταχειρίστηκαν όπως περιγράφεται παραπάνω και μετά στη συνέχεια ακολουθήθηκε η διαδικασία σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή
- ✓ Η αντίδραση παρακολούθηθηκε σε πραγματικό χρόνο και η αντίδραση ολοκληρώθηκε μετά από 20 λεπτά
- ✓ Τα αποτελέσματα εμφανίζονται στην οθόνη και ερμηνεύονται ως εξής: (+) = θετικό στο Cmm, (-) = δεν ανιχνεύτηκε Cmm, (!) = μη έγκυρο



1. Extract Sample



3. Scan bar code for specific assay



2. Prepare Reaction



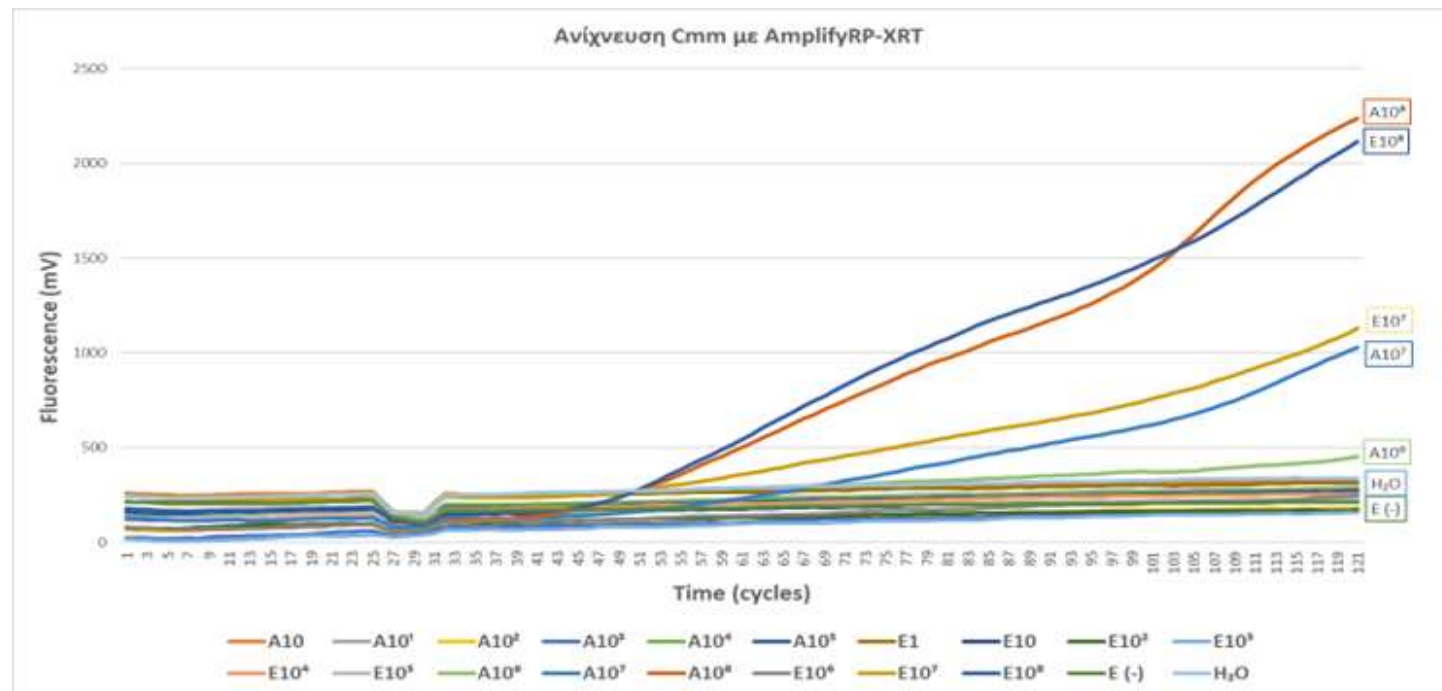
4. Place reaction in AmpliFire and start test



5. Get Results

# Αποτελέσματα

- Το ελάχιστο όριο ανίχνευσης στη συγκεκριμένη τεχνική ήταν η συγκέντρωση  $10^7$  για τα δείγματα των αιωρημάτων και των εκχυλισμάτων. Η συγκέντρωση  $10^6$  στο αιώρημα, εμφάνισε μικρή εκθετική φάση προς το τέλος της αντίδρασης, αλλά το δείγμα θεωρήθηκε αρνητικό από το σύστημα.
- Τα δείγματα του  $H_2O$  και του εκχυλίσματος χωρίς βακτηριακό αιώρημα (E-), ήταν αρνητικά



# Αποτελέσματα

- Σύγκριση μεταξύ έξι διαφορετικών μοριακών και ορολογικών τεχνικών για την ανίχνευση του *Cm11*. Οι διαφορετικές τεχνικές, εκτός από το όριο ανίχνευσης, συγκρίθηκαν και ως προς όπως τον χρόνο, και το κόστος ανίχνευσης, τις ανάγκες για εξειδικευμένο εργατικό δυναμικό και εργαστηριακών εγκαταστάσεων και την φορητότητα. Η σύγκριση πραγματοποιήθηκε ανά δείγμα

Τεχνική ανίχνευσης	Χρόνος (λεπτά,) ανίχνευσης προσεγγιστικά			Κόστος (ευρώ) <sup>c</sup> ανίχνευσης προσεγγιστικά		Εξειδικευμένες γνώσεις προσωπικού	Εξειδικευμένος εργαστηριακός εξοπλισμός	Φορητότητα	Ελάχιστο όριο ανίχνευσης
	Προετοιμασία δειγμάτων <sup>a</sup>	Εκχύλιση DNA	Assay Run	Εκχύλιση DNA	Assay Run				
Amplify-RT	5	-	30	-	12.88 <sup>e</sup>	OXI	OXI	NAI	10 <sup>7</sup>
ELISA <sup>f</sup>	250	-	330	-	0.68	NAI	NAI	OXI	10 <sup>5</sup>
IF	15	-	90	-	0.15	NAI	NAI	OXI	10 <sup>4</sup>
SCMF	15	-	4 μέρες*	-	0.15	NAI	NAI	OXI	10 <sup>3</sup>
PCR	15	120 <sup>b</sup>	120	4.64 <sup>d</sup>	0.37	NAI	NAI	OXI	10 <sup>6</sup>
RT-PCR	15	120 <sup>b</sup>	75	4.64 <sup>d</sup>	1.07	NAI	NAI	OXI	10 <sup>3</sup>

# Συμπεράσματα

- Οι πιο ευαίσθητες δοκιμασίες για την ανίχνευση του Cmm, ήταν η PCR σε πραγματικό χρόνο και η καλλιέργεια σε ημικλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα SCMF με όριο ανίχνευσης  $10^3$  cfu/mL
- Οι δοκιμασίες με το μικρότερο κόστος ήταν ο ανοσοφθορισμός και η καλλιέργεια σε ημικλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα SCMF με κόστος 0,15€/δείγμα
- Η δοκιμασία με το σύστημα AmplifyRP® XRT, απαιτούσε τον λιγότερο χρόνο για την ολοκλήρωση της διαδικασίας (35 λεπτά), ενώ ήταν η μόνη δοκιμασία που υπήρχε η δυνατότητα της φορητότητας για ανίχνευση στο πεδίο και δεν απαιτούσε εξειδικευμένο εργατικό δυναμικό και εξειδικευμένες εργαστηριακές εγκαταστάσεις
- Η λιγότερο ευαίσθητη δοκιμασία για την ανίχνευση του Cmm, με όριο ανίχνευσης  $10^7$  cfu/mL, αλλά και αυτή με το μεγαλύτερο κόστος (12,88€/δείγμα), ήταν αυτή με το σύστημα AmplifyRP® XRT
- Η δοκιμασία που απαιτούσε τον περισσότερο χρόνο για την ολοκλήρωση της διαδικασίας ήταν η καλλιέργεια σε ημικλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα SCMF
- ενώ όλες οι δοκιμασίες εκτός από το σύστημα AmplifyRP® XRT, απαιτούσαν εξειδικευμένο εργατικό δυναμικό και εργαστηριακές εγκαταστάσεις και δεν παρείχαν τη δυνατότητα φορητότητας για ανίχνευση στο πεδίο

## **Συμπερασματικά,**

αν και το Ctmt ανιχνεύθηκε επιτυχώς από μολυσμένα δείγματα σύνθετων δειγμάτων σποροφύτων τομάτας χρησιμοποιώντας και τις έξι διαφορετικές μοριακές και ορολογικές δοκιμασίες, **η PCR σε πραγματικό χρόνο ήταν η πιο ευαίσθητη και αξιόπιστη δοκιμασία** για την ανίχνευση του παθογόνου σε εργαστηριακές συνθήκες με βάση προσδιορισμούς ποσότητας ανίχνευσης παθογόνου. Από την άλλη πλευρά, λαμβάνοντας υπόψη το χρόνο, τη φορητότητα και την αποδοτικότητα κόστους, συμπεριλαμβανομένων των εργαστηριακών εγκαταστάσεων και το κόστος για το εξειδικευμένο ανθρώπινο δυναμικό, **το σύστημα AmplifyRP® XRT**, ήταν πιο κατάλληλο καθώς μπορεί να χρησιμοποιηθεί ευρέως **για την επιτόπια ανίχνευση του παθογόνου**

