

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<i>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1</i>	5
<i>ΕΙΣΑΓΩΓΗ – ΣΗΜΑΝΤΙΚΕΣ ΒΑΚΤΗΡΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΑΔΘΕΝΕΙΕΣ ΚΟΛΟΚΥΝΘΟΕΙΔΩΝ</i>	5
Βακτηριολογικές ασθένειες κολοκυνθοειδών	6
1.1 Γωνιώδης κηλίδωση	6
1.1.1 Αίτιο- Συνθήκες ανάπτυξης	6
1.2 Βακτηριακή κηλίδωση	7
1.3 Βακτηριακή σήψη και μετασυλλεκτικές σήψεις	7
1.4 Βακτηριακή νέκρωση του φλοιού της καρπουζιάς	8
1.5 Βακτηρίωση της πεπονιάς	8
1.6 Καρκίνος	9
1.7 Ριζομανία	9
1.8 Η ασθένεια της βακτηριακής κηλίδωσης της καρπουζιάς	9
1.8.1 Ιστορική αναδρομή	10
1.8.2 Το παθογόνο βακτήριο	10
1.8.3 Στοιχεία επιδημιολογίας	11
1.8.4 Ξενιστές και Γεωγραφική Κατανομή	12
1.8.5 Συμπτώματα και σημεία	13
1.8.6 Βιολογικός Κύκλος	15
1.8.7 Αντιμετώπιση	16
1.8.8 Αντιμετώπιση σε καλλιέργειες σποροπαραγωγής	17
1.8.9 Αντιμετώπιση σε καλλιέργειες παραγωγής σποροφύτων	18
1.8.10 Αντιμετώπιση σε εμπορικές καλλιέργειες	18
1.8.11 Ολοκληρωμένη διαχείριση της ασθένειας	19
1.9 Γνωριμία με τα βακτήρια	21
1.10 Σκοπός της εργασίας	22
<i>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2</i>	23
<i>ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</i>	23
2.1 Εξαγωγή βακτηριακών στελεχών από τη συλλογή	24
2.2 Απομόνωση από σπορόφυτα καρπουζιάς	25

Ταυτοποίηση βακτηριακών απομονώσεων από κολοκυνθοειδή με κλασικές και μοριακές μεθοδολογίες	
2.3 Βιοχημική ταυτοποίηση των απομονώσεων	26
2.4 Δοκιμές παθογένειας	27
2.5 Μοριακή ταυτοποίηση απομονώσεων.....	28
2.5.1 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)	28
2.5.2 <i>rep</i> -PCR.....	30
2.5.3 Δημιουργία υγρής καλλιέργειας για απομόνωση DNA.....	31
2.5.4 Απομόνωση ολικού DNA από βακτηριακά κύτταρα	31
2.5.5 Ηλεκτροφόρηση απομονωμένου DNA σε πήκτωμα αγαρόζης	32
2.5.6 Φωτομέτρηση των δειγμάτων	32
2.6 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR)	33
2.6.1 Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για τις αντιδράσεις PCR.....	33
2.7 Αντιδράσεις PCR.....	33
2.7.1 BOX -PCR	33
2.7.2 <i>gyrB</i> -PCR.....	34
2.7.3 Επιβεβαίωση των προϊόντων της PCR με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1,2% w/v.....	35
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3	36
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	36
3.1 Χαρακτηρισμός απομονώσεων.....	37
3.2 Δοκιμές παθογένειας	40
3.3 Μοριακή ταυτοποίηση.....	44
3.3.1 Ανίχνευση απομονωμένων DNA σε πήκτωμα αγαρόζης.....	44
3.3.2 Αποτελέσματα της <i>rep</i> -PCR.....	45
3.3.3 Αποτελέσματα <i>gyrB</i> -PCR.....	47
3.3.4 Αποτελέσματα αλληλούχισης του γονιδίου <i>gyrB</i>	47
3.3.5 Αποτελέσματα της <i>rep</i> -PCR με βακτηριακά στελέχη από καρπουζιά.....	48
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4	50
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	50
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	53
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	56

Ταυτοποίηση βακτηριακών απομονώσεων από κολοκυνθοειδή με κλασικές και μοριακές μεθοδολογίες

Παρουσίαση εικονογραφημένης εργασίας: 26 ^ο Συνέδριο της Ελληνικής Εταιρείας της Επιστήμης των Οπωροκηπευτικών, Καλαμάτα, 15-18 Οκτωβρίου 2013	57
1. Περίληψη	57
2. Poster	57
3 Φωτογραφικό υλικό	60

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα πτυχιακή εργασία, ταυτοποιήθηκαν βακτηριακά στελέχη που απομονώθηκαν τα τελευταία χρόνια από καλλιέργειες κολοκυνθοειδών στην Κρήτη και διατηρούνται στην συλλογή του εργαστηρίου Βακτηριολογίας του ΤΕΙ Κρήτης. Τα βακτήρια απομονώθηκαν από υπαίθριες και θερμοκηπιακές καλλιέργειες, με σημαντικά ποσοστά προσβολής. Πρόκειται για στελέχη που απομονώθηκαν από καλλιέργειες αγγουριάς, πεπονιάς και καρπουζιάς και οι οποίες προκαταρκτικά βρέθηκαν να ανήκουν στα γένη *Pseudomonas* spp και *Acidovorax* spp.

Η ταυτοποίηση πραγματοποιήθηκε αρχικά με κλασικές βιοχημικές βακτηριολογικές δοκιμές και στην συνέχεια με μοριακές τεχνικές και μεθοδολογίες ενώ όλες οι απομονώσεις βρέθηκαν να είναι παθογόνες τουλάχιστον στον ξενιστή από τον οποίο απομονώθηκαν. Τα 24 στελέχη που εξετάστηκαν ομαδοποιήθηκαν σε τρεις ομάδες με την πρώτη ομάδα να περιλαμβάνει 14 στελέχη από αγγουριά και πεπονιά που ταξινομήθηκαν στο είδος *Pseudomonas syringae*, την δεύτερη ομάδα να περιλαμβάνει 6 στελέχη που ταξινομήθηκαν στο είδος *Pseudomonas viriflava* και την τρίτη ομάδα να περιλαμβάνει τέσσερα στελέχη από καρπουζιά και να ταξινομούνται στο είδος *Acidovorax citrulli*. Το βακτήριο *Acidovorax citrulli* αναφέρεται για πρώτη φορά ως παθογόνο αίτιο σε φυτά καρπουζιάς στην Κρήτη.

Ταυτοποίηση βακτηριακών απομονώσεων από κολοκυνθοειδή με κλασικές και μοριακές μεθοδολογίες

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΕΙΣΑΓΩΓΗ – ΣΗΜΑΝΤΙΚΕΣ ΒΑΚΤΗΡΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΑΔΘΕΝΕΙΕΣ ΚΟΛΟΚΥΝΘΟΕΙΔΩΝ

Βακτηριολογικές ασθένειες κολοκυνθοειδών

1.1 Γωνιώδης κηλίδωση

Η γωνιώδης κηλίδωση (angular leaf spot) των κολοκυνθοειδών, είναι μία γνωστή βακτηρίωση που εκδηλώνεται σε όλες τις περιοχές του κόσμου και διαπιστώθηκε πρώτη φορά στην χώρα μας προ μερικών ετών. Η ασθένεια εκδηλώνεται στα φύλλα, σε μίσχους, στελέχη και καρπούς αρχικά σαν μικρές υδατώδεις κηλίδες. Στα φύλλα, οι κηλίδες περιορίζονται μεταξύ των νευρώσεων και γίνονται τελικά γωνιώδεις νεκρωτικές, χρώματος καστανού και μεγέθους 7-8mm. Στο κέντρο των προσβεβλημένων ιστών, πολλές φορές σχηματίζονται σχισμές και έτσι δημιουργούνται «τρύπες από σκάγια». Σε συνθήκες υψηλής σχετικής υγρασίας στις κηλίδες που βρίσκονται στην κάτω μεριά των φύλλων, σχηματίζεται παχύρρευστη, διαφανής βακτηριακή έκκριση (μοιάζει με σταγόνα από δάκρυ), η οποία όταν ξεραθεί μοιάζει με υπόλευκη γυαλιστερή κρούστα (Εικόνα 1).

Στους καρπούς, οι κηλίδες είναι κυκλικές, διαμέτρου 5-8 mm και χρώματος ανοιχτού πράσινου μέχρι ελαφρώς χλωρωτικού. Στο κέντρο είναι λίγο βυθισμένες και έχουν χρώμα ανοιχτό καστανό. Αργότερα, γίνονται περισσότερο βυθισμένες (μοιάζουν με «κρατήρες»), καστανές, νεκρωτικές και περιβάλλονται από υδατώδες στενό περιθώριο. Στα προχωρημένα στάδια της προσβολής, είναι δυνατόν να εμφανιστεί υγρή σήψη των προσβεβλημένων περιοχών του καρπού.



Εικόνα 1. Γωνιώδης κηλίδωση αγγουριάς – βακτηριακό έκκριμα

1.1.1 Αίτιο- Συνθήκες ανάπτυξης

Η ασθένεια οφείλεται στο βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*. Είναι αερόβιο, ραβδοειδές, αρνητικό κατά Gram και έχει 1-5 πολικά μαστίγια. Παράγει

Ταυτοποίηση βακτηριακών απομονώσεων από κολοκυνθοειδή με κλασικές και μοριακές μεθοδολογίες

κυανοπράσινη φθορίζουσα χρωστική και σχηματίζει υπόλευκες αποικίες. Παρουσία γλυκόζης παρουσιάζει οξειδωτικό μεταβολισμό, δεν παράγει οξειδάση, ρευστοποιεί την ζελατίνη και δεν υδρολύει το άμυλο. Η άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης είναι 25-27 °C.

Το παθογόνο προσβάλλει την αγγουριά, την καρπουζιά, την πεπονια, την κολοκυθιά καθώς και άλλα κολοκυνθοειδή. Μεταδίδεται με τον σπόρο καθώς και με τα υπολείμματα της καλλιέργειας. Η διασπορά του μολύσματος γίνεται με την βροχή, την τεχνητή βροχή, τα έντομα, και με τα χέρια και τα ρούχα των εργαζομένων μέσα στις καλλιέργειες ιδιαίτερα όταν τα φυτά είναι υγρά. Η είσοδος του βακτηρίου γίνεται από τα φυσικά ανοίγματα και τις πληγές. Υγρός και βροχερός καιρός ευνοεί την ανάπτυξη της ασθένειας (Παναγόπουλος, 1995 & Γκούμας, 2006).

1.2 Βακτηριακή κηλίδωση

Η ασθένεια προκαλείται από το παθογόνο *Pseudomonas viridiflava*. Προσβάλλει καλλιέργειες αγγουριάς και πεπονιας προκαλώντας υδαρείς χλωρωτικές ή νεκρωτικές κηλίδες στα φύλλα και εκτεταμένα νεκρωτικά τμήματα συνήθως στις άκρες του ελάσματος και προκαλεί νέκρωση ελάσματος και μίσχου. Στο στέλεχος, σε έντονη προσβολή, προκαλεί σήψεις. Αναπτύσσεται σε συνθήκες υψηλής υγρασίας και ιδιαίτερα όταν στο φύλλωμα παραμένουν σταγόνες νερού για μεγάλο χρονικό διάστημα σε θερμοκρασία 10-25°C. Επιβιώνει σε φυτικά υπολείμματα και ζιζάνια και διασπείρεται με το νερό και τα εργαλεία. Το εύρος των ξενιστών είναι μεγάλο, ενώ συχνά επιβιώνει επιφυτικά (Κογκάκη, 2010 & Γκούμας, 1998).

Στις παραπάνω ασθένειες για την αντιμετώπισή τους προτείνεται:

- ✚ Χρήση υγιούς σπόρου και σποροφύτων.
- ✚ Επιλογή ανθεκτικών ή ανεκτικών υβριδίων στην γωνιώδη κηλίδωση.
- ✚ Αποφυγή καλλιεργητικών εργασιών όταν τα φυτά είναι υγρά.
- ✚ Περιορισμός υγρασίας και βελτίωση του αερισμού στο θερμοκήπιο.
- ✚ Ισορροπημένη λίπανση και αποφυγή υπερβολικών αζωτούχων λιπάνσεων
- ✚ Επέμβαση με χαλκούχα σκευάσματα.

1.3 Βακτηριακή σήψη και μετασυλλεκτικές σήψεις

Τα παθογόνα που εμπλέκονται στις ασθένειες είναι τα *Erwinia carotovora* ssp., *Dickeya chrysanthemi*, και *Pseudomonas* sp. Τα παθογόνα προσβάλλουν τα κολοκυνθοειδή

Ταυτοποίηση βακτηριακών απομονώσεων από κολοκυνθοειδή με κλασικές και μοριακές μεθοδολογίες

προκαλώντας κιτρίνισμα, μάρανση, σήψη και νέκρωση φύλλων και σήψη καρπών. Στα στελέχη προκαλεί κίτρινο, καστανό μεταχρωματισμό αγγείων, μάρανση, σήψη και νέκρωση. Και στις ρίζες μεταχρωματισμό αγγείων και σήψη. Οι συνθήκες ανάπτυξης χαρακτηρίζονται από υψηλή σχετική υγρασία και θερμοκρασία 10-30 °C. Επιβιώνει σε φυτικά υπολείμματα και ζιζάνια και διασπείρεται με το νερό και τα εργαλεία. Το εύρος ξενιστών είναι πολύ μεγάλο (Κογκάκη, 2010 & Γκούμας, 1987).

1.4 Βακτηριακή νέκρωση του φλοιού της καρπουζιάς

Η ασθένεια προκαλείται από το *Pantoea ananatis* και προσβάλλει την καρπουζιά και την πεπονιά. Στον καρπό, διακρίνουμε πολυάριθμες υδατώδεις κηλίδες με κίτρινο/καστανό κέντρο, φελλώδους δομής. Παρατηρούνται νεκρώσεις κατά θέσεις στην περιοχή του φλοιού, οι οποίες γίνονται αντιληπτές μετά την κοπή του καρπού. Οι συνθήκες ανάπτυξης της ασθένειας δεν έχουν μελετηθεί, γνωρίζουμε όμως ότι ορισμένα υβρίδια είναι πιο ευπαθή.

Για την αντιμετώπιση συστήνεται:

- ✚ Καταστροφή των μολυσμένων φυτών και των υπολειμμάτων της καλλιέργειας.
- ✚ Συστηματική καταστροφή των ζιζανίων μέσα και γύρω από την καλλιέργεια.
- ✚ Εφαρμογή αμυγμισποράς 1-2 χρόνων.
- ✚ Ψεκασμοί με χαλκούχα σκευάσματα σε συνδιασμό με mancozeb, ιδιαίτερα κατά τις περιόδους παρατεταμένης υγρασίας.
- ✚ Απολύμανση μέσων και εργαλείων. Η απολύμανση των εργαλείων γίνεται με εμβάπτιση σε οινόπνευμα ή σε διάλυμα φορμόλης 5% σε νερό ή σε χλωρίνη εμπορίου αραιωμένη κατά 10 φορές (Γκούμας, 2013).

1.5 Βακτηρίωση της πεπονιάς

Πρόκειται για μια ασθένεια της πεπονιάς που διαπιστώθηκε για πρώτη φορά το 1988 σε θερμοκήπια στο Τυμπάκι, Ηρακλείου Κρήτης. Το παθογόνο της ασθένειας είναι το *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* και προσβάλλει την πεπονιά και την καρπουζιά. Στα φύλλα παρατηρούνται νεκρωτικές κηλίδες ή νεκρωτικά τμήματα του ελάσματος που περιβάλλονται από έντονη και διάχυτη νεκρωτική ζώνη. Όταν η προσβολή εντοπίζεται στην περιφέρεια του φύλλου, παρατηρείται έντονο περίκαυμα με συστροφή του ελάσματος. Στο στέλεχος η προσβολή εκδηλώνεται αρχικά με μονόπλευρο, βαθύ πράσινο

Ταυτοποίηση βακτηριακών απομονώσεων από κολοκυνθοειδή με κλασικές και μοριακές μεθοδολογίες

μέχρι σκούρο καστανό μεταχρωματισμό του φλοιού, που σταδιακά περιβάλλει όλο το στέλεχος μέχρι την κορυφή του φυτού, η οποία νεκρώνεται. Οι προσβεβλημένοι ιστοί του στελέχους εμφανίζονται βυθισμένοι και συρρικνωμένοι. Τα φυτά μοιάζουν σαν «βρασμένα» και συχνά καταρρέουν. Υπάρχουν ενδείξεις ότι ψεκασμοί με χαλκούχα ελέγχουν την εξέλιξη της ασθένειας (Γκούμας, 1992 & 2003).

1.6 Καρκίνος

Η ασθένεια οφείλεται στο βακτήριο *Agrobacterium tumefaciens* που προσβάλλει τις ρίζες δημιουργώντας όγκους και ογκίδια. Επιβιώνει στο έδαφος, τα φυτικά υπολείμματα και τα ζιζάνια και διασπείρεται με το νερό και τα εργαλεία. Το εύρος των ξενιστών του είναι πολύ μεγάλο (Γκούμας, 2003)

1.7 Ριζομανία

Το παθογόνο που προκαλεί την ασθένεια είναι το *Agrobacterium rhizogenes* που προσβάλλει τις ρίζες και προκαλεί υπερβολική ανάπτυξη του ριζικού συστήματος με μορφή θυσσάνου (πολλές και λεπτές ρίζες). Επιβιώνει στο έδαφος, στα φυτικά υπολείμματα και τα ζιζάνια και διασπείρεται με τα εργαλεία. Το εύρος των ξενιστών είναι πολύ μεγάλο (Γκούμας, 2003).

Για την αντιμετώπιση συστήνεται:

- ✚ Απολύμανση εδάφους
- ✚ Ηλιοαπολύμανση
- ✚ Ανθεκτικές ποικιλίες (για τα περισσότερα είδη δεν υπάρχουν)
- ✚ Χημική αντιμετώπιση με χαλκούχα σκευάσματα που χρησιμοποιούνται στην αναλογία που συνιστά ο παρασκευαστής. Χρήσιμος είναι ο συνδυασμός με mancozeb.

1.8 Η ασθένεια της βακτηριακής κηλίδωσης της καρπουζιάς

Η ασθένεια της βακτηριακής κηλίδωσης της καρπουζιάς (Bacterial fruit blotch of cucurbits) προκαλείται από το παθογόνο βακτήριο *Acidovorax citrulli* (*Pseudomonas pseudoalcaligenes subsp. citrulli*) και προσβάλλει φυτά σε καλλιέργειες καρπουζιάς, πεπονιάς, αγγουριάς, κολοκυθιάς και άλλων κολοκυνθοειδών.

1.8.1 Ιστορική αναδρομή

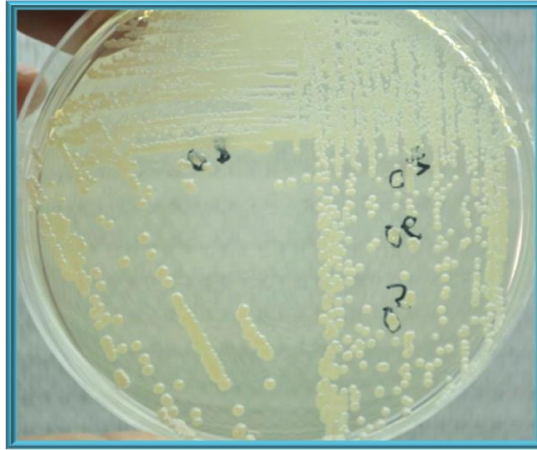
Η βακτηριακή κηλίδωση των καρπών είναι μία σημαντική ασθένεια που προσβάλλει κυρίως το καρπούζι και λιγότερο τα άλλα κολοκυνθοειδή. Παρατηρήθηκε αρχικά το 1965 στις ΗΠΑ σε φυτά καρπουζιάς και προκάλεσε συμπτώματα κηλιδώσεων σε σπορόφυτα. Μέχρι το 1988, συμπτώματα της ασθένειας παρατηρήθηκαν στα νησιά Μαριάννα (Βόρειος Ειρηνικός ωκεανός), το 1989 στην περιοχή της Φλόριντα και μεταξύ 1990-1995 συμπτώματα της ασθένειας είχαν εμφανιστεί σποραδικά στις σημαντικότερες πολιτείες των ΗΠΑ με μεγάλο οικονομικό αντίκτυπο. Αργότερα η ασθένεια εξαπλώθηκε στη Γεωργία, τη Νότια Καρολίνα, το Τέξας, το Ντελαγουέρ και σε άλλες πολιτείες. Η αιτία της αρχικής μόλυνσης ήταν ο προσβεβλημένος από το βακτήριο σπόρος.

Στην Ελλάδα, η πρώτη επίσημη ανακοίνωση της διαπίστωσης προσβολής καρπών και φυτών καρπουζιάς από το φυτοπαθογόνο βακτήριο έγινε το 2008. Νωρίτερα όμως, το 2005 είχαν σταλεί σε εργαστήριο δείγματα καρπών καρπουζιάς υβριδίου F1 Obla προερχόμενα από την περιοχή Χρυσούπολης Καβάλας και το 2006 από την περιοχή Βαγίων Θηβών, στα οποία είχαν διαπιστωθεί συμπτώματα πολύ μικρών, ακανόνιστων, ελαιωδών κηλίδων και καστανών ρωγμών στην επιφάνειά τους. (Χολέβα και συν., 2008). Την ίδια χρονική περίοδο το παθογόνο απομονώθηκε από σπορόφυτα καρπουζιάς από την Ιεράπετρα στην Κρήτη (Γκούμας, προσωπική επικοινωνία).

1.8.2 Το παθογόνο βακτήριο

Το βακτήριο *Acidovorax Citrulli* ανήκει στην κλάση *Proteobacteria*, στην οικογένεια *Pseudomonadaceae*. Τα βακτήρια του γένους *Acidovorax* είναι αρνητικά κατά Gram, αερόβια, ραβδόμορφα, με διαστάσεις κατά μέσο όρο 0,5-1.7 μm, κινούμενα με ένα πολικό μαστίγιο (Schaad *et al.*, 1978; Willems *et al.*, 1992). Είναι θετικά στην οξειδάση, και αναπτύσσονται σε θερμοκρασία 4-41°C σε διάφορα θρεπτικά υποστρώματα. Μετά από 48 ώρες ανάπτυξης στο θρεπτικό υπόστρωμα King's B, παράγουν επίπεδες, στρογγυλές, υπόλευκου χρώματος, μη φθορίζουσες αποικίες. (Εικόνα 2, 37 & 38)).

Ταυτοποίηση βακτηριακών απομονώσεων από κολοκυνθοειδή με κλασικές και μοριακές μεθοδολογίες



Εικόνα 2. Αποικίες του βακτηρίου σε θρεπτικό υπόστρωμα King's B

1.8.3 Στοιχεία επιδημιολογίας

Η σημαντικότερη πηγή μόλυσματος για την εξέλιξη της βακτηρίωσης είναι ο μολυσμένος σπόρος. Οι σπόροι των περισσότερων, αν όχι όλων, των κολοκυνθοειδών, μπορούν να υποστούν προσβολή από το παθογόνο και να μεταδώσουν την ασθένεια της βακτηριακής κηλίδωσης. Η άμεση σπορά με τον μολυσμένο σπόρο έχει σαν αποτέλεσμα την μετάδοση και την εξάπλωση της βακτηρίωσης στα σπορόφυτα, ιδιαίτερα όταν οι συνθήκες του περιβάλλοντος είναι ιδανικές. Δηλαδή, η μετάδοση της ασθένειας εξαρτάται άμεσα από τις κλιματολογικές συνθήκες όπως την υψηλή σχετική υγρασία και τις υψηλές θερμοκρασίες καθώς και την πυκνή φύτευση. Αν και ο ακριβής μηχανισμός μετάδοσης της ασθένειας δεν έχει ακόμα απόλυτα εξακριβωθεί, γνωρίζουμε ότι τα βακτήρια μετακινούνται από τους σπόρους στους φυτικούς ιστούς όπου πολλαπλασιάζονται στους μεσοκυττάριους χώρους και δημιουργούν υδαρείς κηλίδες, στις κοτυληδόνες και στα φύλλα των φυτών. Από εκεί τα βακτήρια διασπείρονται με την άρδευση στα μεταφυτεμένα σπορόφυτα και δημιουργούν δευτερογενείς μολύνσεις οι οποίες οδηγούν σε μαζικές μολύνσεις στα φυτώρια. Ακόμα και όταν υπάρχει απουσία συμπτωμάτων οι επιφυτικοί πληθυσμοί του βακτηρίου μπορεί να προκαλέσουν συμπτώματα της ασθένειας στον αγρό κάτω από ιδανικές συνθήκες. Τα βακτήρια διασπείρονται με τον άνεμο, την βροχή και το νερό άρδευσης στα γειτονικά φυτά προκαλώντας έτσι υδαρείς κηλίδες που στην συνέχεια γίνονται νεκρωτικές. Τα παθογόνα διεισδύουν στα κοτυληδόνες και στα φύλλα μέσω των στοματίων και των πληγών και παραμένουν στους μεσοκυττάριους χώρους του μολυσμένου ιστού.

Όσον αφορά τις μολύνσεις στους καρπούς, τα βακτήρια προσκωλλούνται πάνω στον φλοιό δύο με τρεις εβδομάδες μετά την άνθηση και μέσω των ανοιχτών στοματίων

Ταυτοποίηση βακτηριακών απομονώσεων από κολοκυνθοειδή με κλασικές και μοριακές μεθοδολογίες

μολύνουν τους καρπούς. Μετά την περίοδο αυτή, τα στομάτια κλείνουν από την παρουσία κηρωδών ουσιών στην επιφάνεια των καρπών, εμποδίζοντας κατ'αυτό τον τρόπο την περαιτέρω είσοδο βακτηρίων. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα οι ώριμοι καρποί να μην μπορούν γενικότερα να προσβληθούν από φυσική μόλυνση των βακτηρίων εκτός αν υποστούν πληγές. Ακόμη, μολύνσεις σε καρπούς μπορεί να προκληθούν από μόλυσμα που προέρχεται από φυτικά υπολείμματα, φυτά –ξενιστές και ζιζάνια. Κατά τα πρώτα στάδια ανάπτυξης των καρπών, τα συμπτώματα της ασθένειας δεν είναι ευδιάκριτα ή δεν εμφανίζονται καθόλου, αλλά παρουσιάζονται ξαφνικά λίγο πριν ή κατά την διάρκεια της περιόδου συγκομιδής. Επιφανειακές κηλίδες εξαπλώνονται με ταχύ ρυθμό και συχνά οι καρποί μπορεί να σαπίσουν στον αγρό. Σε νεαρά φυτά μπορεί να παρατηρηθούν κηλίδες και στο υποκοτύλιο προκαλώντας ενδεχομένως κατάρρευση και θάνατο των σπορόφυτων. Παρόμοια συμπτώματα μπορεί να εμφανιστούν και στο πεπόνι καθώς και σε άλλα κολοκυνθοειδή. Στα ώριμα φυτά καρπουζιάς, εμφανίζονται κηλίδες στα φύλλα καστανού έως καστανοκόκκινου χρώματος, οι οποίες εξαπλώνονται κατά μήκος των νευρώσεων. Ορισμένες φορές υπάρχει πιθανότητα οι κηλίδες αυτές να είναι δυσδιάκριτες ή να μην διαφοροποιούνται από εκείνες που προκαλούνται από άλλες ασθένειες φυλλώματος.

Στους καρπούς η προσβολή γίνεται κατά τη διάρκεια των 3-4 πρώτων εβδομάδων από την γονιμοποίηση. Το βακτήριο εισέρχεται μέσω των στομάτων και τα συμπτώματα εμφανίζονται κατά την ωρίμανση, λίγο πριν την συγκομιδή. Καθώς οι βακτηριακές κηλίδες αναπτύσσονται στην επιφάνεια του εξωκάρπιου, τα συμπτώματα εμφανίζονται προοδευτικά στους καρπούς.

Μερικά από τα συμπτώματα που μπορούμε να παρατηρήσουμε είναι τα νεκρωτικά έλκη πάνω στον καρπό, οι υδαρείς περιοχές με ακανόνιστο περιθώριο στην επιφάνεια του καρπού και τέλος σε προχωρημένο στάδιο οι καρποί μπορεί να καταλήξουν σε υγρή σήψη, λόγω των δευτερευόντων μολύνσεων από άλλους οργανισμούς. (Κογκάκη, 2010).

1.8.4 Ξενιστές και Γεωγραφική Κατανομή

Πριν από το τέλος της δεκαετίας του '90, η εμφάνιση της ασθένειας αναφέρθηκε αρχικά στο καρπούζι σε όλες τις κεντρικές, ανατολικές και νοτιοανατολικές πολιτείες των ΗΠΑ συμπεριλαμβανομένων της Φλόριντας, του Τέξας, της Γεωργίας, της νότιας Καρολίνα, της βόρειας Καρολίνα, του Ιλλινόι, της Αϊόβα, του Μισσούρι, του Ντελαγουέρ, του Όρεγκον και της Οκλαχόμα Γενικά, η ασθένεια περιορίστηκε σε

Ταυτοποίηση βακτηριακών απομονώσεων από κολοκυνθοειδή με κλασικές και μοριακές μεθοδολογίες

περιοχές με υψηλή θερμοκρασία και υγρασία και δεν παρατηρήθηκε στις πιο δροσερές και ξηρές περιοχές συμπεριλαμβανομένης της Καλιφόρνιας. Η ασθένεια έχει αναφερθεί: στις ΗΠΑ σε κολοκύθι, σε πεπόνι και σε αγγούρι, στον Καναδά στο καρπούζι, στην Αυστραλία στο καρπούζι, στο πεπόνι και στο αγγούρι, στο Μεξικό, την Ονδούρα, τη Βραζιλία, τη Νικαράγουα και την Κόστα Ρίκα στο καρπούζι και το πεπόνι, στην Ταϊβάν στο πεπόνι και το καρπούζι, στην Τουρκία στο καρπούζι, στην Ιαπωνία στο καρπούζι, στην Ταϊλάνδη στο καρπούζι και στην Κίνα στο πεπόνι τύπου Hami και στο καρπούζι.

Έχει αναφερθεί ότι το *Acidovorax citrulli* έχει απομονωθεί από σπόρο τομάτας στο Ισραήλ και έχει προκαλέσει συμπτώματα της ασθένειας σε διάφορους ξενιστές σολανωδών μετά από τεχνητή μόλυνση. Το παγκόσμιο εμπόριο σπόρων κολοκυνθοειδών, πιθανότατα συμβάλλει στην εκτεταμένη εξάπλωση των στελεχών του βακτηρίου ((Burdman S. & Walcott R, 2012).

1.8.5 Συμπτώματα και σημεία

Το παθογόνο έχει ένα ευρύ φάσμα ξενιστών στην οικογένεια Cucurbitaceae και μπορεί να προσβάλλει τα φύλλα και τους καρπούς σε όλα τα στάδια της ανάπτυξης τους. Τα συμπτώματα που παρατηρούνται κατά τη διάρκεια της μόλυνσης στα φύλλα και στους καρπούς είναι πολύ δύσκολο να εντοπιστούν στον αγρό και συχνά συγχέονται με άλλες ασθένειες φυλλώματος πιο γνωστές και πιο διαδεδομένες.

Ένα από τα πρώτα συμπτώματα της ασθένειας στα νεαρά φυτά είναι οι υδαρείς κηλίδες ανοιχτού καφέ ως καστανοκόκκινου χρώματος στην κάτω επιφάνεια των κοτυληδόνων και των πρώτων πραγματικών φύλλων (Εικόνα 3), οι οποίες γίνονται ορατές στο φυτώριο και συχνά 5-8 μέρες μετά την μεταφύτευση ανάλογα με τις περιβαλλοντικές συνθήκες. Οι κηλίδες αυτές αρχικά είναι υδαρείς, στη συνέχεια γίνονται νεκρωτικές και περιορίζονται κυρίως μεταξύ των δευτερευόντων νευρώσεων.

Ταυτοποίηση βακτηριακών απομονώσεων από κολοκυνθοειδή με κλασικές και μοριακές μεθοδολογίες



Εικόνα 3. Τυπικά συμπτώματα προσβολής από το παθογόνο *Acidovorax citrulli* σε σπορόφυτα καρπουζιάς

1.8.6 Βιολογικός Κύκλος

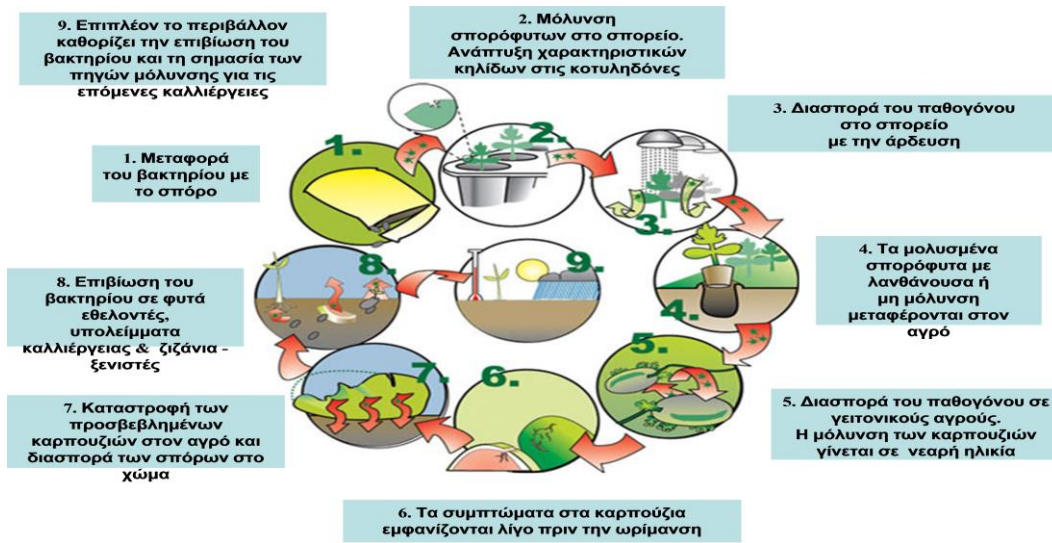
Ο βιολογικός κύκλος της βακτηριακής κηλίδωσης των καρπών της καρπουζιάς ξεκινάει από τον μολυσμένο σπόρο. Ο μολυσμένος σπόρος σπέρνεται σε πλαστικούς δίσκους μέσα στο φυτώριο όπου το περιβάλλον θεωρείται άριστο για τη διάδοση του βακτηρίου. Οι υψηλές θερμοκρασίες και η υψηλή σχετική υγρασία που επικρατούν μέσα σ' αυτό αποτελούν τις κατάλληλες προϋποθέσεις για την ανάπτυξη του. Αργότερα, με την μετακίνηση των μολυσμένων σπόρων από το θερμοκήπιο στον αγρό μπορεί να υπάρξουν σοβαρές επιπτώσεις.

Το παθογόνο της ασθένειας δεν μπορεί να επιβιώσει για περισσότερο από μερικές εβδομάδες κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού χωρίς ξενιστή. Τα βακτήρια μπορούν να διαχειμάσουν σε μολυσμένους φυτικούς ιστούς ή σε μολυσμένους σπόρους οι οποίοι είναι ικανοί να παράγουν φυτά-εθελοντές για την επόμενη καλλιεργητική περίοδο.

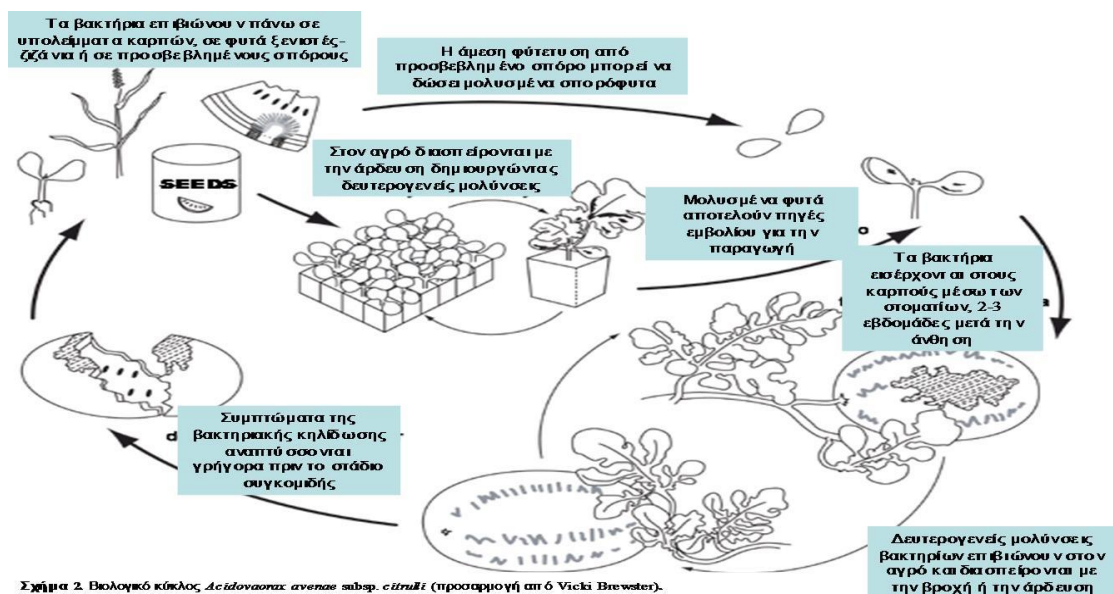
Μερικές ποικιλίες καρπουζιάς είναι πιο ευπαθείς στο βακτήριο από άλλες. Για παράδειγμα, οι ποικιλίες με σκούρο-πράσινο χρώμα στο φλοιό είναι λιγότερο ευπαθείς από ποικιλίες με ελαφρύ-πράσινο χρώμα του φλοιού. Ένα άλλο παρόμοιο παράδειγμα είναι τα τριπλοειδή καρπούζια χωρίς σπέρματα, τα οποία είναι λιγότερο ευπαθή από τα διπλοειδή πεπόνια. Η βακτηριακή κηλίδωση καρπών έχει αναφερθεί ότι μολύνει το πεπόνι και την τομάτα, αλλά ο πιο συνήθης ξενιστής της είναι το καρπούζι. (Κογκάκη, 2010).

Ο βιολογικός κύκλος της βακτηριακής κηλίδωσης καρπών παρουσιάζεται παρακάτω στα σχήματα 1 και 2.

Ταυτοποίηση βακτηριακών απομονώσεων από κολοκυνθοειδή με κλασικές και μοριακές μεθοδολογίες



Σχήμα 1. Βιολογικός κύκλος του *Acidovorax citrulli*



Σχήμα 2. Βιολογικό κύκλος *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* (προσαρμογή απ' ό Vicki Brewster).

Σχήμα 2. Βιολογικός κύκλος του *Acidovorax citrulli*

1.8.7 Αντιμετώπιση

Η αποτελεσματική αντιμετώπιση της ασθένειας βασίζεται στην καταστροφή του αρχικού μολύσματος, σε καλλιεργητικές τεχνικές και στη χρήση χαλκούχων σκευασμάτων, εφόσον δεν υπάρχουν εμπορικές ποικιλίες ανθεκτικές στο βακτήριο. Η βακτηρίωση δεν

Ταυτοποίηση βακτηριακών απομονώσεων από κολοκυνθοειδή με κλασικές και μοριακές μεθοδολογίες

είναι δυνατόν να αντιμετωπιστεί με ένα μόνο τρόπο αντιμετώπισης, άλλα με συνδυασμένη αντιμετώπιση.

Από πειράματα και δεδομένα προκύπτει ότι τα χαλκούχα φυτοπροστατευτικά μπορούν να μειώσουν την εμφάνιση της ασθένειας, όταν εφαρμόζονται σε εβδομαδιαία βάση, στη συνιστώμενη δοσολογία πριν την εμφάνιση των συμπτωμάτων. Αποτυγχάνουν όμως, να μειώσουν την ένταση της ασθένειας γιατί δρουν αποκλειστικά στα σημεία όπου εφαρμόζονται. Είναι πιθανό το βακτήριο να επιζήσει και να πολλαπλασιαστεί σε επιφάνειες του φυτού που δεν ψεκάστηκαν. Ακόμα, η συχνή εφαρμογή των χαλκούχων σκευασμάτων μπορεί να προκαλέσει την ανάπτυξη ανθεκτικών στελεχών του βακτηρίου.

Πειράματα σε θερμοκήπιο με τους επαγωγείς αντοχής acibenzolar-S-methyl (Actigard) και harpin EA (Messenger) έδωσαν καλά αποτελέσματα. Σύμφωνα με τον Isakeit (2002), απαιτούνται περισσότερα πειράματα προκειμένου να διασαφηνιστεί η σωστή δοσολογία των σκευασμάτων για την επίτευξη υψηλής αποτελεσματικότητας και αποφυγή φυτοτοξικότητας.

1.8.8 Αντιμετώπιση σε καλλιέργειες σποροπαραγωγής

Για την σωστή αντιμετώπιση του βακτηρίου θα πρέπει να χρησιμοποιούνται υγιείς σπόροι και σπορόφυτα, απαλλαγμένα από το παθογόνο. Αν και δύσκολο να διασφαλιστεί αυτό, ο φυτοϋγειονομικός έλεγχος των σπόρων, μειώνει τον κίνδυνο εξάπλωσης της ασθένειας. Προς το παρόν η κοινή μέθοδος ελέγχου της ασθένειας που ακολουθείται είναι η σπορά 10.000-30.000 σπόρων από κάθε παρτίδα, σε συνθήκες ευνοϊκές για την εμφάνιση της βακτηρίωσης. Έπειτα από 18 ημέρες τα σπορόφυτα ελέγχονται για τυχόν εμφανή συμπτώματα της ασθένειας.

Για την αποφυγή προσβολής του σπόρου, οι καλλιέργειες σποροπαραγωγής γίνονται σε ξηρά και δροσερά κλίματα και σε περιοχές που δεν έχει εμφανιστεί η ασθένεια προηγουμένως. Πρέπει να γίνεται αμειψισπορά με φυτά εκτός των κολοκυνθοειδών για 3-5 χρόνια. Οι καλλιέργειες ελέγχονται για τυχόν προσβολές από το βακτήριο και χρησιμοποιούνται, όπως προαναφέρθηκε, μόνο οι υγιείς σπόροι. Χημικοί ή άλλοι τρόποι που να είναι αποτελεσματικοί για την εξάλειψη του παθογόνου στο σπόρο δεν υπάρχουν. Η θερμοθεραπεία, η ζύμωση, η εφαρμογή οξειδίου χλωριούχου νατρίου, υδροχλωρικού οξέος και υπεροξικού οξέος στο σπόρο, μειώνουν σημαντικά τη μετάδοση της ασθένειας στα σπορόφυτα, επιδρούν όμως αρνητικά στις φυσιολογικές λειτουργίες του σπόρου, μειώνοντας την φυτρωτική του ικανότητα. Η αποτελεσματικότητα των παραπάνω

Ταυτοποίηση βακτηριακών απομονώσεων από κολοκυνθοειδή με κλασικές και μοριακές μεθοδολογίες

εφαρμογών περιορίζεται στο εξωτερικό του σπόρου. Οι εφαρμογές στους σπόρους δεν διασφαλίζουν την παρεμπόδιση της μετάδοσης στα σπορόφυτα και θα πρέπει πάντα να συνδυάζονται με άλλους τρόπους αντιμετώπισης.

1.8.9 Αντιμετώπιση σε καλλιέργειες παραγωγής σποροφύτων

Στο χωράφι, για καλλιέργεια, πρέπει να χρησιμοποιούνται μόνο σπόροι υγιείς και απαλλαγμένοι από το παθογόνο. Για να αποφευχθούν δευτερογενείς μολύνσεις συνιστάται απολύμανση των χώρων, επαρκής λίπανση και εφαρμογή φυτοπροστατευτικών προϊόντων.

Η μεταφορά εξοπλισμού από το ένα θερμοκήπιο στο άλλο δεν συνιστάται και οι σπόροι που προέρχονται από διαφορετικές παρτίδες πρέπει να φυτεύονται σε διαφορετικά θερμοκήπια ή να οριοθετούνται με πλαστικά ύψους 60cm. Η άρδευση που θα πρέπει να προτιμάται είναι η στάγδην.

Ο έγκαιρος εντοπισμός της προσβολής στην καλλιέργεια είναι πολύ σημαντικός και διασφαλίζεται με την πραγματοποίηση συχνών μακροσκοπικών ελέγχων των φυτών της καλλιέργειας. Το παθογόνο είναι πιθανό να επιβιώσει σε φυτά που δεν παρουσιάζουν συμπτώματα, γι' αυτό όλα τα σπορόφυτα που προήλθαν από καλλιέργειες στις οποίες είχε εμφανιστεί η ασθένεια, πρέπει να απομακρύνονται και να καταστρέφονται. Τα σπορόφυτα ψεκάζονται συστηματικά με χαλκούχα σκευάσματα. Η μείωση της σχετικής υγρασίας επιτυγχάνεται με τη βελτίωση αερισμού του θερμοκηπίου. Τέλος, όταν η παραγωγή των σποροφύτων ολοκληρωθεί οι χώροι πρέπει να απολυμαίνονται καλά και να παραμένουν για 2-3 εβδομάδες ανέπαφοι πριν την επαναφύτευση με κολοκυνθοειδή.

1.8.10 Αντιμετώπιση σε εμπορικές καλλιέργειες

Στις εμπορικές καλλιέργειες για την αποφυγή της ασθένειας, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται σπόροι απαλλαγμένοι από το παθογόνο και αν εκδηλωθεί η ασθένεια για 3 χρόνια θα πρέπει να γίνεται εναλλαγή καλλιεργειών με φυτά τα οποία δεν είναι ξενιστές του παθογόνου. Το χωράφι θα πρέπει να οργώνεται βαθιά στο τέλος κάθε καλλιεργητικής περιόδου ώστε να γίνεται ενσωμάτωση των φυτικών υπολειμμάτων της προηγούμενης καλλιέργειας. Οι νέες καλλιέργειες με κολοκυνθοειδή πρέπει να εγκαθίστανται όσο το δυνατόν πιο μακριά από τις περιοχές που παλαιότερα είχαν εντοπιστεί συμπτώματα της ασθένειας. Ζιζάνια και ξενιστές που αποτελούν φυτά-εθελοντές για την μετάδοση της ασθένειας πρέπει να καταστρέφονται σε περιοχές όπου καλλιεργούνται κολοκυνθοειδή.

Ταυτοποίηση βακτηριακών απομονώσεων από κολοκυνθοειδή με κλασικές και μοριακές μεθοδολογίες

Τέλος, προληπτικοί ψεκασμοί πρέπει να εφαρμόζονται κάθε 2 εβδομάδες με χαλκούχα σκευάσματα ξεκινώντας από την περίοδο της άνθησης έως την περίοδο της ωρίμανσης των καρπών. Σε περίπτωση που υπάρξει προσβολή στα φυτάρια οι ψεκασμοί πρέπει να γίνονται κάθε εβδομάδα (Κογκάκη, 2010).

1.8.11 Ολοκληρωμένη διαχείριση της ασθένειας

Στα πλαίσια της ολοκληρωμένης διαχείρισης είναι απαραίτητη η προστασία των σπορόφυτων από την ασθένεια. Για να περιοριστούν τα συμπτώματα της ασθένειας θα πρέπει να ληφθούν μέτρα για την καταστροφή των μολυσμένων φυτών στο θερμοκήπιο ή στο χωράφι. Ακόμα, οι εργασίες που γίνονται πρέπει να είναι πολύ προσεκτικές και είναι πάντα απαραίτητη η χρήση γαντιών. Τα εργαλεία που χρησιμοποιούνται για την καλλιέργεια πρέπει να απολυμαίνονται και γενικά πρέπει να αποφεύγεται η μεταφορά αυτών μεταξύ των θερμοκηπίων. Με το τέλος κάθε καλλιεργητικής περιόδου και για αποφυγή της επιβίωσης των παθογόνων στους αγρούς, όλα τα φυτικά υπολείμματα πρέπει να οργωθούν, να ενσωματωθούν στο έδαφος και να καταστραφούν.

Η σωστή επιλογή της περιοχής φύτευσης, οι κατάλληλες περιβαλλοντικές συνθήκες και η διαθεσιμότητα για εργασία είναι μερικά από τα κριτήρια που λαμβάνονται υπόψη στην ολοκληρωμένη διαχείριση της ασθένειας. Απαραίτητος είναι πάντα ο μακροσκοπικός έλεγχος και πραγματοποιείται από το διάστημα της έναρξης της παραγωγής ως το διάστημα της συγκομιδής. Οι αγροί όπου καλλιεργούνται τα σπορόφυτα θα πρέπει να βρίσκονται σε περιοχές με θερμά, έως ξηρά κλίματα. Επιπλέον, οι αγροί αυτοί δεν πρέπει να περιλαμβάνουν στο καλλιεργητικό ιστορικό τους προηγούμενη παραγωγή κολοκυνθοειδών, έτσι ώστε να μειώνεται ο κίνδυνος μετάδοσης του μολύσματος από τη μια καλλιεργητική περίοδο στην επόμενη.

Στην ολοκληρωμένη διαχείριση σπουδαίο ρόλο παίζει η χρήση υγιών σπόρων, απαλλαγμένων από ασθένειες. Το επίπεδο ανοχής είναι ένας μολυσμένος σπόρος σε 30.000 σπόρους. Το αντίστοιχο επίπεδο στα σπορόφυτα είναι το μηδενικό. Ακόμα, θα πρέπει να γίνεται εξέταση της φυτοϋγείας του σπόρου. Οι σπόροι φυτεύονται στο θερμοκήπιο σε διαφανή πλαστικά κιβώτια, σε συνθήκες ευνοϊκές για την ανάπτυξη της βακτηριακής κηλίδωσης (>70% σχετική υγρασία και 24-35°C). Δεκαοχτώ ημέρες μετά την ανάπτυξη τους τα σπορόφυτα επιθεωρούνται οπτικά για τυχόν εμφανή συμπτώματα του παθογόνου. Η δοκιμή αυτή διαρκεί 2-3 εβδομάδες και απαιτεί θερμοκήπια στα οποία είναι δυνατόν να

Ταυτοποίηση βακτηριακών απομονώσεων από κολοκυνθοειδή με κλασικές και μοριακές μεθοδολογίες

ελέγχεται ο χώρος τους ως προς τις περιβαλλοντικές συνθήκες που επικρατούν καθώς και να υπάρχει έμπειρο προσωπικό για την σωστή επιθεώρηση.

Το παθογόνο έχει τη δυνατότητα να επιβιώνει στο περίβλημα των σπόρων σε αποθήκευση ή και στο έμβρυο για περισσότερα από οκτώ έτη (Rane & Latin, 1992). Οι επεμβάσεις με ζεστό νερό εφαρμόζονται συνήθως για την αδρανοποίηση των παθογόνων στους σπόρους. Οι σπόροι επωάζονται σε 50-55°C για 10 ως 30 λεπτά, συνθήκες οι οποίες είναι κατάλληλες για να θανατώσουν το παθογόνο χωρίς όμως να επηρεάζουν την φυσιολογική λειτουργία του σπόρου. Η αποτελεσματικότητα της θερμοθεραπείας εξαρτάται από τη δυνατότητα των βακτηρίων να εκτίθενται ομοιόμορφα στην κρίσιμη θερμοκρασία που τα θανατώνει την καθορισμένη χρονική περίοδο. Ανάλογα με το μέγεθος του δείγματος που εξετάζεται κάθε φορά, είναι δύσκολο να εξασφαλιστεί ότι όλοι οι σπόροι λαμβάνουν την απαραίτητη έκθεση στην κρίσιμη αυτή θερμοκρασία. Επομένως, η εξόντωση των βακτηρίων στους σπόρους με τη θερμοθεραπεία δεν εξασφαλίζεται πλήρως.

Μια άλλη διαδικασία που χρησιμοποιείται είναι αυτή της ζύμωσης του σπόρου. Οι πρόσφατα συγκομισμένοι σπόροι επωάζονται σε χυμό καρπουζιού για 24 έως 48 ώρες και στη συνέχεια ξεπλένονται και ξηραίνονται. Η μικροχλωρίδα που αναπτύσσεται σε αναερόβιες συνθήκες και οι μεταβολίτες της ζύμωσης, θανατώνουν τα προσβεβλημένα από την ασθένεια κύτταρα που βρίσκονται πάνω και μέσα στους σπόρους. Αποδείχθηκε ότι η ζύμωση δεν επέφερε επιπτώσεις στη βλάστηση του σπόρου, αντιθέτως την βελτίωσε μετά από 6 μήνες αποθήκευσής του. Επιπρόσθετα, έχουν αξιολογηθεί χημικές επεμβάσεις σπόρων με HCL 1%, CaOCl και NaOCl με διάφορα στελέχη του βακτηρίου. Η επέμβαση με 0.5-1% NaOCl ή CaOCl για 15 έως 20 λεπτά μειώνει τη μετάδοση της ασθένειας στα σπορόφυτα (Hopkins *et al.*, 1996 Rane & Latin, 1992). Από τη μια, οι Hopkins *et al.* (1996) ανέφεραν ότι η επεξεργασία σπόρου με το HCL 1% για 15 λεπτά είχε σαν αποτέλεσμα την αποφυγή της μόλυνσης στα σπορόφυτα και από την άλλη, οι Rane & Latin (1992) διαπίστωσαν ότι η μετάδοση της ασθένειας στα σποροφύτα απλά μειώθηκε, από την έκθεση σε 1.8% HCL για 5 λεπτά. Ο Hopkins συστήνει τον συνδυασμό της ζύμωσης με την χημική επεξεργασία με HCL ή CaOCl και θεωρεί ότι είναι ο αποτελεσματικότερος τρόπος για την αντιμετώπιση της ασθένειας.

Τέλος, μέχρι σήμερα δεν έχουν βρεθεί ποικιλίες ή υβρίδια που να παρουσιάζουν ανοχή στη βακτηριακή κηλίδωση (Κογκάκη, 2010).

1.9 Γνωριμία με τα βακτήρια

Τα βακτήρια αποτελούν ένα μεγάλο κλάδο των προκαρυωτικών μικροοργανισμών. Πρόκειται για μονοκύτταρους (σπάνια πολυκύτταρους) μικροσκοπικούς οργανισμούς που συναντώνται σε πολύ μεγάλους πληθυσμούς σε κάθε είδους βίοτοπο. Έχουν μέγεθος μερικά μικρόμετρα (0.5-5μm) και ποικίλα σχήματα. Τα περισσότερα είναι τριών μορφών: σφαιρικού (coccus),ραβδοειδούς (bacillus) και σπειροειδούς (spirillum).Στα προκαρυωτικά κύτταρα το DNA υπάρχει μια μορφή δίκλωνου μορίου (βακτηριακό χρωμόσωμα) που συσσωματώνεται και σχηματίζει μια ορατή μάζα που ονομάζεται πυρηνοειδές. Το μεγαλύτερο μέρος των προκαρυωτών φέρουν μόνο ένα χρωμόσωμα, κάτι που από γενετικής άποψης τους καθιστά απλοειδείς οργανισμούς, καθώς φέρουν ένα μοναδικό αντίτυπο κάθε γονιδίου. Επίσης, περιέχουν μικρές ποσότητες μη χρωμοσωμικού DNA,σε κυκλική μορφή, που ονομάζονται πλασμίδια.

Τα βακτήρια διακρίνονται σε αρνητικά κατά Gram στα οποία τα μόρια πεπτιδογλυκάνης βρίσκονται τοποθετημένα σε μία στοιβάδα και σε θετικά κατά Gram βακτήρια όπου τα μόρια πεπτιδογλυκάνης βρίσκονται σε πολλαπλές αλληλοεπικαλυπτόμενες στοιβάδες. Βρίσκονται στα περισσότερα περιβάλλοντα (έδαφος, νερό, οργανική ύλη, ζωντανούς ιστούς, ραδιενεργά και τοξικά απόβλητα), ενώ τυπικά φαίνεται να υπάρχουν περισσότερα από 40 εκατ. βακτηριακά κύτταρα σε κάθε γραμμάριο εδάφους και 1 εκατ. κύτταρα σε κάθε ml φρέσκου νερού. Μεγάλο μέρος των βακτηρίων υπολογίζεται ότι δεν έχουν ταυτοποιηθεί ενώ μόνο τα μισά φύλλα από τα διάφορα είδη βακτηρίων μπορούν να καλλιεργηθούν σε συνθήκες εργαστηρίου (Αδαμοπούλου, 2012).

Το γένος *Pseudomonas* ανήκει στα γ-πρωτεοβακτήρια στην οικογένεια *Pseudomonaceae* και περιλαμβάνει από 191 είδη που εμφανίζουν τα παρακάτω χαρακτηριστικά. Είναι ραβδόμορφα, αρνητικά κατά Gram, με ένα ή περισσότερα πολικά μαστίγια, αερόβια και μη σποριογόνα. Μέχρι και σήμερα, έχουν βρεθεί περίπου 18 φυτοπαθογόνα βακτήρια του γένους *Pseudomonas* που εμφανίζουν μεγάλη εξειδίκευση ως προς τον ξενιστή και διαχωρίζονται με βάση τις αντιδράσεις στην οξειδάση. Εξαιτίας της μεγάλης γενετικής ποικιλομορφίας των φυτοπαθόνων βακτηρίων του γένους *Pseudomonas*, η συμπτωματολογία της ασθένειας στα φυτά ποικίλλει. Μπορεί να παρουσιαστούν νεκρωτικές κηλίδες, νεκρωτικά τμήματα, έλκη ή και νεκρωτικό μαρασμό, μέχρι σήψεις, υπερπλασίες και αδροβακτηριώσεις. (Αδαμοπούλου Κ. Μαρία, 2012).

1.10 Σκοπός της εργασίας

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η ταυτοποίηση βακτηριακών απομονώσεων τα οποία υπήρχαν στην συλλογή του εργαστηρίου Βακτηριολογίας του ΤΕΙ Κρήτης και είχαν προκαταρκτικά χαρακτηριστεί να ανήκουν στο γένος *Pseudomonas* spp. αλλά και ο χαρακτηρισμός βακτηριακών απομονώσεων από σπορόφυτα καρπουζιάς με συμπτώματα βακτηριακής κηλίδωσης. Στο πλαίσιο αυτό εφαρμόστηκαν τόσο κλασσικές όσο και μοριακές τεχνικές και μεθοδολογίες ενώ ελέγχθηκε το εύρος των ξενιστών των απομονώσεων με τεχνητές μολύνσεις σε διάφορους ξενιστές.

Ταυτοποίηση βακτηριακών απομονώσεων από κολοκυνθοειδή με κλασικές και μοριακές μεθοδολογίες

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Ταυτοποίηση βακτηριακών απομονώσεων από κολοκυνθοειδή με κλασικές και μοριακές μεθοδολογίες

2.1 Εξαγωγή βακτηριακών στελεχών από τη συλλογή

Τα βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία προέρχονται από τη συλλογή του εργαστηρίου Βακτηριολογίας του Τ.Ε.Ι. Κρήτης. Με τη βοήθεια αποστειρωμένης οδοντογλυφίδας εμβολιάστηκαν σε τριβλία που περιείχαν θρεπτικό υπόστρωμα King's B. Σε όλη τη διάρκεια της εργασίας αναπτύσσονταν σε τριβλία με το ίδιο θρεπτικό υπόστρωμα (Πίνακας 1). Επίσης, ορισμένα βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν προέρχονται από δείγματα σποροφύτων που προσκομίστηκαν στο εργαστήριο, και πραγματοποιήθηκαν απομονώσεις (Πίνακας 2).

Πίνακας 1. Βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη και οι αντίστοιχες δοκιμές LOPAT.

ΣΤΕΛΕΧΗ	ΞΕΝΙΣΤΗΣ	ΕΤΟΣ	ΠΕΡΙΟΧΗ	L	O	P	A	T
Αναφορές								
<i>P. syringae</i> CFBP 1392	Φασολιά	1950	Αγγλία	+	-	-	-	+
<i>P. savastanoi</i> CFBP 1670	Ελιά	-	Γιουγκοσλαβία	-	-	-	-	+
<i>P. viridiflava</i> CFBP 2107	Φασολιά	1927	Ελβετία	+	-	+	-	+
<i>P. cichorii</i> CFBP 2101, CFBP 5550	Αντίδι	2000	-	-	+	-	-	+
<i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i> 122	Τομάτα	1990	Τυμπάκι	+	-	-	-	+
<i>P. syringae</i> pv. <i>maculicola</i>	Κουνουπίδι	-	-	+	-	-	-	+
<i>P. syringae</i> pv. <i>alisalensis</i> R1-6	Ρόκα	2009	Ηράκλειο	+	-	-	-	+
<i>P. syringae</i> pv. <i>apii</i> 254γ	Σέλνιο	2003	Ηράκλειο	+	-	-	-	+
<i>P. fluorescens</i> CFBP 2102	-	1951	Αγγλία	+/-	+	-	+	-
Συλλογής TEI								
<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> 203	Φασολιά		Μπενάκιο	+	-	-	-	+
<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> 226	Πεπονιά		Τυμπάκι	+	-	-	-	+
<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> 228	Πεπονιά		Τυμπάκι	+	-	-	-	+
<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> 225	Πεπονιά		Τυμπάκι	+	-	-	-	+
<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> 230	Πεπονιά		Τυμπάκι	+	-	-	-	+
<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> 210	Πεπονιά		Τυμπάκι	+	-	-	-	+
<i>P. syringae</i> pv. <i>lachrymans</i> 310/1 N	Πεπονιά		Οροπέδιο	+	-	-	-	+
<i>P. syringae</i> pv. <i>lachrymans</i> 308/1 N	Πεπονιά		Οροπέδιο	+	-	-	-	+
<i>P. syringae</i> pv. <i>lachrymans</i> 312/1 N	Αγγουριά		Οροπέδιο	+	-	-	-	+
<i>P. syringae</i> pv. <i>lachrymans</i> 352 N	Αγγουριά		Οροπέδιο	+	-	-	-	+
<i>P. syringae</i> pv. <i>lachrymans</i> 342 N	Αγγουριά		Οροπέδιο	+	-	-	-	+
<i>P. syringae</i> pv. <i>lachrymans</i> 350 N	Πεπονιά		Οροπέδιο	+	-	-	-	+
<i>P. syringae</i> pv. <i>lachrymans</i> 340 N	Πεπονιά		Οροπέδιο	+	-	-	-	+
<i>P. syringae</i> pv. <i>lachrymans</i> 315 N	Αγγουριά		Οροπέδιο	+	-	-	-	+
<i>P. syringae</i> pv. <i>lachrymans</i> 316/1 N	Αγγουριά		Οροπέδιο	+	-	-	-	+
Απομονώσεις αγγουριά								
TEIC7013	Αγγουριά		Ψαρή Φοράδα	-	-	+	-	+
TEIC7014	Αγγουριά		Ψαρή Φοράδα	-	-	+	-	+
TEIC7015	Αγγουριά		Ψαρή Φοράδα	-	-	+	-	+
TEIC7016	Αγγουριά		Ψαρή Φοράδα	-	-	+	-	+
TEIC7017	Αγγουριά		Ψαρή Φοράδα	-	-	+	-	+
TEIC7018	Αγγουριά		Ψαρή Φοράδα	-	-	+	-	+
TEIC7019/1	Αγγουριά		Ψαρή Φοράδα	-	-	+	-	+
TEIC7020	Αγγουριά		Ψαρή Φοράδα	-	-	+	-	+
TEIC7022	Αγγουριά		Ψαρή Φοράδα	-	-	+	-	+
TEIC7023	Αγγουριά		Ψαρή Φοράδα	-	-	+	-	+

*LOPAT:Levan, oxidase, Potato Rot, Arginine, Tobacco Hypersensitive Reaction

2.2 Απομόνωση από σπορόφυτα καρπουζιάς

Την άνοιξη του 2013 σε αυτόριζα και εμβολιασμένα σπορόφυτα υβριδίου F1 Obla, καρπουζιάς (*Citrullus lanatus* L.), που προσκομιστήκαν στο εργαστήριο Βακτηριολογίας του ΤΕΙ Κρήτης, τα οποία εμφάνιζαν ως κύριο σύμπτωμα υδατώδεις, νεκρωτικές κηλίδες στις κοτυληδόνες και στα πρώτα πραγματικά φύλλα (Εικόνα 3). Κατά τη μικροσκοπική εξέταση, διαπιστώθηκε προσβολή από βακτήριο. Τα σπορόφυτα ξεπλύθηκαν αρχικά με νερό βρύσης, για την απομάκρυνση ξένων υλών και στη συνέχεια με απεσταγμένο και αποστειρωμένο νερό. Τμήματα από τα όρια των υδαρών ή και νεκρωτικών κηλίδων τεμαχίστηκαν σε πολύ μικρά τμήματα σε τριβλίο που περιείχε περίπου 2ml αποστειρωμένο και απεσταγμένο νερό.

Από το παραπάνω αιώρημα πάρθηκε ποσότητα 20ml και απλώθηκε σε τριβλία που περιείχαν θρεπτικό υπόστρωμα King's B (*Pseudomonas* Agar F 17,5gr + 15ml Glycerol 50% στα 500ml) ή και NAG (Nutrient Agar 11,5gr + Glucose 1,25gr στα 500ml) με τη μέθοδο της διασποράς. Στη συνέχεια τα τριβλία τοποθετήθηκαν σε θάλαμο επώασης για 24-48 ώρες στους 28°C. Οι επικρατέστερες αποικίες που παρατηρήθηκαν κατά τις απομονώσεις, υποκαλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα King's B μέχρι να δημιουργηθεί μια καθαρή καλλιέργεια του βακτηρίου. Οι επικρατέστερες αποικίες που παρατηρήθηκαν από την απομόνωση ήταν επίπεδες, στρογγυλές, υπόλευκου χρώματος.

Οι απομονώσεις που επιλέχθηκαν από την καθαρή καλλιέργεια, διατηρήθηκαν σε κεκλιμένη καλλιέργεια σε θρεπτικό υπόστρωμα Gelose profonde στους 4°C καθ' όλη τη διάρκεια της εργασίας, ή/και διατηρήθηκαν σε διάλυμα 20% γλυκερίνης στους -20°C.

Από τις απομονώσεις που έγιναν σε θρεπτικό υπόστρωμα King's B φάνηκε ότι τα απομονωθέντα βακτήρια δεν ανήκουν στις φθορίζουσες ψευδομονάδες. Στον πίνακα 2 αναφέρονται τα βακτηριακά στελέχη που επιλέχθηκαν για να μελετηθούν περαιτέρω στο πλαίσιο της παρούσας εργασίας.

Ταυτοποίηση βακτηριακών απομονώσεων από κολοκυνθοειδή με κλασικές και μοριακές μεθοδολογίες

Πίνακας 2. Βακτηριακά στελέχη που απομονώθηκαν από σπορόφυτα καρπουζιάς και οι αντίστοιχες δοκιμές LOPAT.

ΣΤΕΛΕΧΗ	ΞΕΝΙΣΤΗΣ	ΕΤΟΣ	ΠΕΡΙΟΧΗ	L	O	P	A	T
Απομονώσεις από καρπουζιά								
TEIC1330	Καρπουζιά	2013	Ιεράπετρα	-	+	-	-	+
TEIC1331	Καρπουζιά	2013	Ιεράπετρα	-	+	-	-	+
TEIC1332	Καρπουζιά	2013	Ιεράπετρα	-	+	-	-	+
TEIC1334	Καρπουζιά	2013	Ιεράπετρα	-	+	-	-	+
TEIC1340	Καρπουζιά	2013	Ιεράπετρα	-	+	-	-	+
W1	Καρπουζιά	-	Ισραήλ	-	+	-	-	+
M6	Πεπονιά	-	Ισραήλ	-	+	-	-	+

*LOPAT:Levan, oxidase, Potato Rot, Arginine, Tobacco Hypersensitive Reaction

2.3 Βιοχημική ταυτοποίηση των απομονώσεων

Μετά την εξαγωγή τους από τη συλλογή τα βακτηριακά στελέχη καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα King's B και ελέγχθηκαν για την καθαρότητα και το φθορισμό. Στη συνέχεια εξετάστηκαν ως προς τις δοκιμές L.O.P.A.T. (παραγωγή Levan, δραστηριότητα οξειδάσης, πηκτινόλυση σε ροδέλες κονδύλων πατάτας, αναερόβια διάσπαση αργινίνης, αντίδραση υπερευαισθησίας σε φυτά καπνού *Nicotiana tabacum* cv.Xanthi).

Οι μορφολογικοί, βιοχημικοί και φυσιολογικοί χαρακτήρες που εξετάστηκαν οι απομονώσεις από τα κολοκυνθοειδή σε σύγκριση με τα στελέχη αναφοράς παρουσιάζονται στον Πίνακα 3. Η ταυτοποίηση των απομονώσεων έγινε σύμφωνα με την μεθοδολογία που ακολουθείται από το εργαστήριο Βακτηριολογίας του ΤΕΙ Κρήτης. Ο έλεγχος για την χρησιμοποίηση 22 σακχάρων πραγματοποιήθηκε σε πλάκες μικροτιλοδότσης, σύμφωνα με τη μεθοδολογία που προτείνεται από τους Palacio-Bielsa et al., 2006. Τα σάκχαρα ενσωματώθηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα Ayer's σε τελική συγκέντρωση 0,1%. 150μl τοποθετήθηκαν σε κάθε κυψελίδα της πλάκας μικροτιλοδότσης και στη συνέχεια εμβολιάστηκαν με 15μl από το αιώρημα του αντίστοιχου βακτηριακού στελέχους, συγκέντρωσης περίπου 10^7 cfu/ml (Εικόνα 8, 35, Πίνακας 5) Επιπλέον, επιλεγμένα βακτηριακά στελέχη αναφοράς, επιλεγμένες απομονώσεις από κολοκυνθοειδή και δύο απομονώσεις από καρπουζιά εξετάστηκαν με τις τυποποιημένες βιοχημικές δοκιμές API 20NE που πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με τις οδηγίες της BioMerieux SA (Πίνακας 6, Εικόνα 7).

2.4 Δοκιμές παθογένειας

Για τον έλεγχο της παθογένειας των απομονώσεων πραγματοποιήθηκαν τεχνητές μολύνσεις. Όλα τα στελέχη εξετάστηκαν ως προς την ικανότητα έκλυσης αντίδρασης υπερευαισθησίας (HR) σε φύλλα φυτών καπνού (cv. *Xanthi*), με τη μέθοδο της έκχυσης βακτηριακού αιωρήματος συγκέντρωσης 10^8 cfu/ml με τη βοήθεια σύριγγας. Η παρασκευή των αιωρημάτων έγινε σε αποσταγμένο και αποστειρωμένο νερό με την βοήθεια αποστειρωμένης οδοντογλυφίδας, από καλλιέργεια 48 ωρών σε θρεπτικό υπόστρωμα King's B. Τα φυτά μετά την έκχυση καλύφθηκαν με διαφανείς πλαστικές σακούλες για την διατήρηση υψηλής σχετικής υγρασίας. Μετρήσεις για την πρόκληση αντίδρασης υπερευαισθησίας λήφθηκαν μετά από 24 μέχρι 48 ώρες.

Επιπλέον, πραγματοποιήθηκαν μολύνσεις σε ροδέλες πατάτας με σκοπό την εξέταση της παραγωγής πηκτινολυτικών ενζύμων. Αφού έγινε εξωτερική απολύμανση των κονδύλων της πατάτας με οινόπνευμα και αφαίρεση του φλοιού ασηπτικά, οι κόνδυλοι τεμαχίστηκαν σε ροδέλες και τοποθετήθηκαν σε τριβλία *Petri*, στα οποία είχε τοποθετηθεί αποστειρωμένο διηθητικό χαρτί. Σε κάθε ροδέλα πατάτας με τη βοήθεια αποστειρωμένης οδοντογλυφίδας τοποθετήθηκε μικρή ποσότητα καλλιέργειας βακτηρίου από τα στελέχη, προκαλώντας ταυτόχρονα μικρές πληγές στο κέντρο της ροδέλας της πατάτας. Αφού προστέθηκε αποστειρωμένο και αποσταγμένο νερό στα τριβλία, κλείστηκαν και τοποθετήθηκαν σε θάλαμο επώασης για την εκδήλωση της μόλυνσης (σήψη), η οποία εκτιμήθηκε σε διάστημα 48 h.

Επίσης, πραγματοποιήθηκαν τεχνητές μολύνσεις σε λοβούς φασολιάς με εναπόθεση βακτηριακής καλλιέργειας στο φλοιό των λοβών με τη χρήση αποστειρωμένης οδοντογλυφίδας. Οι μολύνσεις έγιναν με παραλαβή καλλιέργειας των βακτηριακών στελεχών από θρεπτικό υπόστρωμα King's B, με το άκρο της οδοντογλυφίδας και την εισαγωγή της σε βάθος 2mm από την επιφάνεια των λοβών. Στη συνέχεια οι λοβοί τοποθετήθηκαν σε πλαστικά διαφανή δοχεία, κατά τέτοιο τρόπο ώστε να μην εφάπτονται μεταξύ τους και στα οποία είχε προηγουμένως προστεθεί νερό για τη διατήρηση συνθηκών υψηλής σχετικής υγρασίας. Η επώαση έγινε σε θερμοκρασία 25°C και αποτελέσματα λήφθηκαν μέσα σε 72 ώρες.

Επιπρόσθετα, πραγματοποιήθηκαν τεχνητές μολύνσεις σε καρπούς αγγουριάς, κολοκυθιάς, πιπεριάς, πεπονιάς και καρπουζιάς με έκχυση 15ml βακτηριακού αιωρήματος συγκέντρωσης 10^7 cfu/ml από το αντίστοιχο βακτηριακό στέλεχος (Εικόνα 12). Μολύνσεις σε φυτά πιπεριάς, μελιτζάνας, καρπουζιάς (Εικόνα 11), αλλά και σε παντζάρι, σέσκουλο, κριθάρι, σιτάρι και ζαχαρότευτλο έγιναν είτε με έκχυση βακτηριακού αιωρήματος

Ταυτοποίηση βακτηριακών απομονώσεων από κολοκυνθοειδή με κλασικές και μοριακές μεθοδολογίες

συγκέντρωσης 10^7 cfu/ml στο μεσόφυλλο είτε με ψεκασμό μέχρι απορροής σε φυτά που προηγούμενα είχαν πληγωθεί με ψύκτρα. Τα μολυνθέντα φυτά διατηρήθηκαν για 48h σε διάφανα περατά στο φως δοχεία από plexiglas σε συνθήκες υψηλής υγρασίας (ΣΥ 100%) και θερμοκρασία 25 °C. Στη συνέχεια μεταφέρθηκαν σε θερμοκήπιο με σχετική υγρασία 60-70% και θερμοκρασία περίπου 15 - 25 °C. Παρατηρήσεις λαμβάνονταν για 15 μέρες. Σε όλες τις περιπτώσεις ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε η επέμβαση με αποστειρωμένο και απεσταγμένο νερό.

2.5 Μοριακή ταυτοποίηση απομονώσεων

Για την ταυτοποίηση των βακτηρίων χρησιμοποιούνται όλο και πιο συχνά μέθοδοι που βασίζονται στο γενετικό τους υλικό (DNA), οι οποίες εμφανίζονται ως πιο αξιόπιστες, πιο απλές και πιο γρήγορες σε σχέση με τις βιοχημικές δοκιμές. Η ταξινόμηση σε γένη και είδη, παραδοσιακά βασίζονταν σε μεθόδους DNA-DNA υβριδισμού ενώ η μοντέρνα φυλογενετική ανάλυση βασίζεται όλο και περισσότερο σε μοριακές τεχνικές αποτύπωσης (fingerprinting) όπως αυτές που στηρίζονται στην ανάλυση αλληλουχιών επιλεγμένων γονιδίων (MLST), στην ανάλυση 16S ριβοσωμικών αλληλουχιών, στην BOX και ERIC ανάλυση, στα RFLPs και στα RAPDs.

2.5.1 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) είναι μια μέθοδος που επιτρέπει τον επιλεκτικό πολλαπλασιασμό προεπιλεγμένης αλληλουχίας DNA σε πάρα πολλά αντίγραφα σε σύντομο χρόνο. Η PCR αποτελεί μια νέα τεχνική της μοριακής βιολογίας που εφαρμόζεται εκτενώς τόσο στο χώρο της μοριακής βιολογίας όσο και της ιατρικής. Εφευρέτης της μεθόδου αυτής είναι ο Kary Mullis, ο οποίος την ανακοίνωσε το 1984 και τιμήθηκε γι' αυτήν με βραβείο Νόμπελ το 1993. Η PCR αποδείχτηκε επαναστατική μέθοδος και χρησιμοποιείται σε πληθώρα πρακτικών εφαρμογών. Χρησιμοποιείται στην Ιατρική για την διάγνωση ασθενειών όπως το AIDS, στην εγκληματολογία για τη διαλεύκανση υποθέσεων κ.α. Η μέθοδος αποτελεί σημαντικό εργαλείο στα χέρια των βελτιωτών για την ταυτοποίηση και την επιλογή φυτών.

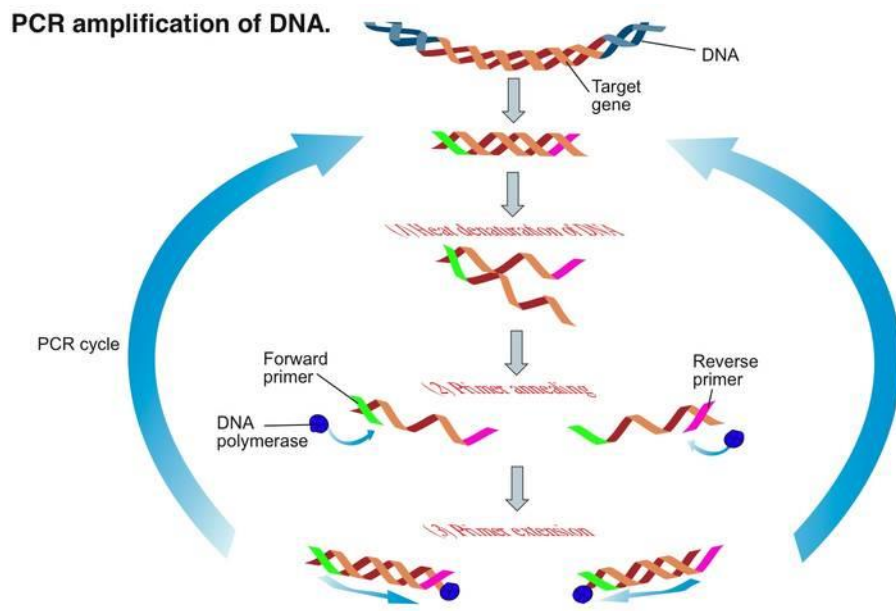
Η μέθοδος χρησιμοποιεί το ένζυμο DNA πολυμεράση και ειδικούς εκκινητές οι οποίοι κατασκευάζονται με βάση την αλληλουχία των άκρων του προς αντιγραφής τμήματος DNA. Η πολυμεράση, χρησιμοποιώντας σαν υπόστρωμα την μία αλυσίδα του DNA, καταλύει την αντίδραση προσθήκης νουκλεοτιδίων στο 3' άκρο της νεοσυντιθέμενης αλληλουχίας, έτσι ώστε να συντεθεί η συμπληρωματική αλυσίδα, αρκεί στο 3' άκρο τους

Ταυτοποίηση βακτηριακών απομονώσεων από κολοκυνθοειδή με κλασικές και μοριακές μεθοδολογίες

να υπάρχει μια μικρή δίκλωνη περιοχή (Εικόνα. 4). Οι δίκλωνες αυτές περιοχές μπορούν να δημιουργηθούν με την χρήση εκκινητών, δηλαδή μικρά συνθετικά τμήματα μονόκλωνου DNA, μεγέθους 15-30 νουκλεοτιδίων και έχουν αλληλουχία συμπληρωματική με το 3' της αλυσίδας που θέλουμε να πολλαπλασιάσουμε. Για τον πολλαπλασιασμό μιας δίκλωνης περιοχής DNA απαιτούνται δύο εκκινητές, ένας για το 3' άκρο της κάθε αλυσίδας.

Η PCR πραγματοποιείται σε τρία κύρια βήματα τα οποία επαναλαμβάνονται 30-40 φορές και εκτελείται σε αυτοματοποιημένο θερμικό κυκλοποιητή, ο οποίος μπορεί να θερμαίνει και να ψύχει τα δοκιμαστικά δοχεία στα οποία γίνεται η αντίδραση με ακρίβεια και πολύ γρήγορα. Τα στάδια που αποτελούν τον επαναλαμβανόμενο κύκλο είναι τα εξής:

- 1) Αποδιάταξη του δίκλωνου DNA (denaturation)
- 2) Υβριδοποίηση εκκινητών (primer annealing) στις αλληλουχίες του DNA-στόχου
- 3) Επιμήκυνση εκκινητών (extension).



PCR amplification of a target gene sequence requires a template DNA molecule (usually an extraction of genomic DNA from an organism) and a set of gene-specific DNA primers. Each PCR cycle has a heat denaturation step that separates the two DNA strands, followed by an annealing step where the forward and reverse primers bind to their complementary sequences and a final DNA extension step where DNA polymerase extends the primer and synthesises a new complementary DNA strand. In this way exponential DNA amplification of target gene is achieved.

 immunopaedia.org

Εικόνα 4. Σχηματική απεικόνιση των τριών κύριων βημάτων της PCR. Αποδιάταξη (denaturation), σύνδεση (annealing), επιμήκυνση (elongation).

Κατά την διάρκεια του πρώτου σταδίου η αντίδραση υποβάλλεται σε θερμοκρασία 94 °C προκειμένου να επιτευχθεί ο διαχωρισμός των κλώνων του DNA (αποδιάταξη / denaturation). Στο δεύτερο στάδιο η θερμοκρασία μειώνεται στους 50-65°C ώστε να

Ταυτοποίηση βακτηριακών απομονώσεων από κολοκυνθοειδή με κλασικές και μοριακές μεθοδολογίες

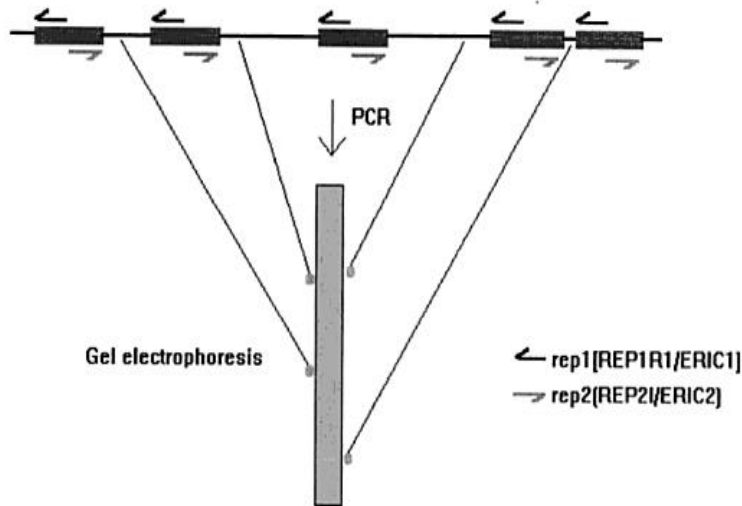
επιτευχθεί η πρόσδεση των εκκινητών με τις συμπληρωτικές τους αλληλουχίες (υβριδοποίηση εκκινητών/primer annealing). Στο τρίτο και τελευταίο στάδιο η θερμοκρασία αυξάνεται στους 72°C και με την βοήθεια της DNA πολυμεράσης, που προσθέτει τα νουκλεοτίδια (dNTP's) στο 3' άκρο των εκκινητών, επιτυγχάνεται η σύνθεση των νέων συμπληρωματικών αλυσίδων DNA. Η σύνθεση των αντιγράφων γίνεται από την DNA πολυμεράση πάντα με κατεύθυνση 5' προς 3'.

2.5.2 rep-PCR

Η μέθοδος που αναφέρεται ως rep-PCR αναπτύχθηκε στηριζόμενη στην παρατήρηση της παρουσίας συντηρημένων επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών διασπαρμένων σε ολόκληρο το γονιδίωμα των κατά Gram αρνητικών και θετικών βακτηρίων (Louws *et al.*, 1999) αλλά και μυκήτων (George *et al.*, 1998). Έτσι αναπτύχθηκε η BOX-PCR μεθοδολογία για την ενίσχυση των τμημάτων μεταξύ των παραπάνω επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών (Εικόνα. 5). Παρόλα αυτά ο όρος rep-PCR χρησιμοποιείται για να περιλάβει όλες τις παραπάνω μεθοδολογίες (Louws *et al.*, 1999). Η μεθοδολογία αποδειχθεί ότι είναι ιδιαίτερα αξιόπιστη, γρήγορη και αναπαραγώγιμη.

Τρεις οικογένειες επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών έχουν ανιχνευτεί, συμπεριλαμβανομένων των 35-40 bp επαναλαμβανόμενων παλίνδρομων αλληλουχιών (Repetitive Extragenic Palindromic ή REP), των 124-127 bp κοινών εντεροβακτηριακών επαναλαμβανόμενων διαγενετικών αλληλουχιών (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus ή ERIC) και του 154 bp BOX στοιχείου. Αυτές οι αλληλουχίες φαίνεται να εντοπίζονται σε ευδιάκριτες και χωριστές διαγενετικές θέσεις σε ολόκληρο το γονιδίωμα. Τα επαναλαμβανόμενα στοιχεία, ενδέχεται να παρουσιάζονται και στις δύο κατευθύνσεις και εκκινητές έχουν σχεδιαστεί για την αντιγραφή του DNA, εξωτερικά των REP και ERIC αλληλουχιών καθώς και από την BOXA υπομονάδα της BOX περιοχής. Τα ενισχυμένα αυτά τμήματα μπορούν να αναλυθούν σε πήκτωμα αγαρόζης, οδηγώντας σε ένα προφίλ που αναφέρεται σαν rep-PCR γενωμικό αποτύπωμα. Αυτά τα αποτυπώματα, μοιάζουν σαν πρότυπα «barcodes» που χρησιμοποιούνται στο εμπόριο.

Ταυτοποίηση βακτηριακών απομονώσεων από κολοκυνθοειδή με κλασικές και μοριακές μεθοδολογίες



Εικόνα 5. Σχηματική παράσταση του τρόπου που δημιουργούνται οι ζώνες στις μεθόδους REP- και ERIC-PCR. Ουσιαστικά ενισχύονται οι περιοχές μεταξύ των περιοχών REP ή ERIC

Τα rep-PCR γενωμικά αποτυπώματα που προέρχονται από απομονωμένα στελέχη βακτηρίων, επιτρέπουν την ταυτοποίηση σε επίπεδο γένους, είδους και υποείδους. Επιπλέον των μελετών αυτών οι rep-PCR έχουν καταστεί χρήσιμα εργαλεία για την ταυτοποίηση και ταξινόμηση των βακτηρίων και για επιδημιολογικές και φυλογενετικές μελέτες σε ανθρώπινα και φυτικά παθογόνα (Μπαλαντινάκη, 2011).

2.5.3 Δημιουργία υγρής καλλιέργειας για απομόνωση DNA

Τα στελέχη των βακτηριακών στελεχών που αναγράφονται στους πίνακες 1&2 επιλέχθηκαν για τη μοριακή ταυτοποίηση του παθογόνου. Με την βοήθεια βακτηριακού κρίκου (λούπα) εμβολιάστηκαν σε δοκιμαστικούς σωλήνες που περιείχαν 4ml υγρό θρεπτικό υπόστρωμα καλλιέργειας Lysogeny Broth ή Luria-Bertani (10gr Bacto-tryptone, 5g Bacto-yeast extract, 10gr NaCl, pH 7) με βακτηριακά κύτταρα του παθογόνου. Οι υγρές καλλιέργειες τοποθετήθηκαν σε θάλαμο επώασης, με ανάδευση (100 στροφές / λεπτό) και επώαστηκαν για 48h στους 27°C.

2.5.4 Απομόνωση ολικού DNA από βακτηριακά κύτταρα

Η απομόνωση DNA από υγρές καλλιέργειες των βακτηριακών στελεχών έγινε με την βοήθεια του συστήματος DNeasy Blood and Tissue Kit της εταιρείας QIAGEN. Αρχικά, 2ml από κάθε καλλιέργεια τοποθετήθηκαν σε αποστειρωμένο δοκιμαστικό σωλήνα (τύπου Falcon) και ακολούθησε φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 7500 στροφές. Στην συνέχεια απορρίφθηκε το υπερκείμενο και προστέθηκαν 180μl ρυθμιστικού διαλύματος ATL και τα

Ταυτοποίηση βακτηριακών απομονώσεων από κολοκυνθοειδή με κλασικές και μοριακές μεθοδολογίες

διαλύματα τοποθετήθηκαν σε αποστειρωμένα σωληνάρια χωρητικότητας 2ml. Προστέθηκαν 20μl πρωτεΐνάση K, αναδεύτηκαν σθεναρά και επώαστηκαν για 2 ώρες σε υδατόλουτρο στους 56°C μέχρι να ολοκληρωθεί η λύση των βακτηριακών κυττάρων (κατά την διάρκεια της επώασης γινόταν ανάδευση ανά τακτά χρονικά διαστήματα). Μετά το τέλος της επώασης τα δείγματα αναδεύτηκαν για 15 δευτερόλεπτα και προστέθηκαν 200μl ρυθμιστικό διάλυμα AL και αναδεύτηκαν. Μετά την προσθήκη 200μl αιθανόλης και εκ νέου ανάδευση, τοποθετήθηκαν σε στήλες απομόνωσης και φυγοκεντρήθηκαν για 1 λεπτό στις 8000 στροφές. Αφού απορρίφθηκε το υπερκείμενο προστέθηκαν 500μl ρυθμιστικού διαλύματος AW1 και φυγοκεντρήθηκαν για 1 λεπτό στις 8000 στροφές. Και πάλι απορρίφθηκε το υπερκείμενο και προστέθηκαν 500μl ρυθμιστικού διαλύματος AW2 και φυγοκεντρήθηκαν για 3 λεπτά στις 14.000 στροφές. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε αποστειρωμένα φιαλίδια τύπου Eppendorf. Για την απομόνωση του DNA, προστέθηκαν 200μl ρυθμιστικό διάλυμα AE και τα δείγματα επώαστηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 1 λεπτό. Μετά από φυγοκέντρηση για ένα λεπτό στις 8000 στροφές το διάλυμα του DNA αποθηκεύτηκε στους -20°C.

2.5.5 Ηλεκτροφόρηση απομονωμένου DNA σε πήκτωμα αγαρόζης

Για να διαπιστωθεί η απομόνωση του DNA από τα βακτηριακά στελέχη, έγινε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης. Η συγκέντρωση της αγαρόζης που χρησιμοποιήθηκε ήταν 0.8%. Σε 50 ml ρυθμιστικού διαλύματος 0.5x TBE (Trisborate EDTA), διαλύθηκαν 0.4 g αγαρόζης με θέρμανση σε φούρνο μικροκυμάτων και στην συνέχεια προστέθηκαν 2 μl χρωστικής βρωμιούχου αιθυδίου. Το διάλυμα της αγαρόζης, αφέθηκε να πολυμεριστεί για περίπου 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου στη συσκευή ηλεκτροφόρησης, και προστέθηκε διάλυμα TBE αφού είχε τοποθετηθεί χτενάκι για να δημιουργηθούν οι θέσεις τοποθέτησης των δειγμάτων. Μετά τον πολυμερισμό, στα «πηγαδάκια» τοποθετήθηκαν 5 μl από το απομονωμένο DNA των στελεχών καθώς και 1 μl χρωστικής. Στη συνέχεια ακολούθησε η ηλεκτροφόρηση για 45 λεπτά σε 55 V. Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε λ DNA κομμένο με το περιοριστικό ένζυμο PstI. Μετά την ολοκλήρωση της ηλεκτροφόρησης, το πήκτωμα τοποθετήθηκε σε τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας για παρατήρηση.

2.5.6 Φωτομέτρηση των δειγμάτων

Για την πραγματοποίηση των αντιδράσεων PCR, έπρεπε να υπολογιστούν οι συγκεντρώσεις του DNA των βακτηριακών στελεχών. Η μέτρηση αυτή πραγματοποιήθηκε

Ταυτοποίηση βακτηριακών απομονώσεων από κολοκυνθοειδή με κλασικές και μοριακές μεθοδολογίες

στο εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Φυτών του Πανεπιστημίου Κρήτης με την βοήθεια νανοφωτόμετρου (Nanodrop). Στην ειδική ακίδα δειγματοληψίας, τοποθετήθηκε 1 μl του υπό ανάλυση δείγματος, και η μέτρησή του καταγράφηκε με την βοήθεια ειδικού προγράμματος σε ηλεκτρονικό υπολογιστή. Στο τέλος της κάθε μέτρησης, η ακίδα καθαρίζονταν ελαφρά με απορροφητικό χαρτί.

Ακολούθησε η ίδια διαδικασία για όλα τα προς ανάλυση δείγματα. Μετά την φωτομέτρηση, τα δείγματα αραιώθηκαν, έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση όλων των δειγμάτων να είναι ίδια και ίση με 50 ng/μl.

2.6 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR)

Για την μοριακή ταυτοποίηση των στελεχών του παθογόνου εφαρμόστηκαν οι παρακάτω τεχνικές PCR μοριακού αποτυπώματος: BOX- και *gyrB*-PCR.

2.6.1 Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για τις αντιδράσεις PCR

Για την διεξαγωγή των αντιδράσεων PCR, χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές της εταιρίας VBC-Biotech. Για τις BOX- και *gyrB*-PCRs, χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές BOXA1R και *gyrB*-αντίστοιχα.

2.7 Αντιδράσεις PCR

Για όλες τις αντιδράσεις PCR χρησιμοποιήθηκε ο θερμικός κυκλοποιητής Mastercycler Gradient της εταιρίας Eppendorf (Εικόνα.6). Για τις rep-PCR χρησιμοποιήθηκαν όλα τα στελέχη που αναφέρονται αναλυτικά στους Πίνακες 1&2.



Εικόνα 6. Θερμικός κυκλοποιητής Master cycler Gradient της εταιρίας Eppendorf

2.7.1 BOX -PCR

Αρχικά πραγματοποιήθηκε rep-PCR με τον εκκινητή BOXA1R για την BOX-PCR. Οι συνθήκες της αντίδρασης ρυθμίστηκαν με το πρόγραμμα που περιγράφεται παρακάτω:

Ταυτοποίηση βακτηριακών απομονώσεων από κολοκυνθοειδή με κλασικές και μοριακές μεθοδολογίες

7 λεπτά στους 95°C για να γίνει η αρχική αποδιάταξη του DNA. Στη συνέχεια ακολούθησαν 30 κύκλοι που ο καθένας αποτελείται από: 1 λεπτό στους 95°C, 30 δευτερόλεπτα στους 53°C, 5 λεπτά στους 72°C. Με το πέρας των 30 κύκλων, ακολούθησαν 15 λεπτά στους 72°C. Στον Πίνακα 3 αναφέρονται αναλυτικά τα αντιδραστήρια και οι ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν για την αντίδραση.

Πίνακας 3. Σύσταση αντιδραστηρίων BOX-PCR σε γενωμικό DNA βακτηριακών στελεχών

Αντιδραστήριο	Ποσότητα ανά αντίδραση	Τελική συγκέντρωση
DNA template	2.5 μl	100ngr
KapaBuffer (10x)	2 μl	1x
BOXA1R (50 pMol)	0.25 μl	0.625pMol
dNTPs (από 10 mM)	0.5 μl	0.25mM
MgCl ₂ (από 25 mM)	0.8 μl	1 mM
Taq DNA Polymerase	0.35 μl	1.75units/μl
ddH ₂ O	13.35 μl	
Τελικός όγκος	20 μl	

2.7.2 *gyrB*-PCR

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε PCR για την ενίσχυση του γονιδίου *gyrB* με τους εκκινητές UP-1E/APrU. Οι συνθήκες της αντίδρασης ρυθμίστηκαν με το πρόγραμμα που περιγράφεται παρακάτω: 5 λεπτά στους 94°C. Στη συνέχεια ακολούθησαν 35 κύκλοι που ο καθένας αποτελείται από: 1 λεπτό στους 94°C, 1 λεπτό στους 57°C, 2 λεπτά στους 72°C. Με το πέρας των 35 κύκλων, ακολούθησαν 10 λεπτά στους 72°C. Στον Πίνακα 4 αναφέρονται αναλυτικά τα αντιδραστήρια και οι ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν για την αντίδραση.

Πίνακας 4. Σύσταση αντιδραστηρίων *gyrB*-PCR σε γενωμικό DNA βακτηριακών στελεχών

Αντιδραστήριο	Ποσότητα ανά αντίδραση	Τελική συγκέντρωση
DNA template	2.5 μl	100ngr
Kapa Buffer	2 μl	1x
UP-1E (100 pMol)	0.25 μl	0.625pMol
APrU (100 pMol)	0.25 μl	0.625pMol
dNTPs (από 10 mM)	0.5 μl	0.25Mm
MgCl ₂ (από 25 mM)	0.8 μl	1 Mm
Taq DNA Polymerase	0.35 μl	1.75units
5units/μl		
ddH ₂ O	13.35 μl	
Τελικός όγκος	20 μl	

2.7.3 Επιβεβαίωση των προϊόντων της PCR με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1,2% w/v

Για την ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε πήκτωμα αγαρόζης, συγκέντρωσης 1.2% w/v. Σε 100 ml ρυθμιστικού διαλύματος 0.5xTBE, διαλύθηκαν 1.2 g αγαρόζης με θέρμανση σε φούρνο μικροκυμάτων και στην συνέχεια προστέθηκαν 5 μl χρωστικής βρωμιούχο αιθύδιο. Το διάλυμα της αγαρόζης, αφέθηκε να πολυμεριστεί για περίπου 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου στη συσκευή ηλεκτροφόρησης και προστέθηκε διάλυμα TBE αφού είχε τοποθετηθεί χτενάκι για να δημιουργηθούν οι θέσεις τοποθέτησης των δειγμάτων. Μετά τον πολυμερισμό, τα δείγματα τοποθετήθηκαν στα «πηγαδάκια» και ακολούθησε η ηλεκτροφόρηση για 90 λεπτά σε 100 V. Η ποσότητα των δειγμάτων που φορτώθηκε ήταν 5 μl και ως μάρτυρας για την εκτίμηση του μεγέθους των ζωνών χρησιμοποιήθηκε DNA του φάγου λ κομμένο με το περιοριστικό ένζυμο PstI. Μετά την ολοκλήρωση της ηλεκτροφόρησης, το πήκτωμα τοποθετήθηκε στην τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας για παρατήρηση.

Ταυτοποίηση βακτηριακών απομονώσεων από κολοκυνθοειδή με κλασικές και μοριακές μεθοδολογίες

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Ταυτοποίηση βακτηριακών απομονώσεων από κολοκυνθοειδή με κλασικές και μοριακές μεθοδολογίες

3.1 Χαρακτηρισμός απομονώσεων

Αρχικά όλα τα στελέχη εξετάστηκαν ως προς τις δοκιμές L.O.P.A.T. και τα αποτελέσματα εμφανίζονται στον πίνακα 5. Επιπλέον τα βακτηριακά στελέχη εξετάστηκαν ως προς τις βιοχημικές αντιδράσεις τους στις δοκιμές API 20NE (Εικόνα.7) και τα αποτελέσματα αναφέρονται στον πίνακα 6

Πίνακας 5 Αποτελέσματα κλασικών βιοχημικών δοκιμών σε στελέχη από κολοκυνθοειδή

ΔΟΚΙΜΕΣ	ΑΠΟΜΟΝΩΣΕΙΣ ΑΠΟ ΚΟΛΟΚΥΝΘΟΕΙΔΗ				ΣΤΕΛΕΧΗ ΑΝΑΦΟΡΑΣ					
					<i>P. syringae</i> <i>pv. syringae</i>	<i>P. viridiflava</i>	<i>P. savastanoi</i> <i>pv. savastanoi</i>	<i>P. cichorii</i>	<i>P. syringae</i> <i>pv. alis</i> <i>alensis</i>	<i>P. syringae</i> <i>pv. maculicola</i>
	TEIC7018, TEIC7014, TEIC7016, TEIC7015, TEIC7019/1, TEIC7025, TEIC7022, TEIC7023	228	210, 340 Pssav455	316/1, 340, 342, 350, 352, 315, 308/1, 310/1, 312/1, 226, 210, 225, 228, 230	CFBP 1392/1, BPIC 203	CFBP 2107/2	CFBP 1670/1	CFBP 5550 CFBP 2101	R1-6, 6870/0 4	1657/08
Levan	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+
Oxidase	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Potato rot	+(7019a)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Arginine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tobacco HR	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sucrose	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+
D-sorbitol	NT	NT	NT	+	+	-	-	-	-	-
D+Trehalose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Malonate	NT	NT	NT	+	+	+	+	+	+	+
Cellobiose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D (-) tartate	+	+	-(210+)	-(315,316/1,310 +)	-	+	-	+	+	+
Mesotartate	+	+	+	+	-(203+)	+	+	+	- R1-6 +	+
L(+) tartate	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-
Mannitol	NT	NT	NT	+	+	+	+	+	+	+
Trigonelline	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-tartaric acid	NT	NT	NT	-	-	-	+	+	-	-
Arbutin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D(-)Arabinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Betaine	+(7023,7025 -)	-	-	+	+	+	+	+	- R1-6	+
Meso-erythritol	+(7023,7025 -)	-	+	+	+	+	-	-(2101+)	(+)	(+)
Adonitol	NT	NT	NT	-	-	-	-	-	-	-
L-Lactate	+(7023,7019a -)	+	+(226 -)	+	+	+	+	+	-	-
DL tartate	+	+	-	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
Histamine	-	-	-	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
L+ tartate	-	+	-	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
2 ketogluconate	+	+	+	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
L rhamnose	-	-	-	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT

Ταυτοποίηση βακτηριακών απομονώσεων από κολοκυνθοειδή με κλασικές και μοριακές μεθοδολογίες

Πίνακας 6 Αποτελέσματα βιοχημικών δοκιμών με βάση τις τυποποιημένες δοκιμές API 20 NE

ΔΟΚΙΜΕΣ Api 20NE	ΑΠΟΜΟΝΩΣΕΙΣ ΑΠΟ ΚΟΛΟΚΥΝΘΟΕΙΔΗ			ΣΤΕΛΕΧΗ ΑΝΑΦΟΡΑΣ			
	TEIC7013, TEIC7016, TEIC7018, TEIC7022, TEIC7023	TEIC1331, TEIC1339	316/1, 340, 342, 350, 352, 315, 308/1, 310/1, 312/1, 226, 210, 225, 228, 230	<i>P. syringae</i> <i>pv. syringae</i> CFBP 1392/1, BPIC 203	<i>P. viridiflava</i> CFBP 2107/2	<i>P. savastanoi pv.</i> <i>savastanoi</i> CFBP 1670/1	<i>P. cichorii</i> CFBP 5550 CFBP 2101
NO3	-	+	-	-	-	-	-
Tryptophan	-	-	-	-	-	-	-
Glucose	-	-	-	-	-	-	-
Arginine	-	-	-	-	-	-	-
Urease	(+)	+	-	-	-	-	-
Aesculin	+	-	+	+	+	-	+
Gelatine	+	(+)	-(310/1+)	+(203 -)		-	-
B-Galactosidase	-	-	-	-	-	-	-
Glucose	+	+	+	+	+	+	+
Arabinose	+	+	+	+	+	-	+
Mannose	+	+	+	+	(+)	-	+
Mannit	+	+	+	+	+	+	+
N.acetylglucosamin	-	-	-	-	-	-	-
Maltose	-	-	-	-	-	-	-
Gluconat	+	+	+	+	+	+	+
Caprat	+	-	+	+	-	(+)	+
Adipat	-	+	-	-	-	-	-
Malat	+	+	+	+	+	+	+
Citrat	+	-	+(308-)	+	+	+	+
Phenylcetat	-	-	-	-	-	-	-

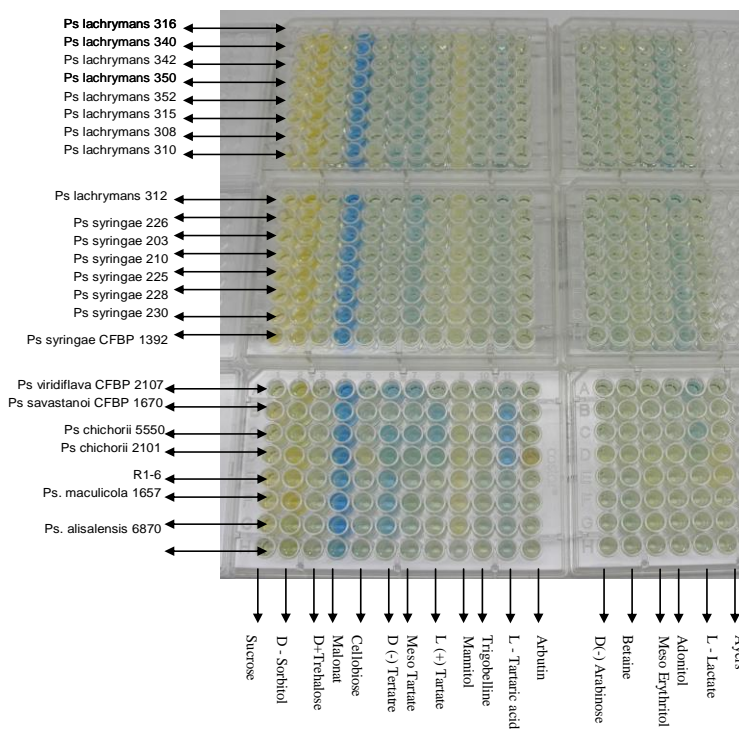
Στους πίνακες 5 και 6 εμφανίζονται τα αποτελέσματα των βιοχημικών αντιδράσεων για το σύνολο των απομονώσεων που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη. Κατά γενικό κανόνα παρατηρούμε ότι τα στελέχη από τα κολοκυνθοειδή ταυτοποιούνται σε τρεις κύριες ομάδες. Στην πρώτη ομάδα κατανέμονται στελέχη που ανήκουν στο είδος *Pseudomonas viridiflava*, στη δεύτερη ομάδα ομαδοποιούνται στελέχη που ταυτοποιούνται ως μέλη του είδους *Pseudomonas syringae* με την ευρεία έννοια αφού δεν μπορεί να γίνει διαφοροποίηση σε επίπεδο παθοποιικιλίας και τέλος η τρίτη ομάδα περιλαμβάνει τα στελέχη από τις απομονώσεις της καρπουζιάς και ανήκουν στο είδος *Acidovorax citrulli*. Τα στελέχη αναφοράς που χρησιμοποιήθηκαν συγκριτικά (CFBP1392 (*Pseudomonas syringae*), CFBP1670 (*Pseudomonas savastanoi* subsp *savastanoi*), CFBP2107

Ταυτοποίηση βακτηριακών απομονώσεων από κολοκυνθοειδή με κλασικές και μοριακές μεθοδολογίες

(*Pseudomonas viridiflava*) CFBP5550, CFBP2101 (*Pseudomonas chichorii*), εμφάνισαν τον αναμενόμενο βιοχημικό φαινότυπο.



Εικόνα 7 Ταυτοποίηση βακτηριακών στελεχών με τις δοκιμές αρι 20NE



Εικόνα 8.έλεγχος χρησιμοποίησης σακχάρων σε πλάκες μικροτιτλοδότησης. Η αλλαγή χρώματος από πράσινο σε κίτρινο ή μπλε σε συνδιασμό με την ανάπτυξη θολερότητας υποδεικνύει τη χρησιμοποίηση του αντίστοιχου σακχάρου.

3.2 Δοκιμές παθογένειας

Όλα τα βακτηριακά στελέχη, εξετάστηκαν ως προς την ικανότητα έκλυσης αντίδρασης υπερευαισθησίας (HR) και όλα έδωσαν τυπική αντίδραση υπερευαισθησίας, σε φύλλα φυτών καπνού (cv. *Xanthi*) σε διάστημα 24-48 ωρών (Εικόνα.9). Τα στελέχη που ταυτοποιούνται ως *Pseudomonas viridiflava* προκάλεσαν τη σήψη των κονδύλων της πατάτας (Εικόνες 33 &34)σε αντίθεση με όλα τα υπόλοιπα στελέχη της μελέτης.

Σε λοβούς φασολιάς τα στελέχη των ομάδων 2 (*Pseudomonas syringae*) και 3 (*Acidovorax citrulli*) έδωσαν άτυπα συμπτώματα με δημιουργία ελαφρά βυθισμένης κηλίδας στη θέση μόλυνσης, σε αντίθεση με τα στελέχη της ομάδας 1 (*Pseudomonas viridiflava*) που προκάλεσαν τα τυπικά συμπτώματα που αναπτύσσουν τα βακτήρια του είδους *Pseudomonas viridiflava*, δηλαδή ερυθρό-πορτοκαλόχρους βυθισμένες κηλίδες (Εικόνα. 10). Εξάιρεση αποτέλεσαν τα στελέχη TEIC7014, TEIC7015, TEIC7016 και TEIC7010 που εμφάνισαν άτυπη νεκρωτική κηλίδα.

Τα αποτελέσματα των τεχνητών μολύνσεων σε καρπούς καρπουζιάς, πεπονιάς με έγχυση βακτηριακού αιωρήματος και σε καρπούς καρπουζιάς, πεπονιάς, πιπεριάς, αγγουριάς και κολοκυθιάς με την χρήση οδοντογλυφίδας εμφανίζονται στον Πίνακα 7 και την Εικόνα 12. Παρατηρούμε ότι σε όλες τις περιπτώσεις ανεξάρτητα από τον τρόπο μόλυνσης, οι μολύνσεις ήταν επιτυχείς. Τα στελέχη της ομάδας 2 του *Pseudomonas syringae* προκάλεσαν την εκδήλωση υδαρών βυθισμένων κηλίδων, τα μέλη της ομάδας 3 του *Acidovorax citrulli* υδαρείς βυθισμένες κηλίδες που σταδιακά νεκρώνονται προκαλώντας τη φελλοποίηση των μολυσμένων ιστών. ενώ συχνά παρατηρήσαμε την εκδήλωση έλκους. Τα στελέχη 308, 310, 312 και 340 δεν μολύναν τους καρπούς (κολοκυθιάς, καρπουζιάς και πεπονιάς).



Εικόνα 9. Αντίδραση υπερευαισθησίας, σε φύλλα φυτών καπνού (cv. *Xanthi*) σε διάστημα 24-48 ωρών

Ταυτοποίηση βακτηριακών απομονώσεων από κολοκυνθοειδή με κλασικές και μοριακές μεθοδολογίες



Εικόνα 10. ερυθρό-πορτοκαλόχρες βυθισμένες κηλίδες σε λοβούς φασολιάς

Πίνακας 7. Τεχνητές μολύνσεις σε κομμένους καρπούς με βακτηριακά στελέχη που απομονώθηκαν από καρπουζιά

ΞΕΝΙΣΤΗΣ	ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΟ ΣΤΕΛΕΧΟΣ	ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΑ	ΦΩΤΟΓΡΑΦΙΑ
Καρπούζι (<i>Citrullus lanatus</i>)	TEIC1330, TEIC1340	Υδαρείς βυθισμένες κηλίδες, νέκρωση ιστών και δημιουργία έλκους	Εικόνα 12
Κολοκύθι (<i>Cucurbita pepo</i>)		Υδαρείς βυθισμένες κηλίδες και φελοποίηση των ιστών	
Αγγούρι (<i>cucumis sativus</i>)		Υδαρείς βυθισμένες κηλίδες και φελοποίηση των ιστών	
Πιπεριά (<i>Capsicum annuum</i>)		Υδαρείς βυθισμένες κηλίδες, φελοποίηση των ιστών και δημιουργία έλκους	
Κολοκύθι, Αγγούρι, Πιπεριά	210, 225, 228,230	Υδαρείς βυθισμένες κηλίδες	
Κολοκύθι, αγγούρι, πιπεριά	308, 310, 312, 340	-	

Ταυτοποίηση βακτηριακών απομονώσεων από κολοκυνθοειδή με κλασικές και μοριακές μεθοδολογίες

Πίνακας 8. Τεχνητές μολύνσεις σε φυτά με βακτηριακά στελέχη απομονωθέντα από κολοκυνθοειδή

ΣΤΕΛΕΧΗ	ΞΕΝΙΣΤΕΣ						
	Πεπονιά	Κολοκυθιά	Αγγουριά	Καρπουζιά	Σέσκουλο	Παντζάρι	Ζαχαρότευτλο
228, 226, 230	+	+	+	+	+	+	+
210	+	+	+	+	NT	+	+
225	+	+	+	+	+	+	+
310	+	+	+	+	+	+	+
308, 312	+	+	+	+	+	-	+
340, 342, 352, 350	+	+	+	+	NT	(+)	+
TEIC7019, TEIC7018	+ σήψη	+ σήψη	+	+	NT	NT	NT

* Κριθάρι και σιτάρι δε μολύνθηκαν, ** Πεπόνι με χτύπημα: +, Παντζάρι με χτύπημα: μελιτζανί περιθώρια (225, 210, -308+312, 228). *** Ζαχαρότευτλο + : νέκρωση στην θέση μόλυνσης επέκταση και διάχυση του παθογόνου εξίδρωση στις 19/6/13

NT: δεν δοκιμάστηκε, +: μόλυνση, ανάπτυξη τυπικών συμπτωμάτων, - : απουσία μόλυνσης

Πίνακας 9. Τεχνητές μολύνσεις σε φυτά με βακτηριακά στελέχη απομονωθέντα από καρπουζιά

ΣΤΕΛΕΧΗ	ΞΕΝΙΣΤΕΣ		
	Καρπουζιά	Πιπεριά	Μελιτζάνα
TEIC1330, TEIC 1331, TEIC1332, TEIC1334, TEIC1339, TEIC1340	Τυπική ανάπτυξη συμπτωμάτων βακτηριακής κηλίδωσης καρπουζιάς, χλωρωτικές κηλίδες που γίνονται νεκρωτικές, με χλωρωτικό περιθώριο	άτυπες κηλίδες που γίνονται νεκρωτικές	άτυπες κηλίδες που γίνονται νεκρωτικές

Στους Πίνακες 8 και 9 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των τεχνητών μολύνσεων σε διάφορα φυτά τα οποία επιλέγηκαν με βάση τον ξενιστή που απομονώθηκαν τα βακτηριακά στελέχη αλλά και πιθανολογούμενους ξενιστές τους. Σε όλες τις περιπτώσεις οι μολύνσεις ήταν επιτυχείς. Διαφοροποιήσεις παρουσιάστηκαν στα φυτά που είχαν πληγωθεί πριν τη μόλυνση όπου η ανάπτυξη των συμπτωμάτων ήταν ταχύτερη. Στην περίπτωση των στελεχών της ομάδας 1 (*Pseudomonas viridiflava*) οι αρχικές υδαρείς κηλίδες εξελίχθηκαν σε σήψη – νέκρωση των φύλλων και στη συνέχεια συχνά ολόκληρου του φυτού. (Εικόνες 36 & 37) Στην περίπτωση των στελεχών της ομάδας 2 (*Pseudomonas syringae*) οι αρχικές υδαρείς κηλίδες εξελίσσονται σε νεκρωτικές συνήθως με χλωρωτικό

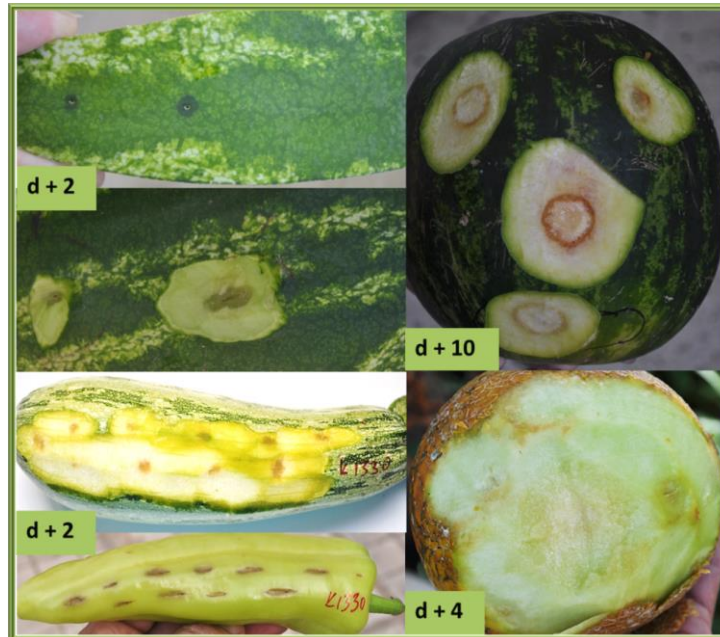
Ταυτοποίηση βακτηριακών απομονώσεων από κολοκυνθοειδή με κλασικές και μοριακές μεθοδολογίες

περιθώριο (Εικόνες 21 – 31) ενώ τέλος στην περίπτωση των στελεχών της ομάδας 3 (*Acidovorax citrulli*) τα φυτά εμφάνισαν το σύνολο των συμπτωμάτων της ασθένειας της βακτηριακής κηλίδωσης της καρπουζιάς τόσο στις κοτυληδόνες (Εικόνα 11) όσο και στα ανεπτυγμένα φύλλα (Εικόνες 11, 42 & 43) δηλαδή σκουρόχρωμες υδαρείς κηλίδες στην κάτω επιφάνεια των κοτυληδόνων που σταδιακά, γίνονται νεκρωτικές και είναι εμφανείς και στις δύο πλευρές. Στα φύλλα, η προσβολή εκδηλώνεται με την εμφάνιση χλωρωτικών κηλίδων με νεκρωτικό στίγμα στο κέντρο και καθώς αυξάνουν γίνονται νεκρωτικές αποκτούν χρώμα σκούρο καστανό μέχρι μαύρο. Συχνά είναι γωνιώδεις με έντονο φαρδύ χλωρωτικό περιθώριο, ενώ εξαπλώνονται κατά μήκος των κύριων νευρώσεων του φύλλου προκαλώντας τη νέκρωση μεγάλου τμήματος του ελάσματος. Σπανιότερα παρατηρήθηκε κατάρρευση και νέκρωση των φυταρίων.



Εικόνα 11. Αναπαραγωγή συμπτωμάτων σε κοτυληδόνες & φύλλα καρπουζιάς , μελιτζάνας & πιπεριάς

Ταυτοποίηση βακτηριακών απομονώσεων από κολοκυνθοειδή με κλασικές και μοριακές μεθοδολογίες

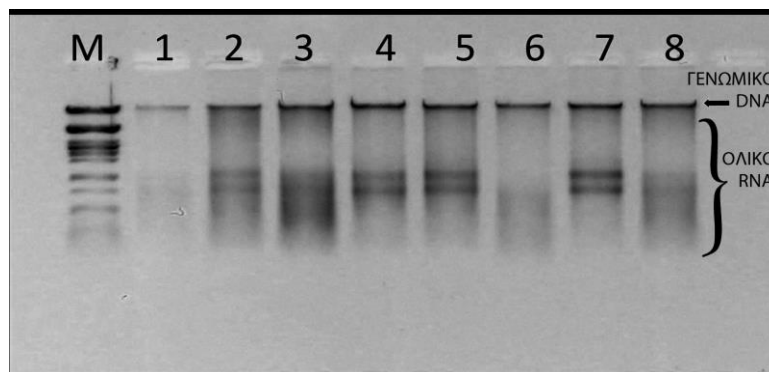


Εικόνα 12. Αναπαραγωγή συμπτωμάτων σε καρπούς: καρπούζι, κολοκύθι, πεπόνι & πιπεριά

3.3 Μοριακή ταυτοποίηση

3.3.1 Ανίχνευση απομονωμένων DNA σε πήκτωμα αγαρόζης

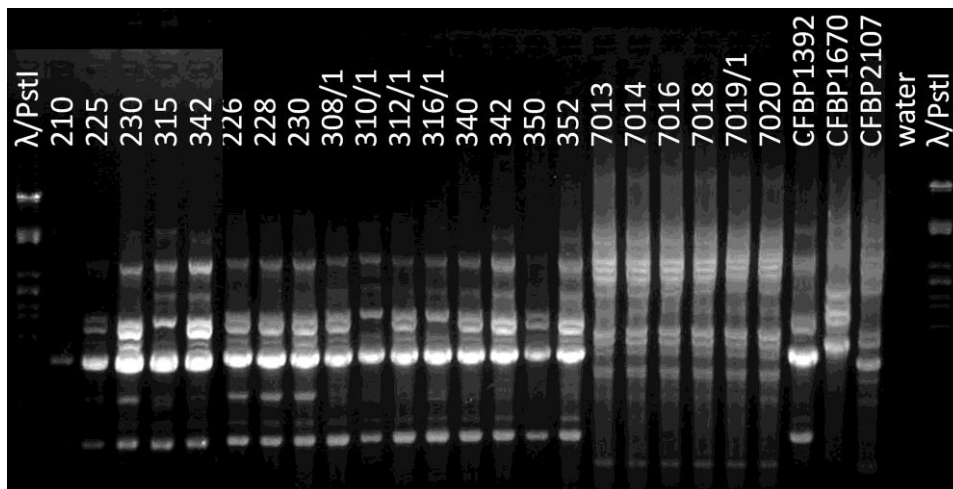
Μετά την ολική απομόνωση του DNA έγινε έλεγχος για να αξιολογηθεί η ποιότητα της κάθε μιας απομόνωσης από τα βακτηριακά κύτταρα. Στην εικόνα 13 παρουσιάζεται ένα πήκτωμα αγαρόζης (1,2% w/v) στο οποίο φορτώθηκαν απομονώσεις ολικού DNA από τα βακτηριακά στελέχη 1) TEIC1330, 2) TEIC1339, 3) TEIC1340, 4) TEIC7014, 5) TEIC7022, 6) 225, 7) 308, 8) 350



Εικόνα 13. Πήκτωμα αγαρόζης ανάλυσης DNA με μοριακό δείκτη τον λ /PstI και DNA των βακτηριακών στελεχών: 1) TEIC1330, 2) TEIC1339, 3) TEIC1340, 4) TEIC7014, 5) TEIC7022, 6) TEIC225, 7) TEIC308, 8) TEIC 350

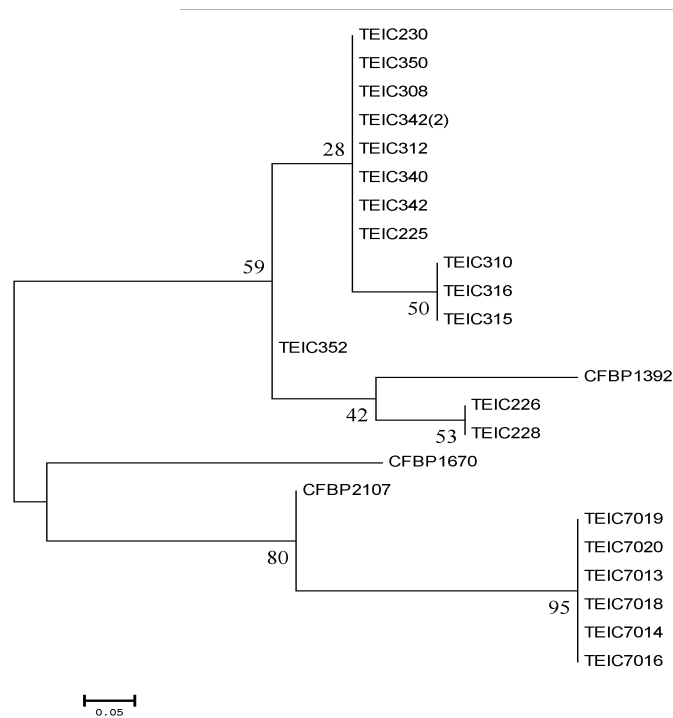
3.3.2 Αποτελέσματα της *rep*-PCR

Τα αποτελέσματα που πάρθηκαν κατά την εφαρμογή των μοριακών δεικτών BOX - PCR, και τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για να υπολογιστεί το δενδρόγραμμα παρουσιάζονται στις Εικόνες 14 & 15 αντίστοιχα. Παρατηρούμε ότι από τα 22 στελέχη που εξετάστηκαν και προέρχονται από φυτά αγγουριάς και πεπονιάς τα 15 στελέχη από αυτά ομαδοποιούνται μαζί με το στέλεχος αναφοράς *Pseudomonas syringae* (CFBP1392), τα 6 στελέχη ομαδοποιούνται μαζί με το στέλεχος αναφοράς *Pseudomonas viridiflava* (CFBP2107), ενώ ένα στέλεχος (TEIC210) δεν παρήγαγε προϊόντα. Τέλος, το στέλεχος αναφοράς *Pseudomonas savastanoi* subsp *savastanoi* (CFBP1670), διαφοροποιείται από τις δύο προηγούμενες ομάδες. Επιπλέον, 3 στελέχη (TEIC7023, TEIC7024, TEIC7025) που προέρχονται από φυτά αγγουριάς εξετάστηκαν στην BOX –PCR μαζί με τα στελέχη αναφοράς *Pseudomonas cichorii* (CFBP5550) και *Pseudomonas viridiflava* (CFBP2107) και το στέλεχος TEIC7013 που ομαδοποιήθηκε στην προηγούμενη BOX –PCR με το στέλεχος αναφοράς *Pseudomonas viridiflava* (CFBP2107) και παρατηρήθηκε ότι και τα 3 στελέχη (TEIC7022, TEIC7023, TEIC7025) μαζί με το στέλεχος TEIC7013 ομαδοποιούνται με το στέλεχος αναφοράς *Pseudomonas viridiflava* (CFBP2107) (Εικόνα 16)

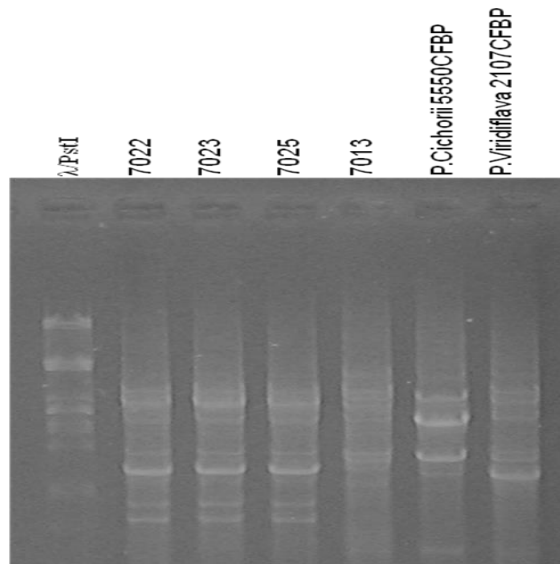


Εικόνα 14. Αποτύπωμα μοριακών δεικτών της BOX-PCR με βακτηριακά στελέχη από διάφορα κολοκυνθοειδή (βλέπε Πίνακα) και τα στελέχη αναφοράς CFBP1392 (*Pseudomonas syringae*), CFBP1670 (*Pseudomonas savastanoi* subsp *savastanoi*), CFBP2107 (*Pseudomonas viridiflava*)

Ταυτοποίηση βακτηριακών απομονώσεων από κολοκυνθοειδή με κλασικές και μοριακές μεθοδολογίες



Εικόνα15. Δενδρόγραμμα που δημιουργήθηκε με βάση τα μοριακά αποτυπώματα της Box-PCR με βακτηριακά στελέχη από κολοκυνθοειδή των ομάδων 1, 2 και 3, και τα στελέχη αναφοράς CFBP1392 (*Pseudomonas syringae*), CFBP1670 (*Pseudomonas savastanoi* subsp *savastanoi*), CFBP2107 (*Pseudomonas viridiflava*)

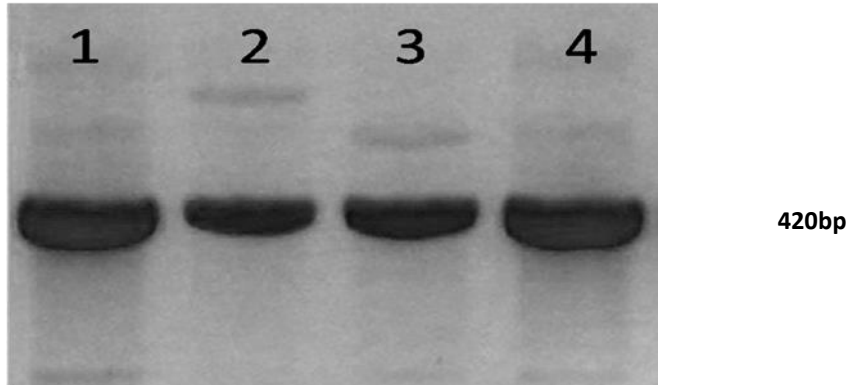


Εικόνα 16. Αποτύπωμα μοριακών δεικτών της BOX-PCR, με στελέχη της ομάδας 1.

Ταυτοποίηση βακτηριακών απομονώσεων από κολοκυνθοειδή με κλασικές και μοριακές μεθοδολογίες

3.3.3 Αποτελέσματα *gyrB*-PCR

Τα προϊόντα από τη *gyrB*, παρουσιάζονται σε πήκτωμα αγαρόζης συγκέντρωσης 1,3% w/v στην Εικόνα 17. Παρατηρούμε ότι στο κάθε πήκτωμα εμφανίζεται μια ζώνη για όλα τα στελέχη στα 420 bp για την *gyrB*-PCR. Οι ζώνες, απομονώθηκαν από το πήκτωμα αγαρόζης και στη συνέχεια αλληλουχήθηκαν.

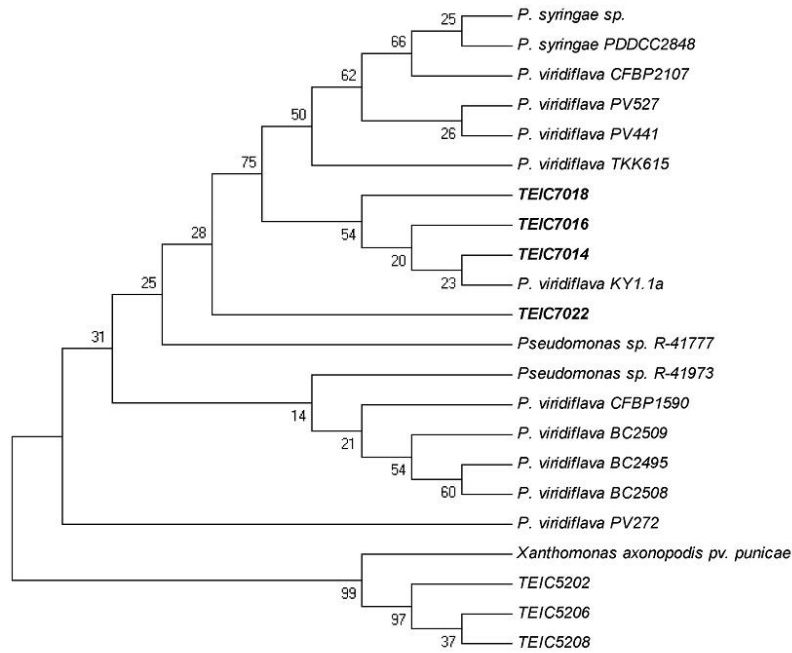


Εικόνα 17. Πήκτωμα αγαρόζης με τα προϊόντα *gyrB*-PCR μοριακό δείκτη τον λ PstI και DNA των βακτηριακών στελεχών: 1) TEIC7014, 2) TEIC7016, 3) TEIC7018, 4) TEIC7022

3.3.4 Αποτελέσματα αλληλούχισης του γονιδίου *gyrB*

Η σύγκριση των αλληλουχιών των γονιδίων *gyrB*, αυτών με άλλες κατατεθειμένες στην GeneBank έδειξε πως και τα 4 στελέχη ανήκουν στην είδος του *Pseudomonas viridiflava*. Όσον αφορά την αλληλούχιση του γονιδίου *gyrB*, τα στελέχη βρέθηκαν να έχουν ομολογία 96-100% με τα στελέχη αναφοράς που είναι κατατεθειμένα στη βάση δεδομένων. Ενδεικτικά, το βακτηριακό στέλεχος TEIC7014 απομονωμένο από αγγουριά έχει 97% ομολογία με το στέλεχος αναφοράς KY1.1a, και το στέλεχος TEIC7016 απομονωμένο από αγγουριά έχει 100% ομολογία με το στέλεχος αναφοράς TKK615. Τα αποτελέσματα των αλληλουχιών κατατέθηκαν στη βάση δεδομένων GeneBank του National Center for Biotechnology Information (NCBI). Στην Εικόνα 18 παρουσιάζεται το δένδρογραμμα που κατασκευάστηκε σύμφωνα με τις ακολουθίες των γονιδίων *gyrB*.

Ταυτοποίηση βακτηριακών απομονώσεων από κολοκυνθοειδή με κλασικές και μοριακές μεθοδολογίες

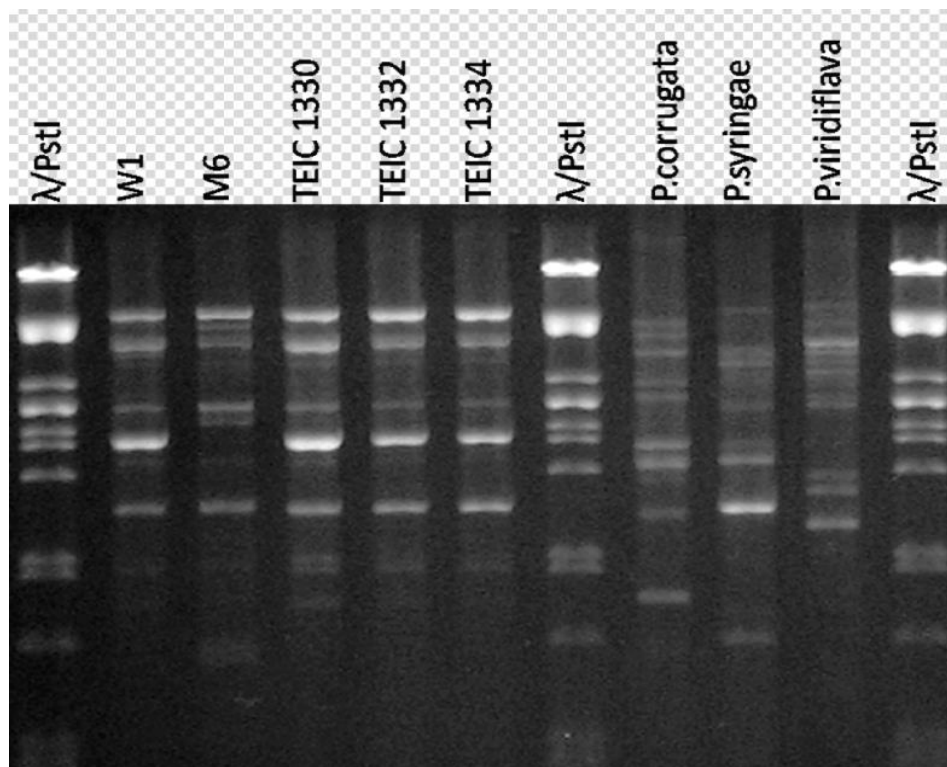


Εικόνα 18. Δενδρόγραμμα που κατασκευάστηκε χρησιμοποιώντας *gyrB* αλληλουχίες στελεχών αυτής της εργασίας (ομάδα 1) και άλλων κατατεθειμένων στη βάση δεδομένων GeneBank

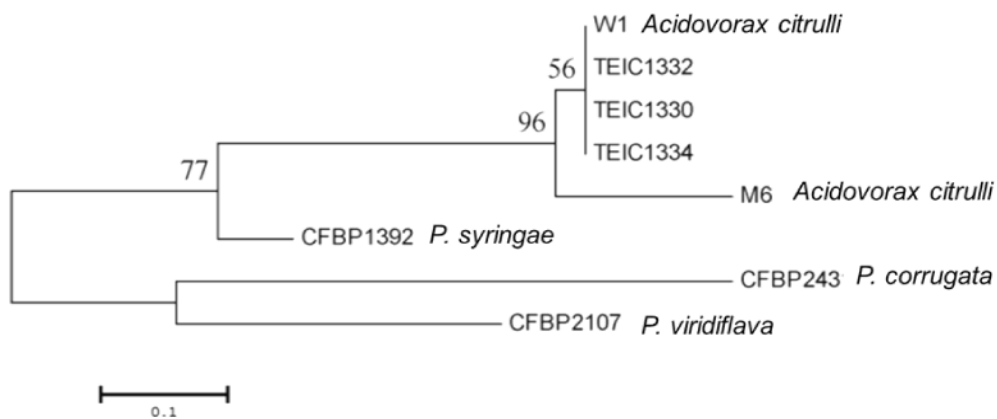
3.3.5 Αποτελέσματα της *ger*-PCR με βακτηριακά στελέχη από καρπουζιά

Τα αποτελέσματα που πάρθηκαν κατά την εφαρμογή των μοριακών δεικτών BOX - PCR, και τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για να υπολογιστεί το δενδρόγραμμα παρουσιάζονται στις εικόνες 19 & 20 αντίστοιχα. Παρατηρούμε ότι από τα 3 στελέχη που εξετάστηκαν και προέρχονται από φυτά καρπουζιάς εμφανίζουν την ίδια ζώνωση και ομαδοποιούνται μαζί με τα στελέχη αναφοράς του *Acidovorax citrulli* W1 & M6, που προέρχονται από φυτά καρπουζιάς και πεπονιάς αντίστοιχα από το Ισραήλ. Τα στελέχη αναφοράς *Pseudomonas viridiflava* (CFBP2107), *Pseudomonas syringae* (CFBP1392) και *Pseudomonas corrugata* (CFBP243) τα οποία εξετάστηκαν ταυτόχρονα παρουσίασαν μεγάλες διαφοροποιήσεις στην ζώνωση.

Ταυτοποίηση βακτηριακών απομονώσεων από κολοκυνθοειδή με κλασικές και μοριακές μεθοδολογίες



Εικόνα 19. Αποτύπωμα μοριακών δεικτών της BOX-PCR με στελέχη της ομάδας 3 από καρπουζιά και τα στελέχη αναφοράς CFBP243 (*Pseudomonas corrugata*), CFBP1392 (*Pseudomonas syringae*) CFBP2107 (*Pseudomonas viridiflava*)



Εικόνα 20. Δενδρόγραμμα που δημιουργήθηκε με βάση τα μοριακά αποτυπώματα της παραπάνω Box-PCR

Ταυτοποίηση βακτηριακών απομονώσεων από κολοκυνθοειδή με κλασικές και μοριακές μεθοδολογίες

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ταυτοποίηση βακτηριακών απομονώσεων από κολοκυνθοειδή με κλασικές και μοριακές μεθοδολογίες

Στην παρούσα εργασία, αναλύθηκαν εργαστηριακά οι μορφολογικοί, βιοχημικοί και μοριακοί χαρακτήρες και ελέγχθηκε η παθογένεια σε διάφορους ξενιστές, εικοσιτεσσάρων βακτηριακών απομονώσεων, είκοσι βακτηριακά στελέχη προέρχονται από την συλλογή του εργαστηρίου Φυτοπαθολογίας Βακτηριολογίας και τέσσερα είναι απομονώσεις από ασθενή sporόφυτα καρπουζιάς που προσκομιστήκαν στο εργαστήριο Βακτηριολογίας του ΤΕΙ Κρήτης κατά την διάρκεια της μελέτης και ενσωματώθηκαν σε αυτή. Με βάση το μορφολογικό, φυσιολογικό και βιοχημικό φαινοτυπικό προφίλ αλλά και με τις δοκιμές παθογένειας, διαπιστώθηκε ότι τα βακτηριακά στελέχη που εξετάστηκαν κατανέμονται σε τρεις ομάδες. Συγκεκριμένα, στην πρώτη ομάδα ομαδοποιούνται στελέχη που ανήκουν στο είδος *Pseudomonas viridiflava*, και προέρχονται από ασθενή φυτά, στη δεύτερη ομάδα ομαδοποιούνται στελέχη που ταυτοποιούνται ως μέλη του είδους *Pseudomonas syringae* με την ευρεία έννοια αφού δεν ήταν εφικτή η διαφοροποίηση σε επίπεδο παθοποιικιλίας και προέρχονται από φυτά αγγουριάς και πεπονιάς. Τέλος η τρίτη ομάδα περιλαμβάνει τα στελέχη από τις απομονώσεις της καρπουζιάς τα οποία ταυτοποιήθηκαν ως μέλη του είδους *Acidovorax citrulli*. Το γεγονός ότι τα στελέχη αναφοράς εμφάνισαν τον αναμενόμενο βιοχημικό φαινότυπο ενδυναμώνει την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων μας. Η ίδια ομαδοποίηση παρατηρήθηκε μετά την εφαρμογή των μοριακών δεικτών rep-PCR.

Τα αποτελέσματα των PCR υποδεικνύουν ξεκάθαρα την κατανομή των στελεχών στις τρεις παραπάνω ομάδες. Ορισμένα από τα στελέχη της ομάδας ένα, που χαρακτηρίστηκαν τόσο βιοχημικά όσο και μοριακά ως μέλη του *Pseudomonas viridiflava*, παρουσίασαν μικρές διαφοροποιήσεις κατά τον έλεγχο της παθογένειας (χαμηλή μολυσματικότητα σε κονδύλους πατάτας, απουσία τυπικού συμπτώματος σε λοβούς φασολιάς). Το γεγονός αυτό μας οδήγησε στην αλληλούχηση του γονιδίου *gyrB*. Από την μελέτη διαπιστώθηκε ότι το εύρος των ξενιστών για ορισμένα από τα στελέχη της ομάδας 2 διευρύνεται εκτός της οικογένειας των κολοκυνθοειδών.

Η επιβεβαίωση των παραπάνω δεδομένων σε νέες δοκιμές παθογένειας σε συνδυασμό με την χρησιμοποίηση μοριακών δοκιμών πιθανό να οδηγήσει σε χαρακτηρισμό σε επίπεδο παθοποιικιλίας.

Τέλος, από την εργασία προέκυψε η πρώτη αναφορά του *Acidovorax citrulli* ως παθογόνου της καρπουζιάς στην Κρήτη.

Από την σύγκριση των αλληλουχιών αυτού του γονιδίου από τα στελέχη αυτά, με στελέχη που είναι καταχωρημένα στην βάση δεδομένων GenBank επιβεβαιώθηκε ότι όλα τα στελέχη ανήκουν πράγματι στο είδος *Pseudomonas viridiflava*. Οι αλληλουχίσεις έδειξαν πολύ υψηλή ομολογία με τις αντίστοιχες αλληλουχίσεις άλλων στελεχών του

Ταυτοποίηση βακτηριακών απομονώσεων από κολοκυνθοειδή με κλασικές και μοριακές μεθοδολογίες

Pseudomonas viridiflava που είναι καταχωρημένες στην βάση δεδομένων GenBank. Η ανάλυση για το γονίδιο *gyrB* έδειξε ότι τα στελέχη έχουν ομολογία 97-100%.

Ταυτοποίηση βακτηριακών απομονώσεων από κολοκυνθοειδή με κλασικές και μοριακές μεθοδολογίες

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΗ

- Burdman S. & Walcott R., 2012. *Acidovorax citrulli*: generating basic and applied knowledge to tackle a global threat to the cucurbit industry. *MOLECULAR PLANT PATHOLOGY*, 2012 13(8), 805-815
- George, M. L. C., Nelson, R. J., Zeigler, R. S., Leung, H., 1998. Rapid Population Analysis of *Magnaporthe grisea* by Using rep-PCR and Endogenous Repetitive DNA Sequences. *Phytopathology*, 88(3), 223-229.
- Goss EM, Kreitman M, Bergelson J., 2005. Genetic diversity, recombination and cryptic clades in *Pseudomonas viridiflava* infecting natural populations of *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* 169: 21-35.
- GOUMAS D.E. and CHATZAKI A.K. 1998. Characterization and host range evaluation of *Pseudomonas viridiflava* from melon, blite, tomato, chrysanthemum and eggplant. *European Journal of Plant Pathology*, 104, 181-188
- Isakeit, T., Black, M. C., Barnes, L. W., & Jones J. B. (1997). First report of infection of honeydew with *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. *Plant Disease*, 81, 694.
- Louws, F. J., Rademaker, J. L. W., Bruijn, F. J., 1999. The three Ds of PCR-based genomic analysis of phytobacteria: Diversity, Detection, and Disease Diagnosis. *Annual Review of Phytopathology*, 37, 81-125.
- MALATHRAKIS N.E. and GOUMAS D.E., 1987. Bacterial soft rot of tomato in plastic greenhouses in Crete. *Annals of Applied Biology* 111: 115-123.
- Rane, K. K., & Latin, R. X. (1992). Bacterial fruit blotch of watermelon - Association of the pathogen with seed. *Plant Disease*, 76, 509-512.
- Schaad, N. W., Jones, J. B., and Chun, W., Third edition 2001. Laboratory guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. 121-138.
- Walcott, R. R, Fessehaie, A., & Castro, A. C. (2004). Differences in pathogenicity between two genetically distinct groups of *Acidovorax avenae* subsp. *Citrulli* on cucurbit hosts. *Journal of Phytopathology*, 152, 277-285.

ΕΛΛΗΝΙΚΗ

- Αδαμοπούλου, Κ.Μ., 2012. Φυλλογενετική μελέτη στελεχών ψευδομονάδων με βάση γονίδιο του εκκριτικού συστήματος τύπου III, Γεωπονικό πανεπιστήμιο Αθηνών,

Ταυτοποίηση βακτηριακών απομονώσεων από κολοκυνθοειδή με κλασικές και μοριακές μεθοδολογίες

τμήμα γεωπονικής βιοτεχνολογίας, εργαστήριο γενικής και γεωργικής μικροβιολογίας, σελ. 118

- ΓΚΟΥΜΑΣ Δ.Ε., 1992. Μια νέα βακτηρίωση της πεπονιάς. *Περιλήψεις Ανακοινώσεων, 6^ο Πανελλήνιο Φυτοπαθολογικό Συνέδριο*, 6-8 Οκτωβρίου 1992, Πάτρα σελ 30
- Γκούμας, Δ.Ε., 2003. Οι βακτηριώσεις στα κολοκυνθοειδή. *Γεωργία και Κτηνοτροφία*, 3, σελ. 54-59.
- Γκούμας, Δ.Ε., 2006. Επιλεγμένα Θέματα Ειδικής Φυτοβακτηριολογίας. Έκδοση: ΤΕΙ Κρήτης, Ηράκλειο, σελ.7-8.
- Κογκάκη, Ε, 2010. Μελέτη μιας βακτηρίωσης της καρπουζιάς Πτυχιακή εργασία. ΤΕΙ Κρήτης, Ηράκλειο 2011, σελ. 45
- Μπαλαντινάκη, Ε., 2011, Μοριακή ταυτοποίηση απομονώσεων του βακτηρίου *pseudomonas viridiflava* από διάφορους ξενιστές Πτυχιακή εργασία. ΤΕΙ Κρήτης, Ηράκλειο 2011, σελ.57
- Παναγόπουλος, Χ.Γ., 2000. Ασθένειες κηπευτικών καλλιεργειών. Β' Έκδοση. Εκδόσεις: Αθ. Σταμούλης, Αθήνα, σελ. 233-281.
- Χολέβα, Μ.Κ., Καραφλα, Χ.Δ., Γλυνός Π.Ε., και Αλιβιζάτος, Α.Σ., 2008. Πρώτη ανακοίνωση προσβολής φυτών και καρπών καρπουζιάς από το φυτοπαθογόνο βακτήριο *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* στην Ελλάδα. Πρόγραμμα και Περιλήψεις εργασιών, 14ο Πανελλήνιο Φυτοπαθολογικό Συνέδριο, Αργολίδα, σελ. 139.

Ταυτοποίηση βακτηριακών απομονώσεων από κολοκυνθοειδή με κλασικές και μοριακές μεθοδολογίες

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Ταυτοποίηση βακτηριακών απομονώσεων από κολοκυνθοειδή με κλασικές και μοριακές μεθοδολογίες

Παρουσίαση εικονογραφημένης εργασίας: 26^ο Συνέδριο της Ελληνικής Εταιρείας της Επιστήμης των Οπωροκηπευτικών, Καλαμάτα, 15-18 Οκτωβρίου 2013

1. Περίληψη

2. Poster

ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΤΟΥ ΒΑΚΤΗΡΙΟΥ *Acidovorax citrulli* ΑΠΟ ΣΠΟΡΟΦΥΤΑ ΚΑΡΠΟΥΖΙΑΣ ΣΤΗΝ ΚΡΗΤΗ

Ε. Δροσινού, Ε. Μπαλαντινάκη, Ε. Τραντάς, Π. Σαρρής, Φ. Βερβερίδης και Δ. Γκούμας

*Σχολή Τεχνολογίας Γεωπονίας, Τμήμα Φυτικής Παραγωγής, Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Τδρωμα Κρήτης
Τ.Θ. 1939, Ηράκλειο, Κρήτης, 71004, Ελλάδα*

Την άνοιξη του 2013 σε αυτόριζα και εμβολιασμένα σπορόφυτα υβριδίου F1 Obla, καρπουζιάς (*Citrullus lanatus* L.), που προσκομιστήκαν στο εργαστήριο Βακτηριολογίας του ΤΕΙ Κρήτης, διαπιστώθηκε, κατά τη μικροσκοπική εξέταση, προσβολή από βακτήριο. Στα νεαρά αυτόριζα φυτά η προσβολή στις κοτυληδόνες εκδηλώνεται με την εμφάνιση σκουρόχρωμων υδαρών κηλίδων στην κάτω επιφάνεια τους. Σταδιακά, οι κηλίδες γίνονται νεκρωτικές και είναι εμφανείς και στις δύο πλευρές. Στα φύλλα, η προσβολή εκδηλώνεται με την εμφάνιση χλωρωτικών κηλίδων με νεκρωτικό στίγμα στο κέντρο και καθώς αυξάνουν γίνονται νεκρωτικές αποκτούν χρώμα σκούρο καστανό μέχρι μαύρο. Συχνά είναι γωνιώδεις με έντονο φαρδύ χλωρωτικό περιθώριο, ενώ εξαπλώνονται κατά μήκος των κύριων νευρώσεων του φύλλου προκαλώντας τη νέκρωση μεγάλου τμήματος του ελάσματος. Σπανιότερα παρατηρήθηκε κατάρρευση και νέκρωση των φυταρίων. Τα συμπτώματα στις κοτυληδόνες χαρακτηρίζονται ως τυπικά της ασθένειας «βακτηριακή κηλίδωση των καρπών της καρπουζιάς», ενώ η συμπτωματολογία στα πραγματικά φύλλα μπορεί να προσομοιάζει με προσβολές από άλλα παθογόνα. Σκοπός της εργασίας ήταν η ταυτοποίηση του παθογόνου αιτίου. Από τους προσβεβλημένους ιστούς απομονώνονταν σταθερά βακτήρια σε καθαρή καλλιέργεια. Οι αποικίες του βακτηρίου σε θρεπτικό υπόστρωμα nutrient agar είναι στρογγυλές και έχουν χρώμα κρεμώδες λευκό. Οι δέκα απομονώσεις που αναλύθηκαν εργαστηριακά βρέθηκαν αρνητικές κατά Gram και με αερόβια ανάπτυξη, δεν φθόριζαν σε θρεπτικό υπόστρωμα King B, ήταν θετικές στην αντίδραση της οξειδάσης και έδωσαν τυπική αντίδραση υπερευαισθησίας σε φύλλα καπνού (*Nicotiana tabacum* cv. Xanthi). Με βάση το μορφολογικό, φυσιολογικό, βιοχημικό (API 20NE; Biomérieux, France), ορολογικό φαινότυπο (Aac ImmunoStrip[®], Agdia, Inc), τις μοριακές δοκιμές (16S rDNA ομολογία αλληλούχησης; Rep-Box-PCR) και τις δοκιμές παθογένειας σε φυτά και κομμένους ώριμους καρπούς καρπουζιάς και άλλων κολοκυνθοειδών, οι απομονώσεις του βακτηρίου ταυτοποιήθηκαν ως *Acidovorax citrulli*. Συμπτώματα νέκρωσης των ιστών παρατηρήθηκαν στις θέσεις μόλυνσης σε φυτά και καρπούς καρπουζιάς, πιπεριάς (*Capsicum annuum* L.), αγγουριάς (*Cucumis sativus* L.), κολοκυθιάς (*Cucurbita pepo* L.), πεπονιάς (*Cucumis melo* L.). Συμπτώματα δεν παρατηρήθηκαν σε τομάτα (*Lycopersicon esculentum* Mill.) και μελιτζάνα (*Solanum melongena* L.). Το παθογόνο αναφέρεται για πρώτη φορά στην Κρήτη, ενώ έχει ήδη αναφερθεί σε άλλες περιοχές στην Ελλάδα. Το σπορομεταδιδόμενο βακτήριο *Acidovorax citrulli* αποτελεί πλέον ένα σοβαρό κίνδυνο για τα κολοκυνθοειδή στη Χώρα μας.

Ταυτοποίηση βακτηριακών απομονώσεων από κολοκυνθοειδή με κλασικές και μοριακές μεθοδολογίες

ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΤΟΥ ΒΑΚΤΗΡΙΟΥ *Acidovorax citrulli* ΑΠΟ ΣΠΟΡΟΦΥΤΑ ΚΑΡΠΟΥΖΙΑΣ ΣΤΗΝ ΚΡΗΤΗ

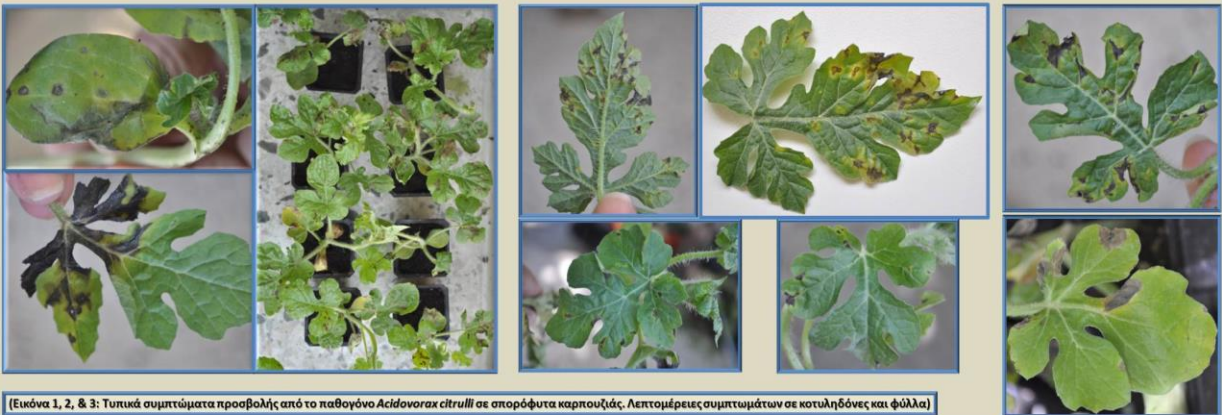


Ε. Δροσινού, Ε. Μπαλαντινάκη, Ε. Τραντάς, Π. Σαρρής, Φ. Βερβερίδης και Δ. Γκούμας

Ανώτατο Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα Κρήτης, Σχολή Τεχνολογίας Γεωπονίας & Τεχνολογίας Τροφίμων
Τμήμα Τεχνολογών Γεωπόνων, Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας Βακτηριολογίας & Εργαστήριο Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας
26^ο Συνέδριο Ελληνικής Εταιρείας Επιστήμης Οπωροκηπευτικών, Καλαμάτα, 15-18 Οκτωβρίου 2013

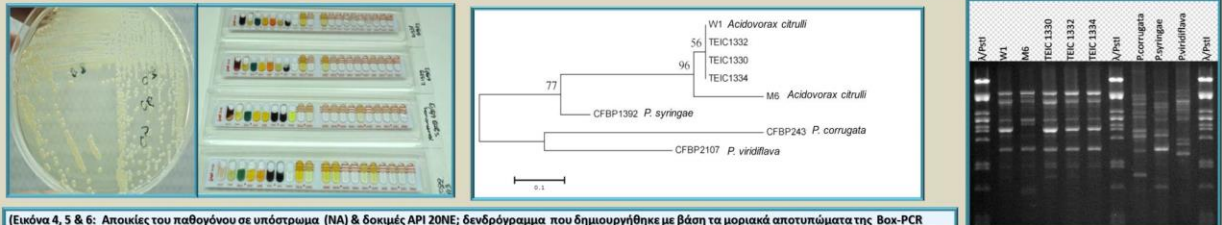
ΕΙΣΑΓΩΓΗ: Την άνοιξη του 2013 σε αυτάρικα και εμβολιασμένα σπορόφυτα καρπούζιας (*Citrullus lanatus* L.), υβριδίου F1 Obla, που προσκομιστήκαν στο εργαστήριο Βακτηριολογίας του ΤΕΙ Κρήτης διαπιστώθηκε, κατά τη μικροσκοπική εξέταση, προσβολή από βακτήριο. Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η ταυτοποίηση του παθογόνου αίτιου της νέας αυτής ασθένειας της καρπούζιας στην Κρήτη.

ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΟΛΟΓΙΑ: Στα νεαρά αυτάρικα φυτά η προσβολή στις κοτυληδόνες εκδηλώθηκε με την εμφάνιση ακούραζωμων υδαρών κηλίδων στην κάτω επιφάνεια τους. Σταδιακά, οι κηλίδες έγιναν νεκρωτικές και ήταν εμφανείς και στις δύο πλευρές (Εικόνα 1). Στα φύλλα, η προσβολή εκδηλώθηκε με την εμφάνιση χλωρωτικών κηλίδων με νεκρωτικό στίγμα στο κέντρο και καθώς αυξάνονταν έγιναν νεκρωτικές απέκτησαν χρώμα σκούρο καστανό μέχρι μαύρο. Συχνά ήταν γωνιώδεις με έντονο φαρδύ χλωρωτικό περιθώριο, ενώ εξαπλώνονταν κατά μήκος των κύριων νευρώσεων του φύλλου προκαλώντας τη νέκρωση μεγάλου τμήματος του ελάσματος (Εικόνα 2 & 3). Σπανιότερα παρατηρήθηκε κατάρρευση και νέκρωση των φυταρίων. Τα συμπτώματα στις κοτυληδόνες χαρακτηρίστηκαν ως τυπικά της ασθένειας «βακτηριακή κηλίωση των καρπών της καρπούζιας», ενώ η συμπτωματολογία στα πραγματικά φύλλα έμοιαζε και με προσβολές από άλλα παθογόνα.



(Εικόνα 1, 2 & 3: Τυπικά συμπτώματα προσβολής από το παθογόνο *Acidovorax citrulli* σε σπορόφυτα καρπούζιας. Λεπτομέρειες συμπτωμάτων σε κοτυληδόνες και φύλλα)

ΠΑΘΟΓΟΝΟ: Απομόνωση & Ταυτοποίηση. Από τους προσβεβλημένους ιστούς απομονώνονταν σταθερά βακτήρια σε καθαρή καλλιέργεια. Οι αποικίες του βακτηρίου σε θρεπτικό υπόστρωμα nutrient agar (NA) ήταν στρογγυλές και είχαν χρώμα κρεμώδες λευκό (Εικόνα 4). Οι δέκα απομονώσεις που αναλύθηκαν εργαστηριακά βρέθηκαν αρνητικές κατά Gram και με αερόβια ανάπτυξη, δεν φθόριζαν σε θρεπτικό υπόστρωμα King B, ήταν θετικές στην αντίδραση της οξειδάσης και έδωσαν τυπική αντίδραση υπερευαισθησίας σε φύλλα καπνού (*Nicotiana tabacum* cv. Xanthi). Με βάση το μορφολογικό, φυσιολογικό, βιοχημικό (API 20NE; Βιομέτρικς, France) (Εικόνα 4), ορολογικό φαινότυπο (Asc ImmunoStrip®, Agdia, Inc), τα BOX-PCR μοριακά αποτυπώματα (Εικόνα 5 & 6) και την υψηλή ομοιότητα που παρουσιάζουν τα απομονωμένα στελέχη (95-97%) στα 16S rDNA σε σχέση με τα ήδη καταγεγραμμένα στη βάση δεδομένων στελέχη αναφοράς, οι δέκα απομονώσεις του βακτηρίου ταυτοποιήθηκαν ως μέλη του είδους *Acidovorax citrulli*.



(Εικόνα 4, 5 & 6: Αποικίες του παθογόνου σε υπόστρωμα (NA) & δοκιμές API 20NE; δενδρόγραμμα που δημιουργήθηκε με βάση τα μοριακά αποτυπώματα της Box-PCR

ΔΟΚΙΜΕΣ ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑΣ: Ο έλεγχος της παθογένειας πραγματοποιήθηκε με τεχνητές μόλυνσεις σε φυτά και κομμένους ώριμους καρπούς καρπούζιας και άλλων κολοκυνθοειδών. Παρατηρήθηκαν συμπτώματα παρόμοια με εκείνα των φυσικών μόλυνσεων από το παθογόνο, όπως κηλίωση και νέκρωση των ιστών στις θέσεις μόλυνσης σε καρπούς (καρπούζι, κολοκύθι, πεπόνι & πιπεριά), κοτυληδόνες ή/και φύλλα (καρπούζιας, μελιτζάνας & πιπεριάς) (Εικόνα 7, 8 & 9). Συμπτώματα δεν παρατηρήθηκαν σε φυτά τομάτα ή στον αρνητικό μάρτυρα.



(Εικόνα 7, 8 & 9: Αναπαραγωγή συμπτωμάτων σε καρπούς (καρπούζι, κολοκύθι, πεπόνι & πιπεριά), κοτυληδόνες & φύλλα (καρπούζιας, μελιτζάνας & πιπεριάς)

ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ: Από τα αποτελέσματα της εργασίας προέκυψε ότι το παθογόνο αίτιο της ασθένειας της καρπούζιας είναι το βακτήριο *Acidovorax citrulli*. Αν και το παθογόνο έχει ήδη αναφερθεί σε άλλες περιοχές της Ελλάδας είναι η πρώτη φορά που αναφέρεται στην Κρήτη. Το βακτήριο *Acidovorax citrulli* μεταφέρεται με το σπόρο και φαίνεται να αποτελεί πλέον ένα σοβαρό κίνδυνο για τα κολοκυνθοειδή στη Χώρα μας, ιδιαίτερα για τις φυτωριακές μονάδες αλλά και τους καλλιεργητές.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ: Burdman, S., Kots, N., Kritzman, G., and Kopelowitz, J. 2005. Molecular, physiological, and host-range characterization of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* isolates from watermelon and melon in Israel. Plant Dis. 89:1339-1347. Burdman, S & Walcott R. 2012. *Acidovorax citrulli*: generating basic and applied knowledge to tackle a global threat to the cucurbit industry . Molecular Plant Pathology, 13, 805-815. Holeva, M.C., Karafa, C.D., Glynos, P.E. and Alivizatos, A.S. (2010) *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* newly reported to cause bacterial fruit blight of watermelon in Greece. Plant Pathol. 59, 797.

Ταυτοποίηση βακτηριακών απομονώσεων από κολοκυνθοειδή με κλασικές και μοριακές μεθοδολογίες

3 Φωτογραφικό υλικό.

Ταυτοποίηση βακτηριακών απομονώσεων από κολοκυνθοειδή με κλασικές και μοριακές μεθοδολογίες



Εικόνα 21, 22 τεχνητές μολύνσεις σε φύλλα με βακτηριακά στελέχη του *Pseudomonas syringae*



Εικόνα 23, 24 τεχνητές μολύνσεις σε φύλλα με βακτηριακά στελέχη του *Pseudomonas syringae*



Εικόνα 25, 26 τεχνητές μολύνσεις σε φύλλα με βακτηριακά στελέχη του *Pseudomonas syringae*

Ταυτοποίηση βακτηριακών απομονώσεων από κολοκυνθοειδή με κλασικές και μοριακές μεθοδολογίες



Εικόνα 27, 28 τεχνητές μολύνσεις σε φύλλα με βακτηριακά στελέχη του *Pseudomonas syringae*

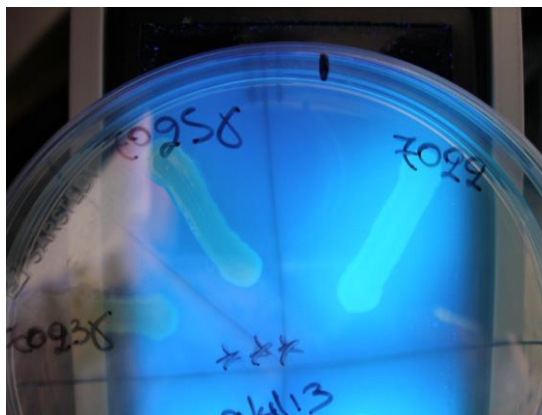


Εικόνα 29, 30 τεχνητές μολύνσεις σε φύλλα με βακτηριακά στελέχη του *Pseudomonas syringae*



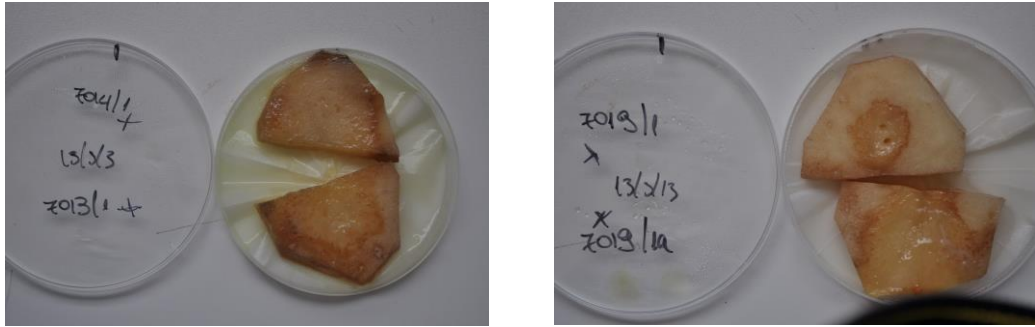
Εικόνα 31 τεχνητές μολύνσεις σε φύλλα με βακτηριακά στελέχη του *Pseudomonas syringae*

Ταυτοποίηση βακτηριακών απομονώσεων από κολοκυνθοειδή με κλασικές και μοριακές μεθοδολογίες

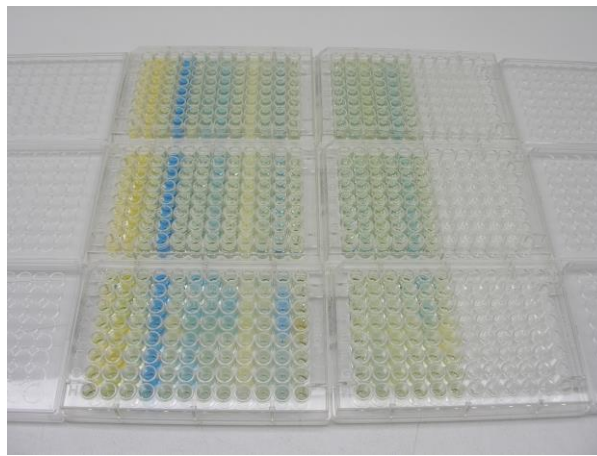


Εικόνα 32 έλεγχος φθορισμού με βακτηριακά στελέχη του *Pseudomonas viridiflava*

Ταυτοποίηση βακτηριακών απομονώσεων από κολοκυνθοειδή με κλασικές και μοριακές μεθοδολογίες



Εικόνα 33 , 34 Τεχνητές μολύνσεις σε ροδέλες πατάτας (σήψη) με βακτηριακά στελέχη του *Pseudomonas viridiflava*

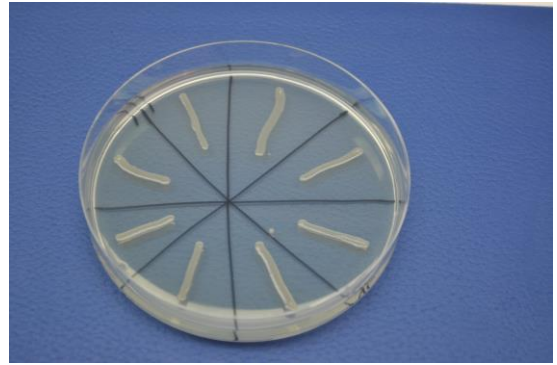
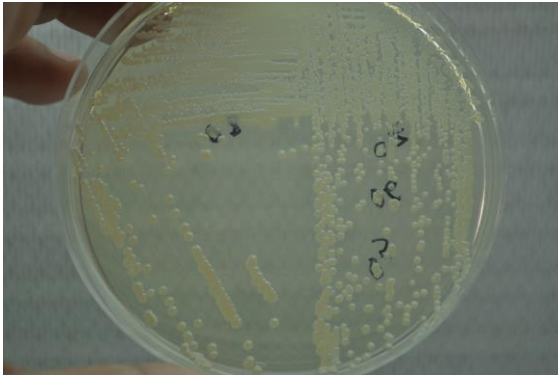


Εικόνα 35 έλεγχος χρησιμοποίησης σακχάρων σε πλάκες μικροτιτλοδότησης. Η αλλαγή χρώματος από πράσινο σε κίτρινο ή μπλε σε συνδιασμό με την ανάπτυξη θολερότητας υποδεικνύει τη χρησιμοποίηση του αντίστοιχου σακχάρου

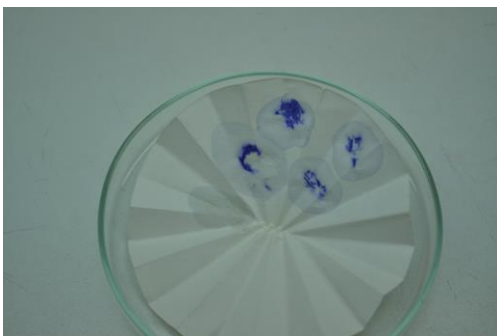


Εικόνα 36, 37 τεχνητές μολύνσεις σε φύλλα με βακτηριακά στελέχη του *Pseudomonas viridiflava*

Ταυτοποίηση βακτηριακών απομονώσεων από κολοκυνθοειδή με κλασικές και μοριακές μεθοδολογίες



Εικόνα 38, 39 αποικίες του βακτηρίου *Acidovorax citrulli*



Εικόνα 40 και Εικόνα 41 παραγωγή οξειδάσης με βακτηριακά στελέχη του *Acidovorax citrulli* και τεχνητές μολύνσεις σε φύλλα πεπονιάς με στελέχη του *Acidovorax citrulli*



Εικόνα 42, 43 τεχνητές μολύνσεις σε φύλλα πεπονιάς και καρπουζιάς με βακτηριακά στελέχη του *Acidovorax citrulli*