



**ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ
ΚΡΗΤΗΣ**

**ΣΧΟΛΗ
ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ**

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**« ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕΣΩ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑΣ
PCR ΚΑΙ REAL TIME PCR ΤΟΥ ΦΥΤΟΠΑΘΟΓΟΝΟΥ
ΒΑΚΤΗΡΙΟΥ *Clavibacter michiganensis ssp. sepedonicus* »**

ΙΩΑΝΝΙΔΗ ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ

ΕΙΣΗΓΗΤΗΣ: ΒΕΡΒΕΡΙΔΗΣ ΦΙΛΙΠΠΟΣ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ
ΟΚΤΩΒΡΙΟΣ, 2010

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η πτυχιακή αυτή δεν θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί χωρίς την συμμετοχή πολλών ανθρώπων, που νιώθω την βαθιά ανάγκη να ευχαριστήσω.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον εισηγητή καθηγητή Δρ. Βερβερίδη Φίλιππο για την ευκαιρία που μου έδωσε να εμπλακώ σε ερευνητική δραστηριότητα με την ανάθεση της πτυχιακής εργασίας αποκτώντας με αυτό τον τρόπο πολύτιμες εμπειρίες και βασικές γνώσεις σε εργαστηριακές τεχνικές, στο τομέα της βιοτεχνολογίας.

Μέρος των πειραμάτων διεξήχθησαν στο εργαστήριο Βακτηριολογίας με την πολύτιμη καθοδήγηση του Δρ. Γκούμα Δημήτριου. Η υποστήριξη και εμπιστοσύνη που μου επέδειξε καθώς και οι γνώσεις που μου μετέφερε στην διάρκεια εκτέλεσης της πτυχιακής μου εργασίας έχουν ανεκτίμητη αξία για μένα.

Ευχαριστώ θερμά τον Δρ. Τραντά Μάνο και Δρ. Σαρρή Παναγιώτη για τις πολύτιμες συμβουλές τους και υποδείξεις τους κατά την διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας της πτυχιακής και την Δρ. Στειακάκη Αίγλη για την πολύτιμη ηθική στήριξη.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους φίλους και τις φίλες μου για την αμοιβαία συμπαράσταση και την απεριόριστη στήριξη που μου πρόσφεραν

Η πτυχιακή αυτή αφιερώνεται στην οικογένειά μου και σε όλους τους καθηγητές που είχα σε όλες τις βαθμίδες εκπαίδευσης μου καθώς όλοι τους πίστεψαν στις δυνατότητες μου. Αν κάτι μένει, αυτό είναι η πίστη για το καλύτερο.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	4
A. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	6
A.1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	7
A.1.1 Γενικά.....	7
A.1.2 Το βακτήριο <i>Clavibacter michiganensis</i> spp. <i>sepedonicus</i>	9
A.1.3 Η ασθένεια της δακτυλιωτής σήψης της πατάτας.....	10
A.1.3.1 Τα συμπτώματα της δακτυλιωτής σήψης σε φυτά πατάτας.....	11
A.1.3.2 Συμπτώματα της δακτυλιωτής σήψης σε κονδύλους πατάτας	11
A.1.3.3.Τρόποι μετάδοσης του παθογόνου <i>Clavibacter michiganensis</i> ssp. <i>sepedonicus</i>	14
A.1.3.4 Αντιμετώπιση της ασθένειας δακτυλιωτής σήψης.....	14
A.1.4 Μέθοδοι ανίχνευσης και ταυτοποίησης βακτηρίων	15
A. 1.4.1 Η τεχνολογία της PCR.....	17
A. 1.4.2 Οι εφαρμογές της PCR στην Φυτοπαθολογία.....	19
A. 1.4.3 Η τεχνολογία της Real Time PCR.....	20
A. 1.4.3.1 Συστήματα για την ανίχνευση της ενισχυόμενης αλληλουχίας DNA.....	22
A 1.5 Η περίπτωση του <i>Clavibacter michiganensis</i> ssp. <i>sepedonicus</i>	25
A 1.6 Σκοπός της εργασίας.....	26
B. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	27
B.1 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	28
B 1.1 Αναλώσιμα υλικά.....	28
B.1.2 Βακτηριακά στελέχη και φυτικά εκχυλίσματα από κονδύλους πατάτας	29
B.1.3 Πειραματική διαδικασία-Μέθοδοι.....	30
B.1.3.1 Παρασκευή θρεπτικών υποστρωμάτων.....	30
B.1.3.2 Καλλιέργεια των βακτηριακών στελεχών του <i>C.m.s</i>	30
B.1.3.3 Τεστ ανοσοφθορισμού (Immunofluorescence test)	30
B.1.3.4 Επέμβαση με λυσοζύμη για την λύση των κυττάρων των βακτηριακών στελεχών του <i>C.m.s</i> . και των φυτικών εκχυλισμάτων κονδύλων πατάτας	31

B.1.3.5 Απομόνωση γενωμικού DNA από βακτηριακά στελέχη του <i>Clavibacter michiganensis</i> ssp. <i>sepedonicus</i> και από φυτικά εκχυλίσματα ασυμπτωματικών και υγιών κονδύλων πατάτας.....	32
B.1.3.6 Μέτρηση συγκέντρωσης απομονωθέντων DNA βακτηριακών στελεχών και φυτικών εκχυλισμάτων πατάτας	33
B.1.3.7 Ηλεκτροφόρηση DNA.....	33
B.1.3.8 Εκκινητές για τις αντιδράσεις PCR.....	34
B 1.3.9 Αντιδράσεις PCR και multiplex PCR.....	34
B.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	38
B.2.1 Αποτελέσματα ανοσοφθορισμού (IF test)	38
B.2.2 Αποτελέσματα μέτρησης συγκεντρώσεων των απομονωθέντων DNA με την χρήση νανόμετρου.....	38
B.2.3 Ανίχνευση απομονωθέντων DNA σε πήκτωμα αγαρόζης 1%.....	39
B.2.4 Αποτελέσματα αντίδρασης PCR σε γενωμικό DNA βακτηριακών στελεχών του <i>C.m.s.</i>	40
B.2.5 Αποτελέσματα της αντίδρασης PCR με τους εξειδικευμένους εκκινητές για το <i>Clavibacter miciganensis</i> ssp. <i>sepedonicus</i> σε φυτικό εκχύλισμα από κόνδυλο πατάτας για την ανίχνευση/ενίσχυση βακτηριακού σήματος	40
B.2.6 Αποτελέσματα αντίδρασης PCR για την ανίχνευση/ενίσχυση σήματος που προκύπτει από συντηρημένη αλληλουχία φυτικού DNA με εξειδικευμένους φυτικούς εκκινητές.....	41
B.2.7 Αποτελέσματα αντίδρασης πολλαπλής PCR σε φυτικά εκχυλίσματα από πιθανά μολυσμένους κόνδυλους πατάτας	42
B. 3 ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	45
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	48
B. 4 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	50

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η καλλιέργεια της πατάτας κατέχει την τέταρτη, σε οικονομική σημασία, θέση παγκοσμίως. Ο τόπος καταγωγής της είναι η Νότια Αμερική, όπου άγρια είδη της συναντώνται ακόμα και χρησιμοποιούνται για την παραγωγή γενετικά βελτιωμένων ποικιλιών. Ένα σημαντικό μέρος της παραγωγής πατάτας, παγκοσμίως, χάνεται από προσβολή των καλλιεργειών από φυτοπαθογόνους οργανισμούς. Εκτός από τους ιούς που ευθύνονται για το 50% των απωλειών παραγωγής, καταγράφονται απώλειες τα τελευταία χρόνια και από το φυτοπαθογόνο βακτήριο *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*. Το βακτήριο αυτό προκαλεί την **ασθένεια της δακτυλιωτής σήψης** σε φυτά και κονδύλους πατάτας και μόνο στην Ευρώπη οι εκτιμημένες ετήσιες απώλειες ανέρχονται σε 15 εκατομμύρια €.

Η δυσκολία αντιμετώπισης της ασθένειας εντοπίζεται στην μη έγκαιρη διάγνωση της καθώς φυτά προσβεβλημένα από την ασθένεια σπάνια παρουσιάζουν συμπτώματα στο χωράφι. Έτσι, το βακτήριο μεταφέρεται μέσω των ασυμπτωματικών κονδύλων σε νέες σπορές της καλλιέργειας και μέσω του πολλαπλασιαστικού υλικού εισήλθε και στη Ελλάδα. Η Ευρωπαϊκή Ένωση σε μια προσπάθεια ελέγχου της ασθένειας εξέδωσε την κοινοτική οδηγία 93/85/EEC όπου και περιγράφονται όλες οι μέθοδοι για την ανίχνευση του βακτηρίου σε φυτά και κονδύλους πατάτας. Οι ταχείες δοκιμές ανίχνευσης που χρησιμοποιούνται για την διαπίστωση της ύπαρξης του φυτοπαθογόνου μικροοργανισμού είναι ο ανοσοφθορισμός, η δοκιμή ELISA και η τεχνολογία της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης.

Η τεχνολογία της PCR έχει εξελιχθεί σε ένα πολύτιμο διαγνωστικό εργαλείο προσφέροντας έγκυρα αποτελέσματα σε πολύ μικρό χρονικό διάστημα ενώ οι διάφορες τεχνικές PCR που εφαρμόζονται στην φυτοπαθολογία είναι πολλές. Μία από τις τεχνικές αυτές είναι και η πολλαπλή PCR που πολλαπλασιάζει πολλά τμήματα επιθυμητού DNA σε μία μόνο αντίδραση. Στις νέες τεχνικές που εφαρμόζονται για την ανίχνευση του βακτηρίου *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* ανήκει και η

τεχνολογία Real Time PCR. Η μέθοδος αυτή επιτρέπει τον πολλαπλασιασμό, την ανίχνευση και την ποσοτικοποίηση ενός συγκεκριμένου τμήματος DNA δίνοντας έτσι την δυνατότητα της παρακολούθησης της πορείας της αντίδρασης σε πραγματικό χρόνο.

Σκοπός της εργασίας αυτής ήταν να χρησιμοποιηθεί η μέθοδος της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης και η τεχνολογία Real Time PCR σε δείγματα που είχαν παρασκευαστεί από κονδύλους ύποπτους για μόλυνση από το βακτήριο της δακτυλιωτής σήψης. Πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις πολλαπλής (multiplex) PCR σε σαράντα δύο φυτικά εκχυλίσματα εκ των οποίων δεκατρία βρέθηκαν θετικά στην μόλυνση από *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*, δεκαοχτώ δεν σχημάτισαν κανένα προϊόν ενώ σε έντεκα δείγματα δεν ανιχνεύθηκε το βακτήριο. Τα αποτελέσματα κατέδειξαν την μέθοδο της πολλαπλής PCR ως μια γρήγορη και έγκυρη τεχνική για την ανίχνευση του βακτηρίου της δακτυλιωτής σήψης.

A. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

A.1. Εισαγωγή

A.1.1 Γενικά

Η πατάτα (*Solanum tuberosum*, οικ. Solanaceae) αποτελεί μία από τις σημαντικότερες καλλιέργειες παγκοσμίως, μετά το σιτάρι, το καλαμπόκι και το ρύζι. Ο τόπος καταγωγής της είναι η Νότια Αμερική (Περού, Βολιβία), όπου άγρια είδη πατάτας συναντώνται ακόμη (Bradshaw et al., 1994). Στην Ευρώπη εισήχθη από τους Ισπανούς κατά τον 16^ο αιώνα και στην Ελλάδα κατά το 1830. Η έκταση της καλλιέργειας πατάτας στην Ελλάδα, καταλαμβάνει 460.000 στρέμματα ενώ η παραγωγή ανέρχεται στους 943.000 τόνους (Υπ. Αγροτικής Ανάπτυξης, 2010).

Δεδομένου ότι η πατάτα αποτελεί το τέταρτο σε κατανάλωση αγαθό παγκοσμίως, ο κίνδυνος για εισαγωγή επιβλαβών οργανισμών σε μια χώρα λόγω της αυξημένης διακίνησης φυτικού προϊόντος, είτε για άμεση κατανάλωση είτε ως πολλαπλασιαστικό υλικό έχει αυξηθεί σε επικίνδυνο βαθμό. Τέτοιοι οργανισμοί είναι έντομα, ακάρεα, νηματώδεις, βακτήρια, μύκητες, ιοί και φυτοπλάσματα οι οποίοι επηρεάζουν δυσμενώς καλλιέργειες οικονομικής σημασίας (όπως η καλλιέργεια της πατάτας) και δύνανται να προκαλέσουν ζημιές στο περιβάλλον και την χλωρίδα ενός τόπου.

Νομοθετικές ρυθμίσεις και μέτρα προστασίας για την αποφυγή εισαγωγής και εξάπλωσης επιβλαβών οργανισμών εφαρμόζονται στη χώρα μας και γενικότερα στην Ευρωπαϊκή Ένωση. **Στη περίπτωση που ένας επιβλαβής οργανισμός δεν έχει εντοπιστεί σε μια χώρα ή σε ένα γεωγραφικό μέρος της, τότε αυτός καθορίζεται ως «επιβλαβής οργανισμός καραντίνας» και χαρακτηρίζεται μέσω νομοθεσίας του κάθε κράτους και κοινοτικών οδηγιών από την Ευρωπαϊκή Ένωση (Παντελίδου, 2007).**

Πιο συγκεκριμένα, στη πατάτα τέτοια παθογόνα καραντίνας αποτελούν το βακτήριο *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* που προκαλεί την ασθένεια της δακτυλιωτής σήψης και το βακτήριο *Ralstonia solanacearum*, παθογόνο αίτιο για την ασθένεια της καστανής σήψης. Ωστόσο, σε ένα τέτοιο είδος ευρείας κατανάλωσης κρίνεται αναγκαία μια σύντομη αναφορά και στους υπόλοιπους εκείνους παράγοντες που ευθύνονται για την καταστροφή ενός σημαντικού ποσοστού της παραγωγής της πατάτας παγκοσμίως. Στον Πίνακα 1 παρουσιάζονται οι σημαντικότεροι ζωικοί εχθροί καθώς και φυτοπαθογόνα που προσβάλλουν την καλλιέργεια της πατάτας.

Πίνακας 1. Εχθροί και ασθένειες της καλλιέργειας πατάτας

ΖΩΙΚΟΙ ΕΧΘΡΟΙ	ΕΧΘΡΟΣ	ENTOMO
		Δορυφόρος της πατάτας
	Φθοριμαία της πατάτας	<i>Phthorimaea operculella</i>
	Αφίδα	<i>Myzus persicae</i>
	Έντομα εδάφους	<i>Agrotis sp. ,Agriotes</i>
ΜΥΚΗΤΟΛΟΓΙΚΕΣ ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ	ΑΣΘΕΝΕΙΑ	ΠΑΘΟΓΟΝΟ ΑΙΤΙΟ
	Περονόσπορος	<i>Phytophthora infestans</i>
	Αλτερναρίωση	<i>Alternaria solani</i>
	Ωίδιο	<i>Erysiphe cichoracearum</i> <i>Leveillula taurica</i>
	Σκληρωτινίαση	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> <i>S.minor</i>
	Ριζοκτονίαση	<i>Rhizoctonia solani</i>
	Βερτιτσιλλίωση	<i>Verticillium dahliae</i> <i>V. albo – atrum</i>
	Ξηρή σήψη	<i>Fusarium spp.</i>
ΒΑΚΤΗΡΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ	Δακτυλιωτή σήψη	<i>Clavibacter michiganensis ssp. sepedonicus</i>
	Καστανή σήψη	<i>Ralstonia solanacearum</i>
	Ακτινομύκωση	<i>Streptomyces scabies, Streptomyces acidiscabies</i>
	Μελάνωση λαιμού, σήψη στελέχους και κονδύλων, υγρή σήψη στελέχους	<i>Erwinia carotovora ssp. atroseptica, Erwinia carotovora ssp. carotovora, Erwinia chrysanthemi</i>
ΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ	Ιός X της πατάτας	Potato X potexvirus, PVX
	Ιός S της πατάτας	Potato S carlavirus, PSV
	Ιός Y της πατάτας	Potato Y potyvirus, PYV
	Ιός M της πατάτας	Potato M carlavirus, PMV
	Ιός του καρουλιάσματος των φύλλων πατάτας	Potato leafroll luteovirus, PLRV
ΝΗΜΑΤΩΔΕΙΣ	Κυστογόνοι νηματώδεις	<i>Globodera rostochiensis, G. pallida</i>
	Κομβονηματώδεις	<i>Meloidogyne incognita, M. halpa M. chitwoodi M. javanica</i>
ΜΗ ΜΕΤΑΔΙΔΟΜΕΝΕΣ ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ	Πρασίνισμα κονδύλων Σχίσμο κονδύλων Μελάνωση του κέντρου των κονδύλων Πάγωμα αποθηκευμένων κονδύλων	

Όπως γίνεται κατανοητό, τα αίτια που αναφέρονται στον Πίνακα 1 μπορούν να οδηγήσουν ακόμη και σε ολική καταστροφή μιας καλλιέργειας πατάτας σε περίπτωση

που δράσουν αθροιστικά. Υπολογίζεται ότι ένα 50% της παραγωγής πατάτας σε υπό ανάπτυξη και υπανάπτυκτες χώρες καταστρέφεται, ενώ οι ζημιές που προκαλούνται από ιώσεις είναι ισόποσες με αυτές που προκαλούνται από τους υπόλοιπους παθογόνους οργανισμούς. Στην περίπτωση του *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* αναφέρθηκαν απώλειες μέχρι και 50% της παραγωγής στη Βόρεια Αμερική και στη Ρωσία ενώ στη Ευρώπη οι εκτιμημένες ετήσιες απώλειες ανέρχονται σε 15 εκατομμύρια € (Γκούμας κ.α., 2001).

A.1.2 Το βακτήριο *Clavibacter michiganensis* spp. *sepedonicus*

Το βακτήριο *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* ταξινομείται στα *Firmicutes* και κατατάσσεται στην κλάση *Thallobacteria* η οποία περιλαμβάνει τα σημαντικότερα θετικά κατά Gram φυτοπαθογόνα βακτήρια. Το γένος *Clavibacter* χαρακτηρίζεται από πολυμορφικά, ραβδοειδούς σχήματος, αερόβια βακτηριακά κύτταρα με σχηματισμούς συχνά σε V, L, ή Y. Κάποια βακτήρια στερούνται μαστίγιων και δεν έχουν αυτόνομη κίνηση ενώ άλλα διαθέτουν δύο πολικά μαστίγια (Τζάμος, 2004). Το βακτήριο *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*, όπως προαναφέρθηκε, προκαλεί την ασθένεια της δακτυλιωτής σήψης στην πατάτα και έχει χαρακτηριστεί από τον Ευρωπαϊκό και Μεσογειακό Οργανισμό Προστασίας Φυτών (European and Mediterranean Plant Protection Organization) παθογόνο καραντίνας, κατηγορίας A2, ως έναν ιδιαίτερο επιβλαβή οργανισμό, δηλαδή, με δύσκολη αντιμετώπιση που έχει εμφανιστεί στα κράτη μέλη του Οργανισμού.

Το παθογόνο προτιμά ψυχρές και υγρές περιβαλλοντικές συνθήκες. Ως ξενιστής του βακτηρίου αναφέρεται μόνο η πατάτα (*Solanum tuberosum*) και πολύ σπάνια το ζαχαρότευτλο (*Beta vulgaris*) ενώ μετά από τεχνητή μόλυνση προσβάλλεται η τομάτα (*Lycopersicon esculentum*), η μελιτζάνα (*Solanum melongena*), η ελαιοκράμβη (*Brassica napus*), η αγριοκαρπουζιά (*S. rostratum*) και η τσουκνίδα (*Urtica dioica*). Το βακτήριο εμφανίζεται στο βόρειο μέρος της Ευρώπης (νότια της γραμμής Κίεβο – Βαρσοβία – Μόσχα). Στην Ελλάδα, η ασθένεια διαπιστώθηκε το 1997 στην περιοχή του Οροπεδίου Λασιθίου και στη συνέχεια στις περιοχές Μαλλίων και Μεσσαράς του νομού Ηρακλείου (Γκούμας κ.α., 2001). Το παθογόνο μπορεί να προκαλέσει σοβαρές απώλειες στην καλλιέργεια πατάτας (μια καλλιέργεια μεγάλης οικονομικής σημασίας

όπως προαναφέρθηκε) αν εισέλθει σε άλλες χώρες-μέλη του Ευρωπαϊκού και Μεσογειακού Οργανισμού Προστασίας Φυτών κι έτσι το κάθε κράτος θα πρέπει να λάβει μέτρα για την καταπολέμηση και την παρεμπόδιση της εξάπλωσης του παθογόνου οργανισμού (Παντελίδου, 2007).

A.1.3 Η ασθένεια της δακτυλιωτής σήψης της πατάτας

Η ασθένεια επικρατεί σε δροσερές και βόρειες περιοχές (Βόρεια Αμερική, Βόρειο Ευρώπη). Η ανάπτυξη και εξέλιξή της ευνοείται από θερμοκρασίες 17–22 °C. Το παθογόνο εισέρχεται στο φυτό μόνο διαμέσου πληγών, εγκαθίσταται στα ξυλώδη αγγεία όπου και πολλαπλασιάζεται. Προκαλείται με αυτό τον τρόπο φράξιμο των αγγείων, εμποδίζοντας το σύστημα μεταφοράς νερού και θρεπτικών ουσιών του φυτού, με συνέπεια τη μάρανση του με αργό ρυθμό. Τα βακτήρια, λόγω υπερβολικού πολλαπλασιασμού, μπορεί να βρεθούν έξω από τα αγγεία μολύνοντας, έτσι, και τους τριγύρω παρεγχυματικούς ιστούς οι οποίοι και καταστρέφονται. Οι ρίζες του φυτού αποτελούν άλλο ένα μέρος εισβολής του βακτηρίου (Agiros, 2005).



Εικόνα 1. Μάρανση στελεχών φυτού πατάτας από δακτυλιωτή σήψη (Αρχείο καθ. Γκούμα Δ., ΤΕΙ Κρήτης)

A.1.3.1 Τα συμπτώματα της δακτυλιωτής σήψης σε φυτά πατάτας

Η ασθένεια εκδηλώνεται με βραδεία μάρανση ενός ή περισσότερων στελεχών του ίδιου φυτού (Εικ. 1). Η μάρανση εμφανίζεται πρώτα στα κατώτερα φύλλα, μονόπλευρα ή ολόγυρα στο στέλεχος. Σε φύλλα που έχουν επηρεαστεί από την έμφραξη του αγγειώδους ιστού, και βρίσκονται σε χαμηλότερο τμήμα του στελέχους, αναπτύσσονται χλωρωτικές, κίτρινες και πορτοκαλί μεσονεύριες περιοχές. Όσα νεαρά φύλλα προσβάλλονται, συνεχίζουν να αυξάνονται με αποτέλεσμα να παραμορφώνονται. Σε προσβεβλημένους ιστούς, ωστόσο, το σύμπτωμα αυτό παρατηρείται σε μικρότερο βαθμό. Τα προσβεβλημένα φυλλάρια ή ολόκληρα σύνθετα φύλλα ή ακόμη και στελέχη ενδέχεται τελικώς να νεκρωθούν (Μπενάκειο Φυτοπαθολογικό Ινστιτούτο, 2006).

Συχνά, τα συμπτώματα της μάρανσης απουσιάζουν και παρατηρείται απλώς, μείωση του μεγέθους των φύλλων και των κονδύλων. Στα φυτά δεν εμφανίζεται μεταχρωματισμός των αγγείων, αλλά αν το μαραμμένο στέλεχος του φυτού κοπεί και πιεστεί στην βάση του, τότε παρατηρείται η έξοδος πυκνόρρευστου, κρεμώδους βακτηριακού υγρού (E.P.P.O., 2006).

Στις ευρωπαϊκές κλιματολογικές συνθήκες, τα συμπτώματα σπάνια εντοπίζονται στον αγρό. Τα προσβεβλημένα φυτά συνήθως, δεν εκδηλώνουν υπέργεια συμπτώματα μέχρι να αναπτυχθούν ολοκληρωτικά ή πολλές φορές τα συμπτώματα εμφανίζονται στο τέλος της καλλιέργειας, με αποτέλεσμα να συγχέονται ή να επικαλύπτονται από τα συμπτώματα άλλων ασθενειών, τη γήρανση ή και μηχανικές βλάβες (E.P.P.O., 2006). Υπάρχει ακόμη και το ενδεχόμενο, να μην εντοπιστούν τα συμπτώματα της ασθένειας στο χωράφι, στην περίπτωση που το φύλλωμα καταστρέφεται σχετικά νωρίς, ώστε να αποφευχθούν ιολογικές προσβολές της καλλιέργειας (Γκούμας κ.α., 2001).

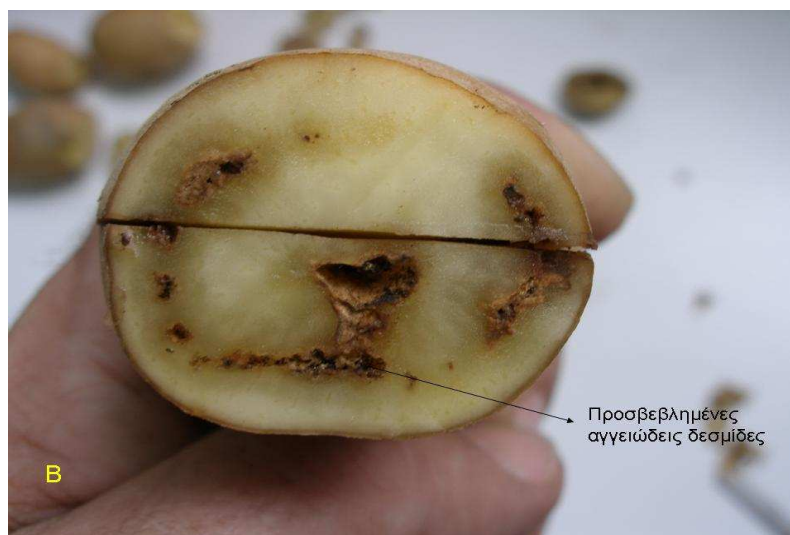
A.1.3.2 Συμπτώματα της δακτυλιωτής σήψης σε κονδύλους πατάτας

Η ασθένεια εκδηλώνεται σε ένα ή περισσότερους κονδύλους στο ίδιο φυτό. Τα συμπτώματα αρχίζουν να αναπτύσσονται κοντά στο σημείο πρόσφυσης του στολονίου με ελαφρώς υαλώδη εμφάνιση ή διαφάνεια των ιστών, χωρίς να παρατηρείται σήψη των ιστών γύρω από το αγγειώδες σύστημα. Ο αγγειώδης δακτύλιος αποκτά υποκίτρινο χρωματισμό και αν συμπιεστεί ο κόνδυλος εκκρίνεται από τα αγγεία γαλακτώδες, άοσμο, βακτηριακό υγρό, τυρώδους υφής (Εικ. 2Α).



Εικόνα 2Α. Έκκριση βακτηριακού υγρού σε προσβεβλημένο κόνδυλο πατάτας από δακτυλιωτή σήψη (Αρχείο καθ. Γκούμα Δ., ΤΕΙ Κρήτης)

Όσο η ασθένεια προχωρά, δημιουργούνται κοιλότητες μεταξύ της αγγειώδους μοίρας και του φλοιώδους παρεγχύματος, σχηματίζοντας έτσι, έναν περιμετρικό δακτύλιο (Εικ. 2Β). Σε προχωρημένα στάδια προσβολής, εμφανίζονται ρωγμές στην επιφάνεια των κονδύλων, τα όρια των οποίων είναι συχνά καστανοκόκκινα.



Εικόνα 2Β. Συμπτώμα δακτυλιωτής σήψης σε κόνδυλο πατάτας (Αρχείο καθ. Γκούμα Δ., ΤΕΙ Κρήτης)

Η σήψη, που προκαλείται από το *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*, συγγέται εύκολα, με σήψεις που προκαλούν άλλα φυτοπαθογόνα βακτήρια και μύκητες. Το χαρακτηριστικό σύμπτωμα της δακτυλιωτής σήψης, στους προσβεβλημένους κονδύλους, είναι ο καφές δακτύλιος των αγγειώδων δεσμίδων από τον οποίο, συχνά με πίεση, εξέρχεται βακτηριακό έκκριμα χρώματος άσπρου έως ανοικτού κίτρινου. Αντίθετα, η μόλυνση από το βακτήριο της κασταλής σήψης *Ralstonia solanacearum* δίνει καφέ έκκριμα ενώ τα είδη του γένους *Erwinia* δεν δημιουργούν, συνήθως, δακτύλιο. Μολύνσεις από μύκητες του γένους *Fusarium* και *Verticillium* δεν δίνουν ποτέ βλενώδες έκκριμα και συχνά συνοδεύονται από την παρουσία μυκηλίου (Τζάμος, 2004). Ωστόσο, όταν λαμβάνουν χώρα δευτερογενείς μολύνσεις στους κονδύλους, από τα βακτήρια και τους μύκητες, που αναφέρθηκαν παραπάνω, δύσκολα διακρίνονται τα προχωρημένα σταδίου συμπτώματα της δακτυλιωτής σήψης (Εικ. 3). Τα συμπτώματα της ασθένειας δεν εκδηλώνονται σε ευπαθείς και ανεκτικές ποικιλίες σε περίπτωση ήπιας προσβολής. Οι ποικιλίες αυτές θεωρούνται ασυμπτωματικοί φορείς της ασθένειας (E.P.P.O, 2006).



Εικόνα 3. Κόνδυλοι πατάτας με συμπτώματα προχωρημένου σταδίου δακτυλιωτής σήψης (Αρχείο καθ. Γκούμα Δ., ΤΕΙ Κρήτης)

A.1.3.3 Τρόποι μετάδοσης του *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*

Το παθογόνο μεταδίδεται σε άλλα υγιή φυτά ή φυτικά προϊόντα και σε αμόλυντες περιοχές με πολλούς τρόπους, η γνώση των οποίων οδηγεί σε αποτελεσματική αντιμετώπιση και ουσιαστικό έλεγχο της ασθένειας. Το μολυσμένο πολλαπλασιαστικό υλικό και οι ασυμπτωματικοί μολυσμένοι κόνδυλοι που χρησιμοποιούνται για σπορά (πατατόσπορος) αποτελούν το κυριότερο μέσο μετάδοσης της ασθένειας. Το βακτήριο μεταδίδεται συνήθως με την επαφή μολυσμένων και υγιών αλλά τραυματισμένων, κυρίως, κονδύλων. Τα μαχαιρίδια που χρησιμοποιούνται στο τεμαχισμό των κονδύλων συμβάλλουν στην μετάδοση του παθογόνου καθώς και όλα τα μέσα συγκομιδής, διαλογής και επεξεργασίας πατατόσπορου, ειδικά στην περίπτωση που αυτά χρησιμοποιούνται από περισσότερους παραγωγούς. Μολυσμένα μέσα αποθήκευσης όπως σάκοι, κιβώτια, μολυσμένοι τοίχοι ή επιφάνειες αποθηκών με αποξηραμένα υπολείμματα βακτηριακού υγρού είναι άλλος ένας τρόπος μετάδοσης του βακτηρίου. Τα φυτικά υπολείμματα, οι κόνδυλοι που παραμένουν στο χωράφι και δίνουν τα «φυτά εθελοντές», προερχόμενα από μολυσμένες καλλιέργειες πατάτας, όπως και πολλά ζιζάνια ως ασυμπτωματικοί ξενιστές, επιτρέπουν στο βακτήριο να διαχειμάζει στον αγρό και να μεταδίδεται εκ νέου στις καλλιέργειες (Γζάμος, 2004).

A.1.3.4 Αντιμετώπιση της ασθένειας δακτυλιωτής σήψης

Καθώς η ασθένεια δεν μπορεί να αντιμετωπιστεί με χημικά μέσα, ο περιορισμός της εμφάνισης και ανάπτυξης της ασθένειας επιτυγχάνεται με μέτρα φυτουγεινής. Οι γενικές οδηγίες αντιμετώπισης βακτηριώσεων ισχύουν και για την ασθένεια της δακτυλιωτής σήψης, έτσι συστήνονται κατάλληλα καλλιεργητικά μέτρα από την έναρξη της καλλιέργειας ως την διάθεση της παραγωγής.

Αυτά αφορούν πρωταρχικά, στην χρησιμοποίηση υγιούς πιστοποιημένου πατατόσπορου. Ο παραγωγός οφείλει να επιλέγει πιστοποιημένο σπόρο από το κράτος, καθώς, οι σπόροι αυτοί είναι απαλλαγμένοι από το παθογόνο. Σε κάθε περίπτωση, η σήμανση των σάκων συσκευασίας πρέπει να διατηρείται μέχρι τη διάθεση της παραγωγής, για ενδεχόμενη αναφορά προβλήματος (Δημητράκης, 1998). Η εφαρμογή αμειψισποράς για 2-3 χρόνια με ταυτόχρονη καταστροφή των αυτοφυών φυτών

πατάτας και αυτοφυών ζιζανίων, φυτών που ανήκουν στην οικογένεια Solanaceae και του φυτού *Beta vulgaris*, αποτελεί ένα σημαντικό μέτρο για τον έλεγχο της ασθένειας.

Τα καλλιεργητικά μέτρα που εφαρμόζονται επιπρόσθετα για την πρόληψη της ασθένειας είναι τα εξής : η φύτευση να γίνεται όταν το έδαφος βρίσκεται στο «ρόγο» του, το έδαφος να είναι κατάλληλα προετοιμασμένο με καλή στράγγιση και μέχρι το φύτευμα του πατατόσπορου, τα ποτίσματα θα πρέπει να περιορίζονται στα απολύτως απαραίτητα. Η λίπανση θα πρέπει να είναι ισορροπημένη και να αποφεύγονται οι υπερβολικές αζωτούχες λιπάνσεις ενώ θα πρέπει να γίνεται καταπολέμηση των ζιζανίων. Τα προσβεβλημένα φυτά πρέπει να απομακρύνονται από την καλλιέργεια και να καταστρέφονται με φωτιά. Η συλλογή των κονδύλων πρέπει να γίνεται όταν το έδαφος δεν έχει υπερβολική υγρασία και η αποθήκευσή τους να γίνεται σε ξηρό, καλά αεριζόμενο και ψυχρό περιβάλλον. Τέλος, όλα τα μέσα καλλιέργειας, αποθήκευσης και μεταφοράς θα πρέπει να απολυμαίνονται σχολαστικά με διάλυμα φορμαλδεΐδης εμπορίου, συγκέντρωσης 2 – 5 % (Γκούμας κ.α., 2001).

Η κάθε καλλιέργεια πατάτας και η παραγωγή της, λόγω της κατάστασης καραντίνας θα πρέπει να ελέγχεται και σε περίπτωση μόλυνσης της καλλιέργειας θα πρέπει να ενημερώνονται οι αρμόδιες υπηρεσίες.

A.1.4 Μέθοδοι ανίχνευσης και ταυτοποίησης βακτηρίων

Για την ανίχνευση και ταυτοποίηση βακτηρίων εφαρμόζονται διάφορες εργαστηριακές τεχνικές. Σε κάθε περίπτωση, η επιλεγμένη μέθοδος θα πρέπει να χαρακτηρίζεται από ακρίβεια αποτελεσμάτων, να ανιχνεύει επαρκή πληθυσμό του βακτηρίου, να είναι συγκεκριμένη για το υπό εξέταση βακτήριο και να δίνει αξιόπιστα αποτελέσματα σε σύντομο χρονικό διάστημα και με το μικρότερο δυνατό κόστος (Mills et al., 2003).

Αρχικά, το υπό μελέτη βακτήριο απομονώνεται από το προσβεβλημένο φυτικό υλικό και μεταφέρεται σε αποστειρωμένο θρεπτικό υπόστρωμα. Αφού επιτευχθεί η καθαρή καλλιέργεια του βακτηρίου, πραγματοποιούνται βασικές βακτηριολογικές δοκιμές, όπως η χρώση κατά Gram, η διαλυτότητα KOH, με σκοπό την ταξινόμηση του βακτηρίου (θετικό κατά Gram ή αρνητικό κατά Gram). Ακολουθεί στην συνέχεια η μελέτη των βιοχημικών και φυσιολογικών χαρακτήρων του βακτηρίου.

Για την ανίχνευση των φυτοπαθογόνων βακτηρίων σε μολυσμένο πολλαπλασιαστικό υλικό ή φυτικό υλικό χρησιμοποιούνται οι ορολογικές μέθοδοι και η τεχνολογία της PCR. Οι ορολογικές μέθοδοι άρχισαν να χρησιμοποιούνται, ως διαγνωστικά εργαλεία, στα τέλη της δεκαετίας του '70 (Agiros, 2005) και στηρίζονται στην ιδιότητα που έχει ένα αντισώμα να αναγνωρίζει και να δεσμεύει ένα ειδικό και αποκλειστικό για το αντίσωμα, αντιγόνο. Στις ορολογικές μεθόδους συγκαταλέγεται ο ανοσοφθορισμός και η δοκιμή ELISA που αναλύονται στην συνέχεια:

- Ανοσοφθορισμός (Immunofluorescence test): Στην τεχνική αυτή το αντίσωμα συνδέεται με μία φθορίζουσα ουσία (methyl isothiocyanate of fluorescein). Το αντίσωμα που έχει σημειωθεί αναγνωρίζει τον αντίστοιχο μοριακό στόχο και τα αποτελέσματα της αντίδρασης παρατηρούνται μέσω μικροσκοπίου επισκοπικού φθορισμού. Το γεγονός ότι η αντίδραση μπορεί να λάβει χώρα είτε απευθείας πάνω στους ιστούς του φυτού είτε πάνω σε αντικειμενοφόρο πλάκα διαφοροποιεί την τεχνική με την δοκιμή ELISA (Γκούμας, 2005).
- Δοκιμή ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay): Η μέθοδος αυτή βασίζεται στη δημιουργία συμπλόκου μεταξύ ενός αντισώματος και ενός ενζύμου και στην δεσμευτική ικανότητα αντιγόνου-αντισώματος. Η δοκιμή αυτή εκτελείται μέσα σε κυψελίδες πλακών τιτλοδότησης οι οποίες είναι κατασκευασμένες από ειδικό υλικό που επιτρέπει την προσκόλληση των αντιγόνων ή των αντισωμάτων. Η μέθοδος αναπτύχθηκε στην δεκαετία του '60 με σκοπό να αντικαταστήσει την τεχνική της ράδιοανοσοδοκιμής (radioimmunoassay) που χρησιμοποιούσε εκείνη την εποχή, αντισώματα με ραδιενεργή σήμανση. Προκειμένου να αντιμετωπιστούν οι κίνδυνοι (που προέκυπταν από την χρήση ραδιενέργειας για την σήμανση των αντισωμάτων) που αφορούσαν την ασφάλεια και υγεία των ερευνητών, την διαχείριση των ραδιενεργών αποβλήτων αλλά και το υψηλό κόστος για την δημιουργία ειδικών εγκαταστάσεων δημιουργήθηκε η ιδέα για την σήμανση των αντισωμάτων με ένζυμα (Lequin, 2005). Η δοκιμή ELISA παρέχει την δυνατότητα εξέτασης μεγάλου αριθμού δειγμάτων και δίνει ποιοτικά και ποσοτικά αποτελέσματα.

Με την ταυτόχρονη ανάπτυξη της μοριακής βιολογίας και μοριακής φυτοπαθολογίας άρχισαν να εφαρμόζονται νέες τεχνικές, όπως η μέθοδος της

αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης και πιο πρόσφατα η τεχνική της Real Time PCR .

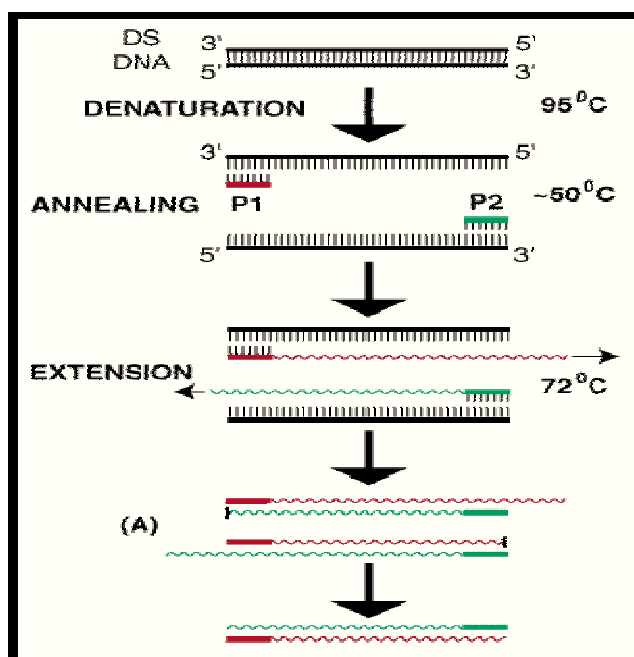
A.1.4.1 Η τεχνολογία της PCR

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) είναι μια μέθοδος που επιτρέπει την εκθετική ενζυμική ενίσχυση μικρών αλληλουχιών DNA χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα ένα μεγαλύτερο δίκλωνο μόριο DNA. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται με τη βοήθεια του ενζύμου DNA πολυμεράση και δύο ειδικών εκκινητών (primers), οι οποίοι είναι συμπληρωματικοί στην αλληλουχία των ακρών του επιθυμητού τμήματος DNA. Η αντίδραση PCR πραγματοποιείται σε τρία κύρια βήματα (Εικ. 4) τα οποία επαναλαμβάνονται σε 20 έως 40 κύκλους. Κάθε κύκλος περιλαμβάνει τα εξής βήματα :

- 1) **Αποδιάταξη** του δίκλωνου DNA στους 95 °C (denaturation)
- 2) **Αναδιάταξη** στους 50 – 60 °C (annealing)
- 3) **Επιμήκυνση** στους 72 °C (extension)

Στο πρώτο στάδιο (αποδιάταξη DNA), διαχωρίζονται οι δύο αλυσίδες του δίκλωνου DNA στόχου με θέρμανση στους 95 °C. Ακολουθεί, στο δεύτερο στάδιο της αναδιάταξης, ο υβριδισμός των εκκινητών στις συμπληρωματικές αλληλουχίες των αλυσίδων που διαχωρίστηκαν στο πρώτο στάδιο, με μείωση της θερμοκρασίας στους 50 – 60 °C. Στο τρίτο και τελευταίο στάδιο (επιμήκυνση) γίνεται η σύνθεση των συμπληρωματικών αλυσίδων με την δράση της DNA πολυμεράσης, η οποία προσθέτει τα νουκλεοτίδια (dNTPs) στο 3' άκρο των εκκινητών, ενώ η θερμοκρασία αυξάνεται στους 72 °C.

Η DNA πολυμεράση είναι ένα ένζυμο που έχει απομονωθεί από το θερμοφίλο βακτήριο *Thermus aquaticus* και έχει την ιδιότητα να αντέχει την υψηλή θερμοκρασία που απαιτείται για την μετουσίωση του DNA χωρίς να χάνει την ενεργότητα του. Η θερμοσταθερή αυτή πολυμεράση παρουσιάζει το μειονέκτημα της δημιουργίας λαθών στα παραγόμενα αντίγραφα. Για το λόγο αυτό έχουν δημιουργηθεί τροποποιημένα ένζυμα που διαθέτουν επιδιορθωτική ικανότητα (3' προς 5' ενεργότητα εξωνουκλεάσης) και παρέχουν υψηλή πιστότητα με την παραγωγή προϊόντων PCR χωρίς λάθη στην αλληλουχία τους (Βερβερίδης κ.α., 2003)



Εικόνα 4. Τα κύρια βήματα της PCR. Αποδιάταξη (denaturation) του DNA στους 95 °C, αναδιάταξη (annealing) με υβριδισμό των εκκινητών στις συμπληρωματικές αλυσίδες του DNA και σύνθεση των νέων μορίων DNA (extension).

Η όλη διαδικασία της αντίδρασης PCR εκτελείται με ένα αυτοματοποιημένο θερμικό κυκλοποιητή (Εικ. 5), ο οποίος θερμαίνει και ψύχει τα δοκιμαστικά σωληνάκια (tubes) σε πολύ μικρό χρονικό διάστημα (Βερβερίδης κ.α., 2003). Στη συνέχεια, ακολουθεί η ανάλυση των προϊόντων της PCR σε πήκτωμα αγαρόζης.



Εικόνα 5. Θερμικός κυκλοποιητής της εταιρίας EPPENDORF (Eppendorf, 2001)

Η επιτυχία μιας αντίδρασης PCR κρίνεται από πολλές παραμέτρους. Η αλληλουχία και η συγκέντρωση των εκκινητών συσχετίζεται άμεσα με την επιτυχία της δοκιμής. Οι

εκκινητές θα πρέπει να σχεδιάζονται έτσι ώστε να έχουν μήκος 18-24bp, να μην περιέχουν καμία δευτερεύουσα δομή, η αναλογία γουανίνης προς κυτοσίνη να κυμαίνεται μεταξύ 40-60%, και να υπάρχει ισόρροπη κατανομή αδενίνης, θυμίνης και γουανίνης, κυτοσίνης. Η θερμοκρασία αποδιάταξης (T_m , melting temperature), θα πρέπει να είναι ίδια για το ζεύγος των εκκινητών και να έχει τιμή μεταξύ 55°-65 °C ώστε να επιτρέπεται ο υβριδισμός τους στις συμπληρωματικές αλληλουχίες του DNA στόχου. Η συγκέντρωση του ενζύμου της DNA πολυμεράσης θα πρέπει να κυμαίνεται από 0,5-2,5 u/μl, διαφορετικά η αυξημένη συγκέντρωση του ενζύμου οδηγεί σε μείωση της ακρίβειας των αποτελεσμάτων της αντίδρασης (Roche, 1999).

Το διάλυμα των τριφωσφορικών δεσοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs) αποτελείται από τα νουκλεοτίδια ATP, TTP, CTP, GTP, τα οποία είναι απαραίτητα για την σύνθεση των συμπληρωματικών αλυσίδων κλώνων. Το διάλυμα αυτό θα πρέπει να περιέχει ίσες ποσότητες από κάθε νουκλεοτίδιο, ώστε να μην επηρεάζεται η δράση του ενζύμου. Αυξημένη συγκέντρωση του διαλύματος των dNTPs σε μια αντίδραση PCR, οδηγεί σε μείωση των ελευθέρων ιόντων Mg^{+2} και συνεπώς επηρεάζει την ενζυμική δραστηριότητα της DNA πολυμεράσης. Η σύνδεσης των εκκινητών με τις συμπληρωματικές αλυσίδες του επιθυμητού τμήματος DNA μπορεί να μειωθεί, με την χρήση αυξημένης συγκέντρωσης διαλύματος dNTPs (Roche, 1999).

A.1.4.2 Οι εφαρμογές της PCR στην Φυτοπαθολογία

Η επαναστατική αυτή μέθοδος βρήκε πληθώρα εφαρμογών στη φυτοπαθολογία και μέχρι σήμερα χρησιμοποιείται για την ανίχνευση και ταυτοποίηση βακτηρίων με τις παρακάτω παραλλαγές:

- ITS (Internal Transcribed Spacer) PCR: χρησιμοποιούνται εκκινητές που πολλαπλασιάζουν τμήματα σε εσωτερικά μεταγραφόμενα διαστήματα που βρίσκονται σε περιοχές του γονιδιώματος των βακτηρίων (Li et al., 1995).
- Multiplex PCR: χρησιμοποιείται πάνω από ένα ζεύγος εκκινητών, ειδικοί για το κάθε βακτήριο και πολλαπλασιάζονται επιθυμητές αλληλουχίες – στόχοι, σε ένα μείγμα αντίδρασης (Pastrok, 2000).

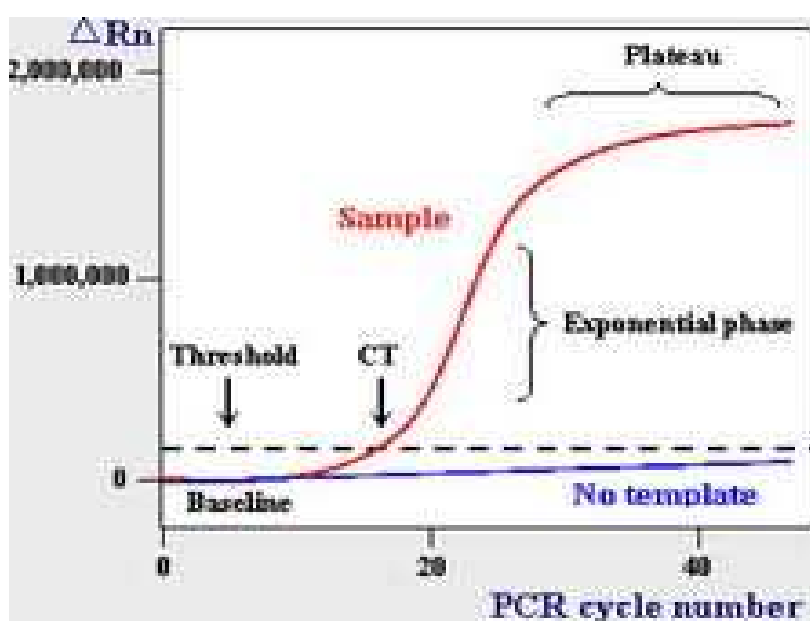
- BOX PCR: χρησιμοποιείται ως DNA – στόχος το 154 bp BOX στοιχείο, αλληλουχία που επαναλαμβάνεται στο γονιδίωμα των περισσότερων αρνητικών κατά Gram και ορισμένων θετικών κατά Gram βακτηρίων (Rademaker et al., 1997).
- ERIC PCR: χρησιμοποιούνται εκκινητές συμπληρωματικοί με την αλληλουχία ERIC (enterobacterial repetitive intergenic consensus sequence) (Rademaker et al., 1997).
- Rep PCR: χρησιμοποιούνται εκκινητές συμπληρωματικοί με την αλληλουχία REP (repetitive extragenic palindromic sequence) (Rademaker et al., 1997).
- Bio PCR: Η τεχνική αυτή μπορεί να εφαρμοστεί σε δείγματα φυτικών ή ζωϊκών κυττάρων και σε δείγματα μικροοργανισμών όπως βακτήρια, μύκητες, ιούς, πλασμίδια και μυκοπλάσματα. Επιτρέπει την ανίχνευση επιθυμητών μορίων μόνο σε ζωντανά κύτταρα του δείγματος με άμεση (Direct) nested PCR, ξεπερνώντας τα εμπόδια που εμφανίζονται από την παρουσία παρεμποδιστών λόγω της φύσης του δείγματος (π.χ. χώμα) στην αντίδραση PCR και χωρίς να πραγματοποιείται απομόνωση DNA από το δείγμα (Schaad et al., 1995).
- RAPD PCR: χρησιμοποιούνται εκκινητές μήκους 12- 20 νουκλεοτιδίων για την ενίσχυση τυχαίων τμημάτων DNA. Στη συνέχεια ακολουθεί αλληλούχιση των προϊόντων της PCR, αφού προηγουμένως καθαριστούν από το πήκτωμα αγαρόζης (Schaad et al., 2002).
- RT – PCR: Πριν την εφαρμογή της αντίδρασης PCR, χρησιμοποιείται το ιϊκό ένζυμο αντίστροφη μεταγραφή (reverse transcriptase) ώστε να μετατραπεί το απομονωθέν mRNA σε συμπληρωματικό DNA (cDNA) (Βερβερίδης κ.α., 2003).

A.1.4.3 Η τεχνολογία της Real Time PCR

Η τεχνολογία της Real Time PCR, ως διαγνωστικό εργαλείο στην μοριακή φυτοπαθολογία, εφαρμόστηκε για πρώτη φορά για την ανίχνευση του ιού καρουλιάσματος των φύλλων (Potato Leaf Roll Luteovirus) σε κονδύλους πατάτας (Mumford et al., 2006).

Η μέθοδος αυτή είναι μία παραλλαγή της συμβατικής PCR, η οποία διαφοροποιείται σε σημαντικό βαθμό, σε οτιδήποτε αφορά την απόδοση των αποτελεσμάτων. Η εφαρμογή της Real Time PCR επιτρέπει, εκτός από τον πολλαπλασιασμό του

επιθυμητού τμήματος γενετικού υλικού και την ποσοτικοποίηση του σε πραγματικό χρόνο. Η μέτρηση της ποσότητας του προϊόντος πραγματοποιείται καθ' όλη τη διάρκεια της αντίδρασης, μέσω της παρακολούθησης της αύξησης φθορισμού μιας φθορίζουσας ουσίας, με την οποία έχουν σημειωθεί τα παραγόμενα αντίγραφα. Ο φθορισμός μετρείται σε κάθε κύκλο της PCR με αποτέλεσμα να προκύπτει μία καμπύλη ενίσχυσης (amplification plot) (Εικ. 6). Η αύξηση της σήμανσης του φθορισμού είναι ανάλογη του συντιθέμενου προϊόντος και σχετίζεται άμεσα με την ποσότητα του αρχικού υποστρώματος.



Εικόνα 6. Χαρακτηριστική καμπύλη ενίσχυσης με τις τρεις φάσεις της αντίδρασης Real Time PCR. Στον άξονα x απεικονίζεται ο αριθμός των κύκλων της αντίδρασης ενώ στον άξονα y το μέγεθος του σήματος φθορισμού κατά την διάρκεια της PCR,κάθε χρονική στιγμή (RT PCR Research, 2004).

Η καμπύλη ενίσχυσης διακρίνεται σε τρεις φάσεις: την εκθετική (exponential), τη γραμμική (linear) και τη φάση κορεσμού (plateau) (Εικ.6). Κατά την εκθετική φάση, σε κάθε κύκλο της αντίδρασης πραγματοποιείται ακριβής διπλασιασμός της επιλεγμένης αλληλουχίας, καθώς όλα τα απαραίτητα αντιδραστήρια (εκκινητές, πολυμεράση, dNTPs) βρίσκονται σε περίσσεια. Στη συνέχεια της αντίδρασης επέρχεται η γραμμική φάση. Στη φάση αυτή κάποια από τα αντιδραστήρια αρχίζουν να εξαντλούνται, ενώ παράλληλα συσσωρεύονται σταδιακά αναστολείς (Hunt, 2009). Στη συγκεκριμένη φάση, η διαδικασία της ενίσχυσης αντιγράφων επιβραδύνεται για να σταματήσει τελικά

στη φάση κορεσμού. Το σημείο κορεσμού διαφέρει μεταξύ των δειγμάτων προς ανάλυση και εξαρτάται από τις κινητικές των αντιδράσεων τους (Stratagene, 2006).

Οι μετρήσεις για την ποσοτικοποίηση αφορούν την εκθετική φάση της αντίδρασης ενώ σημαντική παράμετρο αποτελεί η τιμή Ct (threshold cycle). Η τιμή Ct αντιπροσωπεύει τον αριθμό των κύκλων της αντίδρασης που απαιτούνται ώστε η τιμή του παρατηρούμενου φθορισμού να προσεγγίζει ένα συγκεκριμένο όριο (threshold). Η τιμή Ct είναι αντιστρόφως ανάλογη της αρχικής ποσότητας υποστρώματος δηλαδή όσο μικρότερη είναι η τιμή Ct τόσο υψηλότερη είναι η συγκέντρωση του αρχικού υποστρώματος.

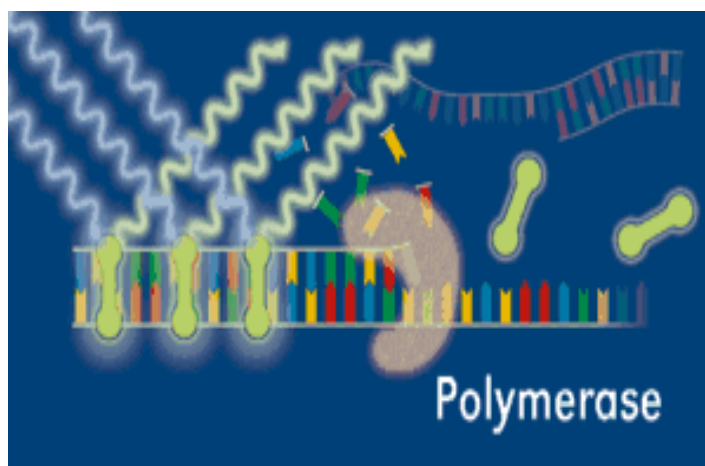
A.1.4.3.1 Συστήματα για την ανίχνευση της ενισχυόμενης αλληλουχίας DNA

Για την ανίχνευση της ενισχυόμενης αλληλουχίας χρησιμοποιούνται τα μη ειδικά και τα ειδικά συστήματα ανίχνευσης. Στην πρώτη περίπτωση ανιχνεύονται όλα τα δίκλινα μόρια που ενισχύθηκαν στην αντίδραση με την χρήση χρωστικών που παρεμβάλλονται μεταξύ των ζευγών βάσεων σε δίκλινο DNA (DNA binding dyes).

Η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη χρωστική είναι η SYBR Green I. Η ουσία αυτή δεν φθορίζει όταν βρίσκεται ελεύθερη σε διάλυμα ενώ όταν ενσωματώνεται στο DNA, κατά την σύνθεσή του παράγει φθορισμό (Εικ. 7). Η ένταση του φθορισμού είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του παραγόμενου προϊόντος.

Το μεγαλύτερο πλεονέκτημα της χρωστικής αυτής είναι η δυνατότητα χρήσης της με οποιοδήποτε ζεύγος εκκινητών, γεγονός που την καθιστά πιο οικονομική μέθοδο από την χρήση ιχνηλατών. Ωστόσο με αυτή την μέθοδο, λόγω της πρόσδεσης της χρωστικής σε όλα τα παραγόμενα δίκλινα μόρια DNA μπορεί εύκολα προκύψουν λανθασμένα αποτελέσματα, καθώς μπορεί να συμπεριληφθούν και μη ειδικά προϊόντα που παράγονται αλλά και διμερή εκκινητών. Το πρόβλημα αυτό αντιμετωπίζεται με τον σωστό σχεδιασμό των εκκινητών καθώς και με την βελτιστοποίηση των συνθηκών της αντίδρασης, ώστε να αποφευχθεί η δημιουργία διμερών των εκκινητών. Επιπλέον, η μελέτη των καμπύλων αποδιάταξης (melting curves) μετά το τέλος της αντίδρασης δίνει την δυνατότητα διαχωρισμού του φθορισμού που προέκυψε από την ενίσχυση της

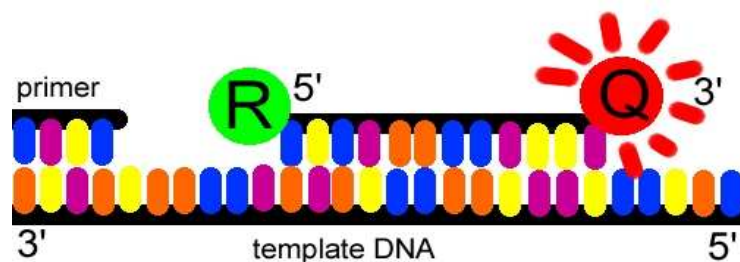
επιθυμητής αλληλουχίας από τους φθορισμούς που οφείλονται σε διμερή εκκινητών ή σε μη ειδικά προϊόντα.



Εικόνα 7. Μόρια SYBR Green I δεσμευμένα σε ενισχυμένο DNA (Gene Quantification, 2003)

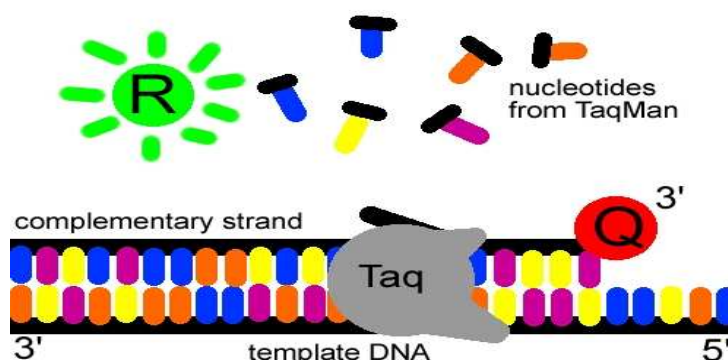
Στη δεύτερη περίπτωση επιτυγχάνεται διαχωρισμός της ενισχυόμενης επιθυμητής αλληλουχίας από τυχόν ειδικά προϊόντα που ενισχύονται και από πιθανά διμερή των εκκινητών. Αυτό πραγματοποιείται με την χρήση ολιγονουκλεοτιδίων ιχνηλατών (probes). Τα ολιγονουκλεοτίδια αυτά σημαίνονται με μία φθορίζουσα χρωστική (fluorophore, R) στο ένα άκρο τους και με ένα μόριο αποσβέστη του φθορισμού (quencher, Q) στο άλλο άκρο τους, ενώ σχεδιάζονται με βάση την νουκλεοτιδική αλληλουχία του επιθυμητού πολλαπλασιαζόμενου τμήματος DNA. Τα είδη των ιχνηλατών που χρησιμοποιούνται περιγράφονται παρακάτω.

TaqMan probes: Τα ολιγονουκλεοτίδια φέρουν στο 5' άκρο τους μια φθορίζουσα χρωστική (π.χ FAM, TET) και στο 3' άκρο τους ένα μόριο αποσβέστη (π.χ. TAMRA). Όταν οι ιχνηλάτες είναι ελεύθεροι στο διάλυμα της αντίδρασης δεν φθορίζουν γιατί το μόριο αποσβέστης εξουδετερώνει το σήμα φθορισμού που παράγεται από την πρώτη φθορίζουσα χρωστική. Στο στάδιο της σύνδεσης των εκκινητών, υβριδοποιείται ο ιχνηλάτης στην αλληλουχία του DNA στόχου (Εικ. 8Α).



Εικόνα 8Α. Υβριδοποίηση TaqMan ιχνηλάτη (R=φθορίζουσα χρωστική, Q=αποσβέστης φθορισμού) με ενισχυμένο προϊόν σε αντίδραση Real Time PCR (Davidson, 2003a)

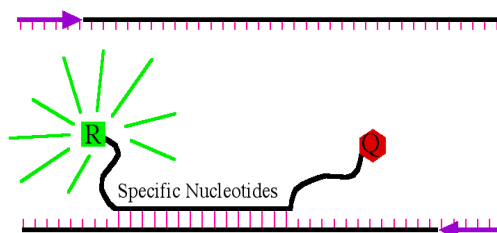
Μόλις η Taq DNA πολυμεράση φτάσει στον ιχνηλάτη, λόγω της εξωνουκλεοτικής δράσης της, ελευθερώνεται το άκρο του ιχνηλάτη με την φθορίζουσα χρωστική, με αποτέλεσμα την παραγωγή φθορισμού (Εικ. 8B). Καθώς η αντίδραση προχωρά αυξάνονται τα φθορίζοντα άκρα του ιχνηλάτη που απελευθερώνονται και παράλληλα η ένταση του φθορισμού (Stratagene, 2006).



Εικόνα 8B. Διαχωρισμός της φθορίζουσας ουσίας του ιχνηλάτη από τη εξωνουκλεοτική δράση της Taq DNA πολυμεράσης (Davidson, 2003a)

Molecular beacons: Πρόκειται για ολιγονουκλεοτίδια των οποίων τα άκρα είναι συμπληρωματικά μεταξύ τους. Έτσι, όταν αναδιπλωθούν αποκτούν μια δομή που αποτελείται από ένα δίκλωνο μίσχο και μία μονόκλωνη θηλιά. Η αλληλουχία της θηλιάς είναι συμπληρωματική προς μια εσωτερική περιοχή της ενισχυόμενης αλληλουχίας-στόχου. Όπως και στους ιχνηλάτες TaqMan, τα ολιγονουκλεοτίδια σημαίνονται πάλι στα άκρα τους με μια φθορίζουσα χρωστική και ένα μόριο-αποσβέστη φθορισμού. Όταν οι ιχνηλάτες αποκτούν την δομή θηλιάς μίσχου, τα δύο μόρια χρωστικής βρίσκονται πολύ κοντά το ένα στο άλλο με αποτέλεσμα να είναι

δυνατή η μεταφορά ενέργειας μεταξύ τους (Fluorescence Resonance Energy Transfer, FRET) κι έτσι αποτρέπεται ο φθορισμός. Κατά την διάρκεια της αντίδρασης προσδένεται ο ιχνηλάτης στο προϊόν (Εικ. 9) και έτσι δεν εκδηλώνεται πια το φαινόμενο FRET με αποτέλεσμα την παράγωγη φθορισμού από την απομάκρυνση των δύο μορίων χρωστικών (Stratagene, 2006).



Εικόνα 9. Ιχνηλάτης Molecular beacon συνδεδεμένος με αλληλουχία-στόχο (Davidson, 2003b)

A.1.5 Η περίπτωση του *Clavibacter michiganensis ssp. sepedonicus*

Η διάγνωση της ασθένειας της δακτυλιωτής σήψης δεν μπορεί να επιτευχθεί στον αγρό επειδή συχνά τα φυτά της πατάτας δεν εκδηλώνουν τα συμπτώματα της μόλυνσης από το βακτήριο. Επιπλέον, το βακτήριο *Clavibacter michiganensis ssp. sepedonicus* προκαλεί λανθάνουσες και ασυμπτωματικές μολύνσεις σε φυτά και κονδύλους πατάτας (E.P.P.O., 2006).

Η αντιμετώπιση της ασθένειας, επομένως, εξαρτάται από την έγκυρη και ευαίσθητη ανίχνευση του παθογόνου τόσο σε μολυσμένους φυτικούς ιστούς πατάτας και κονδύλους που φέρουν συμπτώματα δακτυλιωτής σήψης, όσο και στους ασυμπτωματικούς φορείς της ασθένειας. Οι περισσότερες μέθοδοι για την ανίχνευση και ταυτοποίηση του βακτηρίου παρουσιάζουν μειονεκτήματα συγκριτικά με την μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης.

Πιο συγκεκριμένα, τα τεστ παθογένειας που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση του βακτηρίου, είναι χρονοβόρα καθώς χρειάζεται μια περίοδος 4 – 6 εβδομάδων μέχρι να αναπτυχθούν τα συμπτώματα στα σπορόφυτα (Schneider et al., 1993). Επιπλέον, οι ορολογικές μέθοδοι, όπως ο ανοσοφθορισμός και η δοκιμή ELISA, δεν έχουν πάντα αξιόπιστα αποτελέσματα. Αυτό οφείλεται στις διασταυρωτές αντιδράσεις με άλλα βακτήρια, που μπορούν να συμβούν κατά την διάρκεια των δοκιμών, αλλά και στην

αντιγονική παραλλακτικότητα που έχει καταγραφεί στα στελέχη του *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* (Mills et al., 1997). Αντίθετα, η τεχνολογία της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης είναι μία εξειδικευμένη και γρήγορη μέθοδος που προσφέρει ακρίβεια στα αποτελέσματα και επιτρέπει μικρότερο όριο ανίχνευσης του παθογόνου, μέσα σε λίγες ώρες.

Επειδή το βακτήριο χαρακτηρίστηκε ως επιβλαβής οργανισμός καραντίνας, η Ευρωπαϊκή Ένωση εξέδωσε την κοινοτική οδηγία 93/85/EEC όπου περιγράφονται οι επικυρωμένες μέθοδοι και τα αντίστοιχα πρωτόκολλα για την ανίχνευση και ταυτοποίηση του φυτοπαθογόνου αιτίου της δακτυλιωτής σήψης. Στη χώρα μας, οι οδηγίες αυτές περιγράφονται στο ΦΕΚ 562B/2007.

A.1.6 Σκοπός της εργασίας

Στόχος της εργασίας ήταν να ανιχνευθεί και να ταυτοποιηθεί το βακτήριο *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* σε δείγματα από ασυμπτωματικούς κονδύλους πατάτας, χρησιμοποιώντας την μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης και την μέθοδο της Real Time PCR με επικυρωμένα πρωτόκολλα, που αναφέρονται στο ΦΕΚ 562B/2007.

B. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

B.1. Υλικά και Μέθοδοι

B.1.1 Αναλώσιμα Υλικά

Για την παρασκευή των θρεπτικών μέσων καλλιέργειας YGM και LB χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα αντιδραστήρια: bacto-tryptone, bacto-agar και yeast extract powder (Lab M), χλωριούχο νάτριο (NaCl) (Riedel de Haen), όξινο φωσφορικό κάλιο (K_2HPO_4), δισόξινο φωσφορικό κάλιο (KH_2PO_4), ένυδρο θειϊκό μαγνήσιο ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$), ένυδρο θειϊκό μαγγάνιο ($MnSO_4 \cdot H_2O$), ένυδρος θειϊκός σίδηρος ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$), D(-) γλυκόζη μονοϋδρική (Merck).

Στην δοκιμή ανοσοφθορισμού το ρυθμιστικό διάλυμα PBS (Phosphate-buffered Saline) παρασκευάστηκε με τα εξής αντιδραστήρια της εταιρίας Merck: χλωριούχο νάτριο (NaCl), χλωριούχο κάλιο (KCL), όξινο φωσφορικό νάτριο ($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$).

Για την διαδικασία απομόνωσης γενωμικού DNA, από τα βακτηριακά στελέχη και τα παρασκευασμένα φυτικά εκχυλίσματα από κονδύλους πατάτας, παρασκευάστηκε διάλυμα ενζυματικής λύσης (20mM Tris-CL (pH 8), 2mM EDTA, 1,2% Triton X-100, 20mg/ml lysozyme). Όλα τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή του διαλύματος λύσης ήταν της εταιρίας Sigma. Στο έτοιμο εμπορικό πρωτόκολλο απομόνωσης «Purification of total DNA from Animal Tissues» χρησιμοποιήθηκαν Proteinase K, τα Buffer AL, AW1, AW2, AE της εταιρίας Qiagen (τα οποία και συμπεριλαμβάνονταν στην συσκευασία του Dneasy Blood & Tissue kit) και 99% αιθανόλη (C_6H_5OH) από την εταιρία Scharlau.

Στις αντιδράσεις PCR και multiplex PCR χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω αντιδραστήρια: 10x buffer Taq Dna polymerase, $MgCl_2$ (25mM), dNTPs (25mM), Taq DNA polymerase (5u/μl) της εταιρίας Minotech. Οι εκκινητές (10mM) που χρησιμοποιήθηκαν ήταν της εταιρίας Metabion.

Για την ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης χρησιμοποιήθηκε διάλυμα φόρτωσης TBE (Tris Borate EDTA). Το διάλυμα φόρτωσης TBE παρασκευάστηκε με Tris base της εταιρίας Merck, βορικό οξύ (Boric acid) της εταιρίας Sigma, EDTA (0,5M) ενώ η αγαρόζη που χρησιμοποιήθηκε για το πήκτωμα προερχόταν από την εταιρία Invitrogen.

Β.1.2 Βακτηριακά στελέχη και φυτικά εκχυλίσματα από κονδύλους πατάτας.

Όλα τα βακτηριακά στελέχη (Πίν. 2) καθώς και τα φυτικά εκχυλίσματα, που παρασκευάστηκαν σύμφωνα με το ΦΕΚ 562B/2007 από ασυμπτωματικούς και από υγιείς κονδύλους πατάτας, αποκτήθηκαν από το εργαστήριο Βακτηριολογίας του Τ.Ε.Ι. Κρήτης.

Πίνακας 2. Βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν

ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ	ΚΩΔΙΚΟΙ ΣΤΕΛΕΧΩΝ
<i>Clavibacter michiganensis</i> ssp. <i>sepedonicus</i> (C.m.s.)	4075A, 4075B, 4083A, 4083B, 4083-1, 4083-1β, 4083-2, 4083-2β

Τα φυτικά εκχυλίσματα που χρησιμοποιήθηκαν παρουσιάζονται στον πίνακα 3.

Πίνακας 3. Φυτικά εκχυλίσματα από κονδύλους πατάτας που χρησιμοποιήθηκαν

ΦΥΤΙΚΑ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΑ	ΚΩΔΙΚΟΙ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ					
ΦΥΤΙΚΑ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΑ ΑΠΟ ΚΟΝΔΥΛΟΥΣ ΠΑΤΑΤΑΣ ΥΠΟΠΤΟΥΣ ΓΙΑ ΜΟΛΥΝΣΗ ΑΠΟ <i>Clavibacter michiganensis</i> ssp. <i>sepedonicus</i>	4320	4269	3929	3919	3906	3904
	3902	3901	3894	3885	3867	3774
	3538	3536	3523	3522	3521	3520
	3519	3514	3512	3510	3497	3493
	3462	3460	3452	3443	3395	3394
	3383	3382	3380	3379	3378	3376
	3373	3372	3362	3356	3318	3314
ΦΥΤΙΚΑ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΑ ΑΠΟ ΥΓΙΕΙΣ ΚΟΝΔΥΛΟΥΣ ΠΑΤΑΤΑΣ	4723	4720	4701	4695	4691	4683
	4675	4666	4661			

B.1.3 Πειραματική διαδικασία – Μέθοδοι

B.1.3.1. Παρασκευή θρεπτικών υποστρωμάτων

Για την καλλιέργεια σε τρυβλία των βακτηριακών στελεχών του *C.m.s.* παρασκευάστηκε θρεπτικό μέσο YGM (Yeast extract mineral salts). Το θρεπτικό υπόστρωμα YGM (σύστασης ανά λίτρο: 18g bacto agar, 2g bacto yeast extract, 2,5g D(-) γλυκόζη, 0,25g K₂HPO₄, 0,25g KH₂PO₄, 0,1g MgSO₄·7H₂O, 0,015g MnSO₄·H₂O, 0,05g NaCl, 0,05g FeSO₄·7H₂O) αποστειρώθηκε στον αυτόκαυστο, στους 115 °C για 20 λεπτά.

Για τις υγρές καλλιέργειες των στελεχών του βακτηρίου χρησιμοποιήθηκε θρεπτικό υπόστρωμα LB (Luria-Betrani Medium). Διαλύθηκαν 10g bacto tryptone, 5g bacto yeast extract και 10g NaCl σε 1l αποσταγμένο νερό και ρυθμίστηκε το pH στο 7, με την χρήση πεχάμετρου. Ακολούθησε αποστείρωση του θρεπτικού υποστρώματος στους 121°C για 20 λεπτά.

B.1.3.2 Καλλιέργεια των βακτηριακών στελεχών του *C.m.s.*

Τα βακτηριακά στελέχη του *C.m.s.* που εξήλθαν από τις μητρικές καλλιέργειες, μεταφέρθηκαν υπό ασηπτικές συνθήκες σε τριβλίο petri που περιείχε 25ml αποστειρωμένο θρεπτικό υπόστρωμα YGM. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιήθηκε στο θάλαμο νηματικής ροής ώστε να εξασφαλιστούν ασηπτικές συνθήκες εργασίας. Η καλλιέργεια αναπτύχθηκε σε θάλαμο επώασης στους 23 °C για 48 ώρες, καθώς το βακτήριο *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* παρουσιάζει αργή ανάπτυξη.

Οι υγρές καλλιέργειες των στελεχών του *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* αναπτύχθηκαν σε δοκιμαστικούς σωλήνες που περιείχαν ο καθένας 5 ml θρεπτικού υποστρώματος LB. Οι δοκιμαστικοί σωλήνες τοποθετήθηκαν σε θάλαμο επώασης στους 23 °C για 48 ώρες. Οι σωλήνες βρίσκονταν υπό συνεχή ανάδευση 400rpm σε όλο το διάστημα της επώασης.

B.1.3.3 Τεστ ανοσοφθορισμού (Immunofluorescence test)

Στα βακτηριακά στελέχη εφαρμόστηκε η τεχνική του ανοσοφθορισμού (IF test). Σε αποστειρωμένο φιαλίδιο τοποθετήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα PBS και με αποστειρωμένη

οδοντογλυφίδα τοποθετήθηκε το κάθε βακτηριακό στέλεχος στο αντίστοιχο φιαλίδιο. Σχηματίστηκαν αιωρήματα βακτηριακών κυττάρων συγκέντρωσης περίπου 10^8 cfu/ml (O.D.=0,10). Τα αιωρήματα των βακτηριακών στελεχών του *C.m.s.* αραιώθηκαν 1:10 σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS. Η αντικειμενοφόρος πλάκα περάστηκε από φλόγα γκαζιού και σε κάθε θέση τοποθετήθηκαν 20 μl βακτηριακού αιωρήματος. Στη συνέχεια, αφού η πλάκα στέγνωσε προστέθηκαν 20 μl οιοπνεύματος, καθαρότητας 95%, ανά θέση. Ο αντιορός του βακτηρίου *C.m.s.* αραιώθηκε 1:1000 σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS και τοποθετήθηκαν 20 μl ανά θέση. Η αντικειμενοφόρος πλάκα τοποθετήθηκε για 30 λεπτά σε πλαστικό δοχείο με βρεγμένο χαρτί, ώστε να διατηρηθεί η αρχική συγκέντρωση των αντισωμάτων. Έπειτα στη πλάκα εφαρμόστηκαν δύο πλύσεις με ρυθμιστικό διάλυμα PBS για 5 λεπτά και στη συνέχεια αφέθηκε να στεγνώσει.

Σε δεύτερη φάση, χρησιμοποιήθηκε το φθορίζον σύμπλοκο Alexa fluor σε αραιώση 1:100 με ρυθμιστικό διάλυμα PBS. Τοποθετήθηκαν 20 μl του διαλύματος ανά θέση της αντικειμενοφόρου πλάκας και η πλάκα τοποθετήθηκε σε πλαστικό δοχείο με υγρασία στο σκοτάδι για 30 λεπτά. Εφαρμόστηκαν στην συνέχεια δύο πλύσεις με ρυθμιστικό διάλυμα PBS και στέγνωμα της αντικειμενοφόρου.

B.1.3.4 Επέμβαση με λυσοζύμη για τη λύση των κυττάρων των βακτηριακών στελεχών του *C.m.s.* και των φυτικών εκχυλισμάτων κονδύλων πατάτας

Το βακτήριο *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* είναι θετικό κατά Gram και το κυτταρικό του τοίχωμα, όπως κάθε βακτηρίου που ανήκει σε αυτή την κατηγορία, είναι φτιαγμένο από την πρωτεΐνη πεπτιδογλυκάνη (Τζάμος, 2004). Η πεπτιδογλυκάνη καταλαμβάνει ένα ποσοστό 50-90% του κυτταρικού τοιχώματος. Έτσι για να επιτευχθεί η λύση του κυτταρικού τοιχώματος (προκειμένου να ελευθερωθεί το DNA) έγινε μεταχείριση όλων των βακτηριακών στελεχών και των φυτικών εκχυλισμάτων από κονδύλους πατάτας που ήταν ύποπτοι για μόλυνση από το φυτοπαθογόνο βακτήριο με διάλυμα λυσοζύμης. Τα παρακάτω βήματα, πριν την απομόνωση του DNA, εφαρμόστηκαν στα βακτηριακά στελέχη 4075A, 4075B, 4083A, 4083B (Πιν. 2) και σε όλα τα φυτικά εκχυλίσματα (Πιν. 3):

1. Όγκος 1ml από κάθε υγρή καλλιέργεια βακτηριακού στελέχους και από κάθε φυτικό εκχύλισμα μεταφέρθηκε σε αποστειρωμένους σωλήνες erpendorf, οι οποίοι φυγοκεντρίθηκαν για 10 λεπτά σε 7500 rpm. Αφαιρέθηκε το υπερκείμενο υγρό.

2. Επαναδιαλύθηκαν οι βακτηριακές πελλέτες σε 180 µl διαλύματος ενζυματικής λύσης και ακολούθησε επώαση στους 37 °C για 30 λεπτά σε υδατόλουτρο.

3. Προστέθηκαν 25 µl Proteinase K και 200 µl Buffer AL σε σωλήνες erpendorf και ακολούθησε ανακίνηση των σωλήνων με vortex και επώαση στους 56 °C για 30 λεπτά.

4. Στη συνέχεια προστέθηκαν 200 µl αιθανόλης (καθαρότητας 99%) και ακολούθησε ανακίνηση των σωλήνων erpendorf με vortex μέχρι να σχηματιστεί ομοιογενές διάλυμα.

Μετά από αυτήν την μεταχείριση ακολουθούσε η διαδικασία απομόνωσης γενωμικού DNA από τα βακτηριακά στελέχη και από τα φυτικά εκχυλίσματα, όπως περιγράφεται στην επόμενη ενότητα.

B.1.3.5 Απομόνωση γενωμικού DNA από βακτηριακά στελέχη του *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* και από φυτικά εκχυλίσματα ασυμπτωματικών και υγιών κονδύλων πατάτας

Η απομόνωση γενετικού υλικού από τα βακτηριακά στελέχη 4075A, 4075B, 4083A, 4083B του *C.m.s.* και όλων των φυτικών εκχυλισμάτων πατάτας πραγματοποιήθηκε με το έτοιμο εμπορικό πρωτόκολλο «Purification of Total DNA from Animal Tissues» της εταιρίας Qiagen. Η διαδικασία της απομόνωσης DNA εφαρμοζόταν πάντα, αμέσως μετά την προσθήκη της αιθανόλης σε σωλήνες erpendorf όπως αναφέρθηκε προηγουμένως. Το πρωτόκολλο αναλύεται παρακάτω:

1. Το περιεχόμενο των σωλήνων erpendorf μεταφέρθηκε σε στήλες διαχωρισμού (DNeasy Mini spin column) οι οποίες τοποθετήθηκαν μέσα σε σωλήνες συλλογής των 2 ml. Εφαρμόστηκε φυγοκέντριση σε 8000rpm για 1 λεπτό. Οι σωλήνες συλλογής αφαιρέθηκαν στη συνέχεια και η κάθε στήλη διαχωρισμού τοποθετήθηκε σε καινούργιο σωλήνα συλλογής.

2. Προστέθηκαν 500 µl buffer AW1 στις στήλες διαχωρισμού και ακολούθησε φυγοκέντριση σε 8000rpm για 1 λεπτό. Οι σωλήνες συλλογής αφαιρέθηκαν ξανά.

3. Οι στήλες διαχωρισμού τοποθετήθηκαν σε καινούργιους σωλήνες συλλογής και προστέθηκαν 500 μ l buffer AW2. Ακολούθησε φυγοκέντριση σε 14000 rpm για 3 λεπτά.

4. Οι ειδικές στήλες στην συνέχεια τοποθετήθηκαν εκ νέου σε καθαρούς αποστειρωμένους σωλήνες erpendorf (όγκου 1,5 ml) και προστέθηκαν 200 μ l buffer AE. Ακολούθησε επώαση για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου και έπειτα φυγοκέντριση σε 8000rpm για 1 λεπτό.

Οι σωλήνες erpendorf αποθηκεύθηκαν στους -20°C μέχρι να γίνουν οι αντιδράσεις PCR.

B.1.3.6 Μέτρηση της συγκέντρωσης των απομονωθέντων DNA βακτηριακών στελεχών και φυτικών εκχυλισμάτων

Για τις αντιδράσεις πολλαπλής PCR έπρεπε να υπολογιστούν οι συγκεντρώσεις των DNA των βακτηριακών στελεχών και των φυτικών εκχυλισμάτων. Η μέτρηση αυτή πραγματοποιήθηκε με την χρήση νανόμετρου (nanodrop) στο εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Φυτών του Πανεπιστημίου Κρήτης. Τοποθετήθηκε 1 μ l από κάθε υπό ανάλυση δείγμα στην ειδική ακίδα δειγματοληψίας. Ο βραχίονας της συσκευής έκλεισε και η μέτρηση του δείγματος καταγράφηκε με την βοήθεια ειδικού προγράμματος σε υπολογιστή, σε μήκος κύματος 260 nm. Στο τέλος της μέτρησης η ακίδα καθαρίστηκε ελαφρά με απορροφητικό χαρτί και ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία για όλα τα προς ανάλυση δείγματα.

B.1.3.7 Ηλεκτροφόρηση DNA

Για να διαπιστωθεί αν απομονώθηκε DNA από τα βακτηριακά στελέχη και από όλα τα φυτικά εκχυλίσματα πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης (συγκέντρωσης 1%). Το πήκτωμα αγαρόζης παρασκευάστηκε διαλύοντας 0,4g αγαρόζης σε 40 ml TBE (βλ. σελ. 28) σε κωνική φιάλη των 100ml. Μετά την θέρμανση του διαλύματος για την διάλυση της αγαρόζης προστέθηκαν 2 μ l χρωστικής (βρωμιούχο αιθίδιο). Το διάλυμα τοποθετήθηκε στην συσκευή ηλεκτροφόρησης και αφού δημιουργήθηκε το πήκτωμα με την πτώση της θερμοκρασίας, προστέθηκε διάλυμα TBE. Το κάθε δείγμα που φορτώθηκε περιείχε 5 μ l από το απομονωθέν

προϊόν, 5μl αποστειρωμένου υπερκάθαρου νερού και 2 μl χρωστικής. Ως μοριακός δείκτης χρησιμοποιήθηκε ο λ/EcoR I/Hind III.

B.1.3.8 Εκκινητές για τις αντιδράσεις PCR και πολλαπλής PCR

Για την διεξαγωγή των αντιδράσεων PCR χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές (Πίν. 4), καθαρισμένοι με χρωματογραφία HPLC, της εταιρίας Metabion. Οι εκκινητές που ήταν κατάλληλοι για την ενίσχυση του DNA του *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* βασίζονται στην ITS (intergenic transcribed spacer) περιοχή 16S-23S rRNA του βακτηρίου και το αναμενόμενο προϊόν ενίσχυσης (αμπλικόνιο) της PCR που παράγουν έχει μέγεθος 502bp. Οι κωδικοί που δόθηκαν για να διαχωριστούν από τους υπόλοιπους εκκινητές είναι: CLAS_CLAV_SEP_F, για τον πρόσθιο (Forward) εκκινητή και CLAS_CLAV_SEP_R για τον όπισθεν (Reverse) εκκινητή. Για την ενίσχυση του εσωτερικού μάρτυρα της πολλαπλής PCR, οι εκκινητές βασίζονται σε αλληλουχίες από 18S rRNA γονίδια των *Saccharomyces cerevisiae*, *Dictyostelium discoideum* και *Styloichia pustulata* και παράγουν ένα προϊόν ενίσχυσης σε εκχυλίσματα ιστών πατάτας, μελιτζάνας και τομάτας, μεγέθους 377bp (Patrik, 2000). Οι κωδικοί τους είναι: CLAS_PLANT_F για τον πρόσθιο εκκινητή και CLAS_PLANT_R για τον όπισθεν εκκινητή.

Πίνακας 4. Αλληλουχία εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για τις αντιδράσεις PCR

Εκκινητές	Αναμενόμενο μέγεθος PCR προϊόντος	Αλληλουχία εκκινητών	T _m
CLAS_CLAV_SEP_F	502bp	5'-CTC CTT GTG GGG TGG GAA AA-3'	60 °C
CLAS_CLAV_SEP_R		5'-TAC TGA GAT GTT TCA CTT CCC C-3'	
CLAS_PLANT_F	377bp	5'- GAG GCA ATA ACA GGT CTG TGA TGC-3'	65 °C
CLAS_PLANT_R		5'-TCC GCA GGT TCA CCT ACG GA-3'	63 °C

B.1.3.9 Αντιδράσεις PCR και multiplex PCR

Πραγματοποιήθηκαν οι παρακάτω αντιδράσεις:

1) **Αντίδραση PCR σε γενωμικό DNA βακτηριακών στελεχών του *C.m.s.* :**
 Αρχικά πραγματοποιήθηκε αντίδραση PCR με τα βακτηριακά στελέχη 4075A, 4075B, 4083A, 4083B του *C.m.s.* και το βακτηριακό στέλεχος R1-3 του *Pseudomonas syringae*

pv. alisalensis, ως αρνητικός βακτηριακός μάρτυρας, για να επιβεβαιωθεί η εξειδίκευση των βακτηριακών εκκινητών του *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*. Η σύσταση της αντίδρασης παρουσιάζεται στον Πίνακα 5.

2) Αντίδραση PCR σε συνολικό DNA (φυτικό γενωμικό και πιθανό βακτηριακό γενωμικό) που απομονώθηκε από φυτικό εκχύλισμα που παρασκευάστηκε από πιθανά μολυσμένο κόνδυλο πατάτας με το βακτήριο *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* για την ανίχνευση/ενίσχυση βακτηριακού σήματος: Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε μία αντίδραση PCR στο φυτικό εκχύλισμα από κόνδυλο πατάτας 3906 (Πιν. 3,σελ. 29), με τους ειδικούς εκκινητές του βακτηρίου με θετικό μάρτυρα το DNA του βακτηριακού στελέχους *C.m.s.* 4075A. Το φυτικό εκχύλισμα με κωδικό 3906 είχε ήδη χαρακτηριστεί μολυσμένο με άλλες μεθόδους ανίχνευσης και χρησιμοποιήθηκε για να διαπιστωθεί αν η μέθοδος της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης δώσει το ίδιο αποτέλεσμα για το φυτικό εκχύλισμα. Η συγκεκριμένη αντίδραση πραγματοποιήθηκε επίσης για να διαπιστωθεί αν από την απομόνωση συνολικού DNA (φυτικού γενωμικού και βακτηριακού γενωμικού) από το φυτικό εκχύλισμα 3906 παράγονται τα αναμενόμενα προϊόντα χρησιμοποιώντας τους εξειδικευμένους εκκινητές του βακτηρίου *C.m.s.* Η σύσταση της αντίδρασης παρουσιάζεται στον Πίνακα 5.

Πίνακας 5. Σύσταση αντιδράσεων PCR σε γενωμικό DNA βακτηριακών στελεχών του *C.m.s.* και σε συνολικό DNA από φυτικό εκχύλισμα για την ανίχνευση βακτηριακού σήματος

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟ	ΠΟΣΟΤΗΤΑ ΑΝΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ	ΤΕΛΙΚΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ
10x buffer	5μl	1x
CLAS_CLAV_SEP_F(10μM)	1 μl	0,1μM
CLAS_CLAV_SEP_R(10μM)	1 μl	0,1μM
MgCl ₂ (25mM)	2,5 μl	2,5mM
dNTPs (10μM)	1 μl	0,2μM
Taq DNA polymerase(5u/μl)	1 μl	1unit
ddH ₂ O		
DNA		300ng/μl
ΤΕΛΙΚΟΣ ΟΓΚΟΣ	50μl	

3) Αντίδραση PCR για την ανίχνευση/ενίσχυση σήματος που προκύπτει από συντηρημένη αλληλουχία φυτικού DNA με εξειδικευμένους φυτικούς εκκινητές: Το συνολικό DNA (φυτικό γενωμικό και βακτηριακό γενωμικό) που απομονώθηκε από το φυτικό εκχύλισμα 3906 χρησιμοποιήθηκε για την αντίδραση PCR με τους εξειδικευμένους φυτικούς εκκινητές (Πίν. 4, σελ. 34). Χρησιμοποιήθηκε ως θετικός μάρτυρας, DNA απομονωμένο από φυτικό ιστό πατάτας. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε για να διαπιστωθεί αν από την απομόνωση DNA του φυτικού εκχυλίσματος παράγεται το αναμενόμενο προϊόν (βλ.σελ. 34) μεγέθους 377bp. με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης. Η σύσταση της αντίδρασης παρουσιάζεται στον πίνακα 6.

Πίνακας 6. Σύσταση αντίδρασης PCR σε συνολικό DNA από το φυτικό εκχύλισμα 3906 με εξειδικευμένους φυτικούς εκκινητές

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟ	ΠΟΣΟΤΗΤΑ ΑΝΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ	ΤΕΛΙΚΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ
10x buffer	5μl	1x
CLAS_PLANT_F(10μM)	1 μl	0,1μM
CLAS_PLANT_R(10μM)	1 μl	0,1μM
MgCl ₂ (25mM)	2,5 μl	2,5mM
dNTPs(10μM)	1 μl	0,2μM
DNA polymerase(5u/μl)	1 μl	1unit
DNA		300ng/μl
ΤΕΛΙΚΟΣ ΟΓΚΟΣ	50μl	

4) Πολλαπλή (multiplex) PCR: Αφού επιβεβαιώθηκε η παραγωγή προϊόντων PCR, εφαρμόστηκε πολλαπλή PCR σε όλα τα φυτικά εκχυλίσματα προς εξέταση (Πιν. 3) που είχαν παρασκευαστεί από κονδύλους πατάτας ύποπτους για μόλυνση από το φυτοπαθογόνο βακτήριο *Clavibacter michiganensis ssp. sepedonicus*. Παρασκευάστηκε μείγμα αντίδρασης που περιείχε υπερκάθαρο αποστειρωμένο νερό, ρυθμιστικό διάλυμα Taq DNA polymerase, το ζεύγος των αντίστοιχων εκκινητών, MgCl₂, dNTPs και το ένζυμο Taq DNA polymerase. Το μείγμα μοιράστηκε σε αποστειρωμένους σωλήνες PCR και προστέθηκε σε κάθε σωλήνα η αντίστοιχη ποσότητα DNA από κάθε δείγμα, έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση του γενετικού φορτίου να είναι 300ng/μl. Ο τελικός

όγκος όλων των αντιδράσεων ήταν 50μl. Σε όλες τις αντιδράσεις, χρησιμοποιήθηκε ως αρνητικός μάρτυρας αποστειρωμένο υπερκάθαρο νερό.

Η σύσταση των αντιδράσεων πολλαπλής PCR που πραγματοποιήθηκαν παρουσιάζεται στον πίνακα 7. Στις αντιδράσεις αυτές χρησιμοποιήθηκαν δύο σετ εκκινητών: οι εξειδικευμένοι εκκινητές του βακτηρίου *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* (βλ.Πιν. 4, σελ.34) και οι εξειδικευμένοι φυτικοί εκκινητές που επιτρέπουν την ενίσχυση συντηρημένης αλληλουχίας από φυτικό DNA που προκύπτει από την απομόνωση DNA φυτικών εκχυλισμάτων από κονδύλους πατάτας (βλ.Πιν 4). Το δεύτερο ζεύγος των εξειδικευμένων εκκινητών χρησιμοποιήθηκε με σκοπό την ενίσχυση εσωτερικού μάρτυρα της αντίδρασης ώστε να αποφευχθούν λανθασμένα αρνητικά αποτελέσματα. Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος *C.m.s.* 4075 A (Πιν 2, σελ. 29)

Πίνακας 7. Σύσταση πολλαπλής PCR

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟ	ΠΟΣΟΤΗΤΑ ANA ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ	ΤΕΛΙΚΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ
10xbuffer	5μl	1x
CLAS_CLAV_SEP_F(10μM)	1μl	0,1μM
CLAS_CLAV_SEP_R(10μM)	1μl	0,1μM
CLAS_PLANT_F(10μM)	1μl	0,1μM
CLAS_PLANT_R(10μM)	1μl	0.1μM
MgCl ₂ (25mM)	2,5μl	2,5mM
dNTPs (10μM)	1μl	0,2μM
Taq DNA polymerase(5u/μl)	1μl	1unit
ddH ₂ O		
DNA		300ng/μl
ΤΕΛΙΚΟΣ ΟΓΚΟΣ	50μl	

Για όλες τις αντιδράσεις χρησιμοποιήθηκε ο θερμικός κυκλοποιητής Mastercycler Gradient της εταιρίας Eppendorf (Εικ. 5). Οι συνθήκες της αντίδρασης ρυθμίστηκαν με το πρόγραμμα που περιγράφεται παρακάτω.

Βήμα 1: 4 λεπτά στους 94 °C (για αρχική αποδιάταξη)

Βήμα 2: 35 κύκλοι από:

- 4 λεπτά στους 94 °C
- 45 δευτερόλεπτα στους 94 °C
- 45 δευτερόλεπτα στους 60 °C
- 1 λεπτό στους 72 °C

Βήμα 3: Αφού πραγματοποιήθηκε και ο τελευταίος κύκλος της αντίδρασης τα δείγματα παρέμειναν για 10 δευτερόλεπτα στους 72 °C.

Το πρόγραμμα αυτό χρησιμοποιήθηκε σε όλες τις αντιδράσεις PCR και πολλαπλής PCR που πραγματοποιήθηκαν.

Τα προϊόντα όλων των αντιδράσεων αναλύθηκαν στη συνέχεια, σε πήκτωμα αγαρόζης (1%). Για τον υπολογισμό των αναμενόμενων προϊόντων χρησιμοποιήθηκε ο μοριακός δείκτης λ/EcoR I/Hind III που δίνει γνωστά μεγέθη (21226bp, 5148bp, 4973bp, 4268bp, 3530bp, 2027bp, 1904bp, 1584bp, 1375bp, 947bp, 831bp, 564bp). Η ποσότητα των δειγμάτων που φορτώθηκε (σε κάθε αντίδραση) ήταν 10 μl μαζί με 2 μl χρωστικής.

B.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

B.2.1. Αποτελέσματα ανοσοφθορισμού (IF TEST)

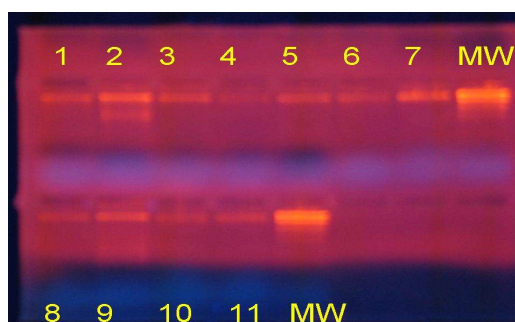
Από τις δοκιμές ανοσοφθορισμού τα βακτηριακά στελέχη 4075A, 4075B, 4083A και 4083B έδωσαν τυπική αντίδραση φθορισμού και επιβεβαίωσαν την ταξινόμησή τους. Τα στελέχη αυτά χρησιμοποιήθηκαν ως θετικοί μάρτυρες στις αντιδράσεις PCR. Η παρατήρηση των αποτελεσμάτων έγινε με μικροσκόπιο Nikon που είναι εφοδιασμένο με σύστημα επισκοπικού φθορισμού και πραγματοποιήθηκε στο Περιφερειακό Κέντρο Προστασίας Φυτών και Ποιοτικού Ελέγχου Ηρακλείου.

B.2.2 Αποτελέσματα μέτρησης συγκεντρώσεων των απομονωθέντων DNA με την χρήση νανόμετρου.

Η μέτρηση πραγματοποιήθηκε προκειμένου να καθοριστεί η συγκέντρωση των απομονωθέντων DNA από τα βακτηριακά στελέχη του *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* και από τα φυτικά εκχυλίσματα που είχαν παρασκευαστεί από ασυμπτωματικούς και υγιείς κονδύλους πατάτας. Με βάση τις αρχικές συγκεντρώσεις των απομονωθέντων DNA υπολογίστηκαν οι όγκοι των DNA όλων των δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στις αντιδράσεις PCR και πολλαπλής PCR, έτσι ώστε η συγκέντρωση DNA του κάθε δείγματος στην αντίδραση να είναι 300ng/μl. Τα αποτελέσματα της μέτρησης των συγκεντρώσεων DNA παρουσιάζονται στο παράρτημα στους Πίνακες 9,10,11.

B.2.3 Ανίχνευση απομονωθέντων DNA σε πήκτωμα αγαρόζης 1%

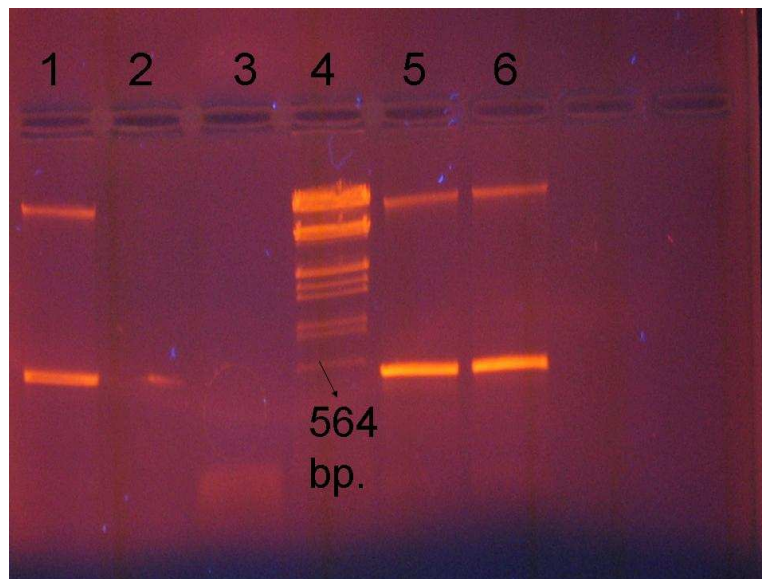
Στην Εικόνα 10 παρουσιάζεται ένα από τα πηκτώματα αγαρόζης στο οποίο φορτώθηκαν απομονώσεις συνολικού (φυτικό γενωμικό και πιθανά βακτηριακό γενωμικό) DNA φυτικών εκχυλισμάτων που έχουν παρασκευαστεί από κονδύλους πατάτας ύποπτους για μόλυνση από το φυτοπαθογόνο βακτήριο *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*. Στο πήκτωμα αγαρόζης έχουν φορτωθεί έντεκα από τα σαράντα δύο συνολικά φυτικά εκχυλίσματα προς εξέταση και η διαδικασία πραγματοποιήθηκε για να διαπιστωθεί η ύπαρξη γενετικού φορτίου μετά την ολοκλήρωση του πρωτόκολλου απομόνωσης DNA στα φυτικά εκχυλίσματα (βλ.σελ. 32).



Εικόνα 10. Πήκτωμα αγαρόζης με μοριακό δείκτη τον λ/EcoR I/Hind III και DNA των φυτικών εκχυλισμάτων με κωδικό: **1)** 4320, **2)** 4269, **3)** 3929, **4)** 3919, **5)**3904, **6)**3902, **7)** 3901, **8)** 3894, **9)** 3885, **10)** 3867, **11)** 3538, **MW:** λ/EcoR I/Hind III

B.2.4 Αποτελέσματα αντίδρασης PCR σε γενωμικό DNA βακτηριακών στελεχών του *C.m.s.*

Τα αποτελέσματα της αντίδρασης PCR σε βακτηριακά στελέχη του *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* που εφαρμόστηκε για να επιβεβαιωθεί η εξειδίκευση των εκκινητών του βακτηρίου παρουσιάζονται στην εικόνα 11.



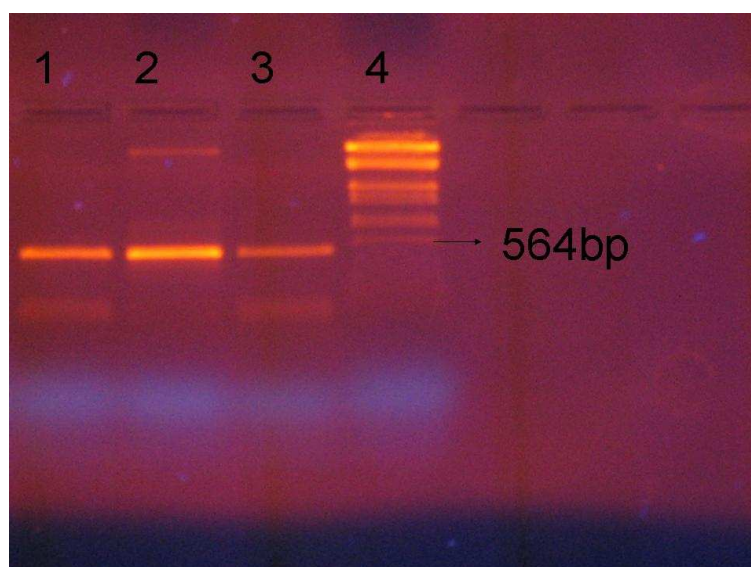
Εικόνα 11. Ανάλυση των προϊόντων της PCR: 1) *C.m.s* 4075A, 2) *C.m.s.* 4075B, 3) *P.a.* R1-3, 4) λEcoR I/Hind III, 5) *C.m.s.* 4083A, 6) *C.m.s.* 4083B

Όπως φαίνεται και στην εικόνα τα βακτηριακά στελέχη του *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* έδωσαν το αναμενόμενο προϊόν μεγέθους 502bp. Το στέλεχος R1-3, του βακτηρίου *Pseudomonas syringae* pv. *alisalensis* δεν σχημάτισε κανένα προϊόν στην αντίδραση της PCR.

B.2.5 Αποτελέσματα της αντίδρασης PCR με τους εξειδικευμένους εκκινητές για το *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* σε φυτικό εκχύλισμα από κόνδυλο πατάτας για την ανίχνευση/ενίσχυση βακτηριακού σήματος

Τα αποτελέσματα από την αντίδραση που πραγματοποιήθηκε με το συνολικό (φυτικό γενωμικό και βακτηριακό γενωμικό) DNA που απομονώθηκε από φυτικό εκχύλισμα με κωδικό 3906 από μολυσμένο κόνδυλο πατάτας με το βακτήριο

Clavibacter michiganensis ssp. *sepedonicus*, παρουσιάζονται στην εικόνα 12. Το προϊόν που ενισχύθηκε από το συνολικό DNA του φυτικού εκχυλίσματος 3906 είχε το ίδιο μέγεθος με το προϊόν (ζώνη 502bp) που σχημάτισε ο θετικός μάρτυρας (DNA από το βακτηριακό στέλεχος *C.m.s.* 4075A) της αντίδρασης. Ο αρνητικός μάρτυρας της αντίδρασης, που ήταν αποστειρωμένο νερό μαζί με μείγμα της αντίδραση PCR, παρουσίασε την ίδια ζώνη, γεγονός που υποδηλώνει ότι υπήρξε επιμόλυνση του. Ωστόσο στις υπόλοιπες αντιδράσεις PCR που πραγματοποιήθηκαν δεν υπήρξε επιμόλυνση του αρνητικού μάρτυρα ενώ ενισχύθηκαν προϊόντα του ίδιου μεγέθους (502bp) και γι αυτό η αντίδραση δεν επαναλήφθηκε.

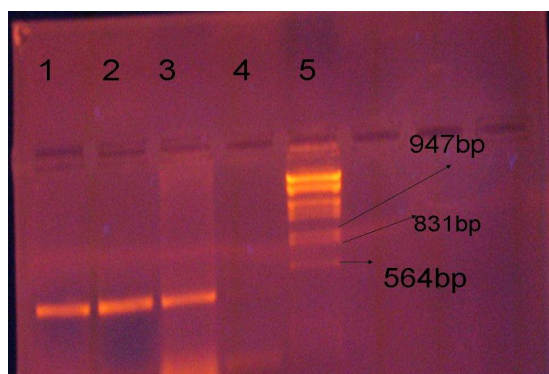


Εικόνα 12. Ανάλυση των προϊόντων της αντίδρασης PCR σε πήκτωμα αгарόζης 1%:1)φυτικό εκχύλισμα από μολυσμένο κόνδυλο πατάτας με κωδικό 3906, 2) *C.m.s.* 4075A, 3) μάρτυρας, 4)Μοριακός Δείκτης: λ/EcoR I/Hind III

B.2.6 Αποτελέσματα αντίδρασης PCR για την ανίχνευση/ενίσχυση σήματος που προκύπτει από συντηρημένη αλληλουχία φυτικού DNA με εξειδικευμένους φυτικούς εκκινητές

Στην αντίδραση αυτή χρησιμοποιήθηκε το συνολικό DNA (φυτικό γενωμικό και βακτηριακό γενωμικό) που απομονώθηκε από το φυτικό εκχύλισμα από μολυσμένο κόνδυλο πατάτας με κωδικό 3906. Το συνολικό DNA από το φυτικό εκχύλισμα 3906 σχημάτισε το ίδιο προϊόν με τον θετικό μάρτυρα που χρησιμοποιήθηκε, ο οποίος ήταν DNA από φυτικό ιστό πατάτας (Εικ. 13). Το προϊόν που σχημάτισε ο θετικός μάρτυρας

και το φυτικό εκχύλισμα 3906 ήταν πιο κάτω από την ζώνη 564bp του μοριακού δείκτη και είναι το αναμενόμενο προϊόν μήκους 377bp (βλ.σελ. 36).



Εικόνα 13. Ανάλυση προϊόντων PCR σε πήκτωμα αγαρόζης 1%: **1)** 3906 (10 μl), **2)** 3906 (20μl), **3)** DNA από φυτικό ιστό πατάτας, **4)** αρνητικός μάρτυρας, **5)** Μοριακός Δείκτης: λ/EcoR I/HindIII

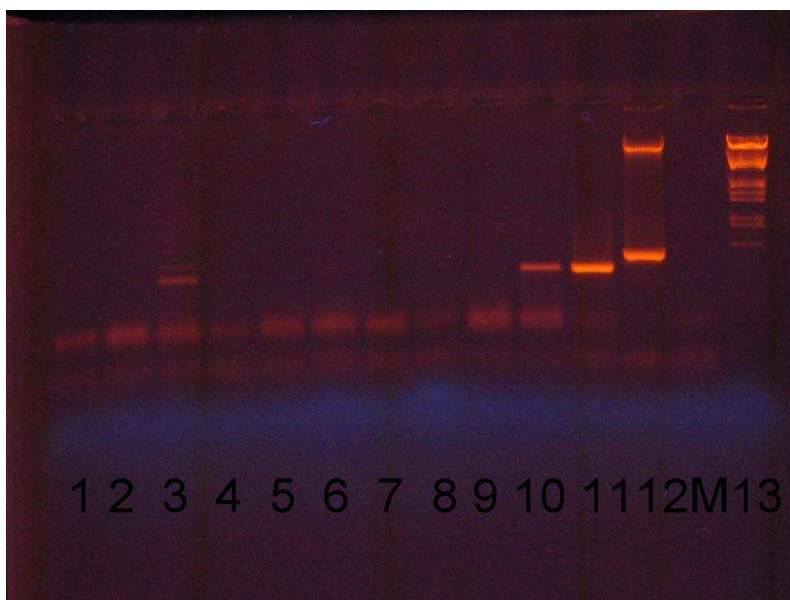
B.2.7 Αποτελέσματα αντίδρασης πολλαπλής PCR σε φυτικά εκχυλίσματα από πιθανά μολυσμένους κόνδυλους πατάτας

Στην Εικόνα 14 παρουσιάζονται τα προϊόντα μιας εκ των αντιδράσεων πολλαπλής PCR που πραγματοποιήθηκε σε πήκτωμα αγαρόζης 1%.



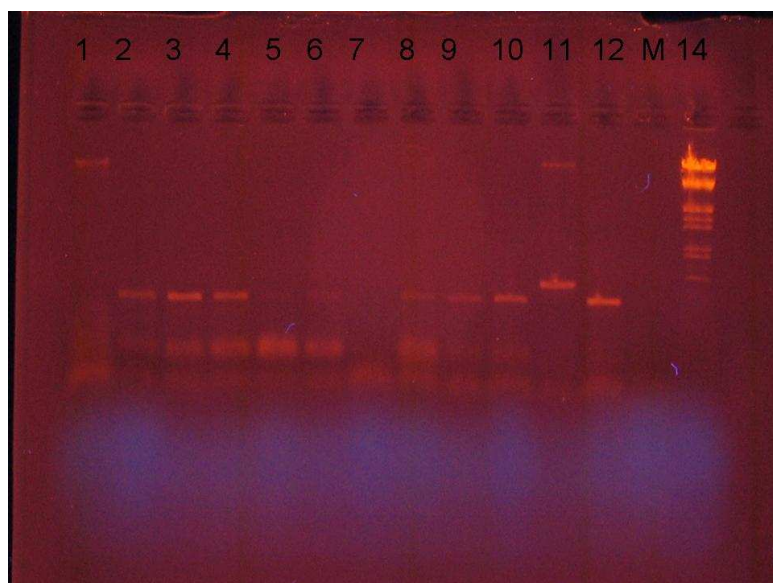
Εικόνα 14. Πήκτωμα αγαρόζης με τα προϊόντα πολλαπλής PCR σε φυτικά εκχυλίσματα από πιθανά μολυσμένους κόνδυλους πατάτας: **1)** 4320, **2)** 4269, **3)** 3929, **4)** 3919, **5)** 3904, **6)** 3902, **7)** 3901, **8)** 3894, **9)** 3885, **10)** 3867, **11)** 4695, **12)** 4723, **13)** *C.m.s.* 4075A, **14)** DNA φυτικού ιστού πατάτας, **15)** μάρτυρας αντίδρασης, **16)** Μοριακός Δείκτης: λ/EcoR I/Hind III

Τα φυτικά εκχυλίσματα με κωδικό 3904 (δείγμα #5), 3902 (δείγμα #6), 3901 (δείγμα #7), 3894 (δείγμα #8), 3867 (δείγμα #10) παρουσίασαν δύο ζώνες (Εικ. 14). Μία ζώνη, ίδια με του βακτηριακού στελέχους *C.m.s.* 4075A μήκους 502bp (θετικός μάρτυρας) και μία δεύτερη, ίδια με την ζώνη που εμφάνισε το DNA πατάτας (εσωτερικός μάρτυρας αντίδρασης), μήκους 377 bp. Σύμφωνα με ΦΕΚ 562B/2007 τα δείγματα που παρουσιάζουν τις δύο αυτές ζώνες χαρακτηρίζονται σε πρώτη φάση ως μολυσμένα από το βακτήριο *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* και η δοκιμή PCR χαρακτηρίζεται θετική στην ανίχνευση του βακτηρίου. Τα φυτικά εκχυλίσματα που εμφανίζουν μόνο μία ζώνη ίδια με του εσωτερικού μάρτυρα χαρακτηρίζονται σε πρώτη φάση ως αρνητικά από μόλυνση. Το φυτικό εκχύλισμα με κωδικό 3885 (δείγμα #9) δεν έδωσε κανένα προϊόν, ενώ τα εκχυλίσματα από υγιείς κονδύλους πατάτας με κωδικό 4695 (δείγμα #11), 4723 (δείγμα #12) παρουσίασαν το αναμενόμενο αμπλικόνιο του εσωτερικού μάρτυρα (DNA φυτικού ιστού πατάτας). Ο μάρτυρας της αντίδρασης που περιείχε αποστειρωμένο υπερκάθαρο νερό δεν εμφάνισε κανένα προϊόν γεγονός που σημαίνει πως στην προετοιμασία της αντίδρασης δεν υπήρξε καμία επιμόλυνση δείγματος καθώς το δείγμα του μάρτυρα παρασκευαζόταν με το μείγμα της αντίδρασης πάντα τελευταίο.



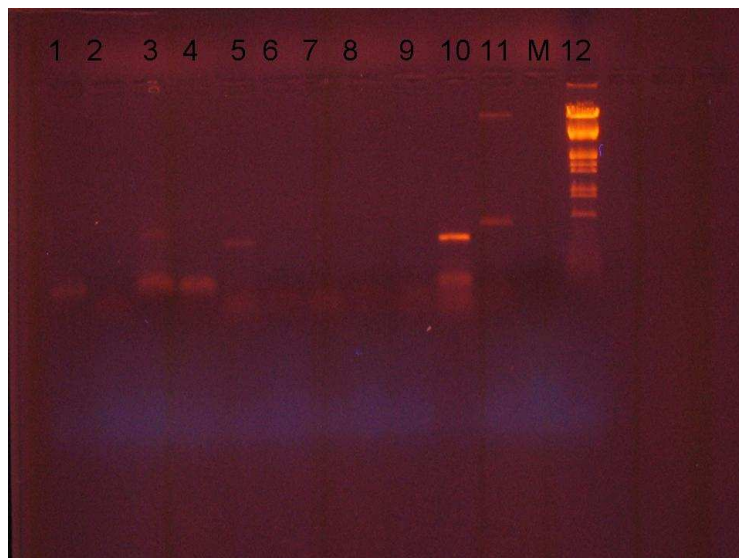
Εικόνα 15. Προϊόντα πολλαπλής PCR σε πήκτωμα αгарόζης 1%: **1)** 3514, **2)** 3497, **3)** 3493, **4)** 3462, **5)** 3460, **6)** 3452, **7)** 3443, **8)** 3395, **9)** 4691, **10)** 4683, **11)** DNA φυτού πατάτας, **12)** *C.m.s.* 4075 A, Μάρτυρας αντίδρασης, **13)** Μοριακός Δείκτης: λ/EcoR I/Hind III

Στις αντιδράσεις πολλαπλής PCR που πραγματοποιήθηκαν πολλά από τα προς εξέταση δείγματα δεν παρουσίασαν κανένα ενισχυμένο προϊόν, παρόλο που στην μέτρηση με το νανόμετρο μετρήθηκε το DNA των φυτικών αυτών εκχυλισμάτων και στο τρέξιμο σε πήκτωμα αгарόζης των αντίστοιχων απομονώσεων των DNA εμφανιζόταν ζώνη μεγάλου μεγέθους. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 15 τα φυτικά εκχυλίσματα με κωδικό 3514 (δείγμα #1), 3497 (δείγμα #2), 3462 (δείγμα #4), 3460 (δείγμα #5), 3452 (δείγμα #6), 3443 (δείγμα #7), 3395 (δείγμα #8), 4691 (δείγμα #9) δεν έχουν σχηματίσει κανένα προϊόν ενώ μόνο στο φυτικό εκχύλισμα με κωδικό 3493 (δείγμα #3) έχουν σχηματιστεί δύο ζώνες μεγέθους 502bp και 377bp αντίστοιχα. Το φυτικό εκχύλισμα 3493 χαρακτηρίζεται θετικό στην ανίχνευση του βακτηρίου καθώς εμφάνισε την ίδια ζώνη με τον θετικό μάρτυρα (DNA βακτηριακού στελέχους *C.m.s.* 4075 A, δείγμα # 12) και την ζώνη του εσωτερικού μάρτυρα της αντίδρασης (DNA από φυτικό ιστό πατάτας δείγμα #11).



Εικόνα 16. Αποτελέσματα πολλαπλής PCR σε φυτικά εκχυλίσματα από πιθανά μολυσμένους κονδύλους πατάτας: **1)** 3774, **2)** 3538, **3)** 3536, **4)** 3523, **5)** 3522, **6)** 3521, **7)** 3520, **8)** 3519, **9)** 4695, **10)** 4701, **11)** *C.m.s.* 4075 A, **12)** DNA φυτού πατάτας, **M:** μάρτυρας αντίδρασης **14)** Μοριακός Δείκτης: λ/EcoR I/Hind III

Συνολικά εξετάστηκαν 42 δείγματα ύποπτα για μόλυνση από το βακτήριο που προκαλεί την δακτυλιωτή σήψη της πατάτας.



Εικόνα 17. Προϊόντα πολλαπλής PCR σε φυτικά εκχυλίσματα από πιθανά μολυσμένους κονδύλους πατάτας: **1)** 3394, **2)** 3383, **3)** 3382, **4)** 3380, **5)** 4835, **6)** 3379, **7)** 3378, **8)** 3376, **9)** 3373, **10)** DNA φυτού πατάτας, **11)** *C.m.s.* 4075 A, **M:** μάρτυρας αντίδρασης, **12)** Μοριακός Δείκτης: λ/EcoR I/Hind III

Στα δεκατρία, από αυτά ανιχνεύθηκε το βακτήριο *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* ενώ έντεκα δείγματα ήταν μη μολυσμένα, καθώς σε αυτά ενισχύθηκε μόνο το προϊόν του εσωτερικού μάρτυρα (DNA φυτικού ιστού πατάτας με ζώνη μεγέθους 377bp) (βλ.Εικ. 16). Σε δεκαοχτώ δείγματα δεν ενισχύθηκε κανένα προϊόν (βλ.Εικ. 15, Εικ. 17). Στα δείγματα αυτά εφαρμόστηκε εκ νέου η αντίδραση πολλαπλής PCR αλλά πάλι δεν εμφάνισαν καμία ζώνη στο πήκτωμα αγαρόζης.

B.3 ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Ο βασικός στόχος αυτής της εργασίας ήταν να ανιχνευθεί το βακτήριο *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* σε δείγματα που παρασκευάστηκαν από κονδύλους πατάτας και τα οποία σε μία πρώτη φάση της διαδικασίας ελέγχου είχαν θεωρηθεί ως θετικά ή ύποπτα στην παρουσία του παθογόνου με άλλες μεθόδους (δοκιμή IF, χρώση κατά Gram), με την μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης και την τεχνολογία της Real Time PCR. Ο πρώτος στόχος επιτεύχθηκε με την χρήση επικυρωμένων πρωτόκολλων από το φύλλο εφημερίδας κυβερνήσεως (ΦΕΚ)

562B/2007. Η τεχνολογία της Real Time PCR δεν χρησιμοποιήθηκε καθώς η εφημερίδα κυβερνήσεως δεν αναφέρει κανένα επικυρωμένο πρωτόκολλο για την εφαρμογή αυτή.

Η εξειδίκευση των εκκινήτων για την ανίχνευση του βακτηρίου της δακτυλιωτής σήψης επιβεβαιώθηκε με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, όπου από τα αποτελέσματα (Εικ. 11) διαπιστώθηκε πως το ενισχυμένο τμήμα DNA μήκους 502bp σχηματίστηκε μόνο στα βακτηριακά στελέχη του *C.m.s.*

Οι αντιδράσεις PCR που πραγματοποιήθηκαν με το φυτικό εκχύλισμα πατάτας 3906 έγιναν με σκοπό να ελεγχθούν τα παραγόμενα προϊόντα από την απομόνωση DNA των φυτικών εκχυλισμάτων. Αφού διαπιστώθηκε η εγκυρότητα του πρωτοκόλλου όπως φαίνεται και από τα αποτελέσματα (Εικ. 12,13) ακολούθησαν οι αντιδράσεις των φυτικών εκχυλισμάτων μέσω της πολλαπλής PCR. Ο εσωτερικός μάρτυρας της PCR (DNA από φυτό πατάτας) χρησιμοποιήθηκε ως δείκτης εγκυρότητας της δοκιμής PCR και για να ανιχνεύσει τα πιθανά λανθασμένα αρνητικά αποτελέσματα που υπάρχουν σε ενδεχόμενη αποτυχία της αντίδρασης.

Πίνακας 8. Συγκεντρωτικά αποτελέσματα των αντιδράσεων πολλαπλής PCR σε φυτικά εκχυλίσματα από κονδύλους πατάτας υπόπτους για μόλυνση από το φυτοπαθογόνο βακτήριο *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*

ΚΩΔΙΚΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	ΜΟΛΥΣΜΕΝΟ ΔΕΙΓΜΑ				ΜΗ ΜΟΛΥΣΜΕΝΟ ΔΕΙΓΜΑ			ΚΑΤΕΣΤΡΑΜΜΕΝΟ ΔΕΙΓΜΑ			
		3929	3906	3904		4320	4269		3885	3774	3520
	3902	3901	3894		3919	3538		3497	3462	3460	3452
	3867	3493	3372		3536	3523		3443	3395	3394	3383
					3522	3521		3382	3380	3379	3378
	3362	3352	3318	3314	3519	3512	3510	3376		3373	
ΣΥΝΟΛΟ	13				11			18			

Στον Πίνακα 8 παρουσιάζονται συγκεντρωτικά τα αποτελέσματα από τις αντιδράσεις πολλαπλής PCR που πραγματοποιήθηκαν σε σαράντα δύο φυτικά εκχυλίσματα από κονδύλους πατάτας ύποπτους για μόλυνση από το φυτοπαθογόνο βακτήριο *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*. Η αδυναμία ενίσχυσης προϊόντων των δεκαοχτώ δειγμάτων μπορεί να οφείλεται σε δύο ενδεχόμενα. Το πρώτο ενδεχόμενο είναι τα δείγματα να προέρχονταν από κονδύλους που δεν είχαν ξεπλυθεί καλά από το χώμα και έτσι υπήρξε στην συνέχεια παρεμπόδιση στην αντίδραση λόγω παρουσίας χουμικών οξέων (Patrik K.H., 2000). Το άλλο ενδεχόμενο είναι πως μπορεί, λόγω συντήρησης των δειγμάτων για μεγάλο χρονικό διάστημα στους 4 °C, το DNA που απομονώθηκε να ήταν αποδιατεταγμένο. Έτσι, οι εκκινητές δεν μπόρεσαν να υβριδοποιηθούν με το DNA με αποτέλεσμα την αδυναμία σχηματισμού προϊόντων.

Συμπερασματικά μπορεί να ειπωθεί πως η τεχνική της πολλαπλής PCR μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως διαγνωστικό εργαλείο για την ανίχνευση του φυτοπαθογόνου βακτηρίου *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* καθώς πρόκειται για μια μέθοδο που παράγει γρήγορα και αξιόπιστα αποτελέσματα. Ο συνδυασμός της τεχνικής και με άλλες μεθόδους ανίχνευσης έχει ήδη μελετηθεί και συστήνεται για την ασφαλή εκτίμηση των αποτελεσμάτων (E.P.P.O., 2006).

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Αποτελέσματα μέτρησης με τη συσκευή νανόμετρο (nanodrop)

Πίνακας 9. Αρχικές συγκεντρώσεις DNA φυτικών εκχυλισμάτων από πιθανά μολυσμένους κονδύλους πατάτας

ΚΩΔΙΚΟΙ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΦΥΤΙΚΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΑΠΟ ΠΙΘΑΝΑ ΜΟΛΥΣΜΕΝΟΥΣ ΚΟΝΔΥΛΟΥΣ ΠΑΤΑΤΑΣ	ΑΡΧΙΚΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ DNA (ng/μl)	ΚΩΔΙΚΟΙ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΦΥΤΙΚΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΑΠΟ ΠΙΘΑΝΑ ΜΟΛΥΣΜΕΝΟΥΣ ΚΟΝΔΥΛΟΥΣ ΠΑΤΑΤΑΣ	ΑΡΧΙΚΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ DNA (ng/μl)
4320	24,52	3497	75,8
4269	52,04	3493	18,84
3929	30,2	3462	27,91
3919	11,22	3460	17,88
3906	20,42	3452	73,15
3904	34,32	3443	115,52
3902	25,82	3395	13,5
3901	24,44	3394	9,52
3894	17,86	3383	488,36
3885	67,76	3382	148,03
3867	19,14	3380	297,61
3774	0,33	3379	42,51
3538	24,88	3378	42,59
3536	11,36	3376	44,35
3523	19,59	3373	60,14
3522	17,55	3372	218,28
3521	18,75	3362	95,21
3520	124,11	3356	18,44
3519	143,07	3318	27,74
3514	15,15	3314	75,63

Πίνακας 10. Αρχικές συγκεντρώσεις DNA βακτηριακών στελεχών

ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΟ ΣΤΕΛΕΧΟΣ	ΑΡΧΙΚΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ DNA (ng/μl)	ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΟ ΣΤΕΛΕΧΟΣ	ΑΡΧΙΚΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ DNA (ng/μl)
<i>C.m.s.</i> 4075A	89.11	<i>C.m.s.</i> 4083A	64.18
<i>C.m.s.</i> 4075B	82.43	<i>C.m.s.</i> 4083B	144.44

Πίνακας 11. Αρχικές συγκεντρώσεις DNA σε φυτικά εκχυλίσματα από υγιείς κονδυλούς πατάτας

ΚΩΔΙΚΟΙ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΦΥΤΙΚΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΑΠΟ ΥΓΙΕΙΣ ΚΟΝΔΥΛΟΥΣ ΠΑΤΑΤΑΣ	ΑΡΧΙΚΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ DNA (ng/μl)	ΚΩΔΙΚΟΙ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΦΥΤΙΚΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΑΠΟ ΥΓΙΕΙΣ ΚΟΝΔΥΛΟΥΣ ΠΑΤΑΤΑΣ	ΑΡΧΙΚΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ DNA (ng/μl)
4723	9,10	4691	10,04
4720	8,93	4683	13,31
4701	19,36	4675	7,73
4695	11,83	4661	7,64

B.4 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Agrios N. G., 2005. "Plant phytopathology", fifth edition, Elsevier Academic Press, USA, Σελ. 41-45, 54-57, 72-73, 618-627, 639, 649-651.
- Βερβερίδης Φ., Ταμπακάκη Α., 2003. "Εργαστηριακές ασκήσεις βιοτεχνολογίας φυτών", ΣΤΕΓ ΤΕΙ ΗΡΑΚΛΕΙΟΥ, Σελ. 60-74.
- Bradshaw J. E., Mackay G. R., 1994. "Potato genetics", Εκδόσεις CABI, U.K., Σελ. 3-17, 429-443, 533-535.
- Γκούμας Δ., 2005. "Εργαστηριακές ασκήσεις φυτοπαθολογίας", ΣΤΕΓ ΤΕΙ ΗΡΑΚΛΕΙΟΥ, Σελ. 48-55.
- Γκούμας Δ., Αυγελής Α., Τζορτζακάκης Ε., Μαλαθράκης Ν., Ροδιτάκης Ν., 2001. "Τεχνικός οδηγός ασθενειών και εχθρών της πατάτας", Εκδόσεις ΕΘ.Ι.ΑΓ.Ε., Σελ. 7-9, 17-21.
- Davidson, 2003, α. "Real TimePCR", Davidson College, Davidson. Διαθέσιμο on line <http://www.bio.davidson.edu/Courses/Molbio/Molstudents/spring2003/Pierce/realtimepcr/html> [Τελευταία πρόσβαση 05/09/2010].
- Davidson, 2003, β. "Molecular beacon", Davidson College, Davidson. Διαθέσιμο on line <http://www.bio.davidson.edu/courses/genomics/method/realttimepcr.html> [Τελευταία πρόσβαση 03/09/2010].
- Δημητράκης Κ.Γ., 1998. "Λαχανοκομία", Εκδόσεις ΑΓΡΟΤΥΠΟΣ Α.Ε., Αθήνα, Σελ. 88-95, 191-206.
- Eppendorf, 2001. "Mastercycler family", Διαθέσιμο on line: <http://www.eppendorf.com/int/index.php?sitemap=2.1&action=products&contentid=1&catalognode=10364> [Τελευταία πρόσβαση 5/10/2010]
- European and Mediterranean Plant Protection Organization (E.P.P.O), 2006. "*Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*", EPPO Bulletin, 36 :99-109
- Gene Quantification, 2003. "DNA detection with SYBR Green I dye", Gene Quantification Διαθέσιμο on line: <http://www.genequantification.de/chemistry.html#top> [Τελευταία πρόσβαση 6/10/2010]

- Hunt M., 2009 “Real time PCR Tutorial”, University of South Carolina. Διαθέσιμο on line <http://pathmicro.med.sc.edu/pcr/realtime-home.htm> [Τελευταία πρόσβαση 2/10/2010]
- Lequin M. Rudolf, 2005 “Enzyme Immunoassay (EIA)/Enzyme-Linked Immunosorbent Assay”, *Clinical Chemistry*, 51 :2415-2418
- Li X., De Boer S.H., 1995. “Selection of polymerase chain reaction from an RNA intergenic spacer region for specific detection of *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*”, *Phytopathology*, 85 :837-842
- Mills D., Russel W., Hanus J.W., 1997. “Specific detection of *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* by amplification of three unique DNA sequences isolated by subtraction hybridization” *Phytopathology*, 87 :853-861
- Mills D., Russel W., Brian W., 2003. “Parameters for specific detection of *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* in potato stems and tubers by multiplexed PCR-ELISA”, *American Journal of Potato Research* issue jul/aug 2003, Διαθέσιμο on line http://findarticles.com/p/articles/mi_qa4069/is_200307/ai_n9246057/?tag=content:coll [Τελευταία πρόσβαση 15/09/2010].
- Μπενάκειο Φυτοπαθολογικό Ινστιτούτο, 2006. “Κατευθυντήριες οδηγίες μακροσκοπικών ελέγχων για τη διαπίστωση ή μη συμπτωμάτων της δακτυλιωτής σήψης της πατάτας”, Διαθέσιμο on line <http://www.bpi.gr/photos/home/files/Clavibacter%20michiganensis.pdf> [Τελευταία πρόσβαση 15/09/2010].
- Mumford R., Boonham N., Tomlinson J., Barker I., 2006. “Advances in molecular phytodiagnostics-new solutions for old problems” *European Journal of Plant Pathology*, 116 :1-19
- Pastrik K.H., 2000. “Detection of *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* in potato tubers by multiplex PCR with coamplification of host DNA” *European Journal of Plant Pathology*, 106 :155-165
- Παντελίδου- Μελιφρονίδου Α., 2007. “Επιβλαβείς οργανισμοί φυτών και φυτικών προϊόντων, επιβλαβείς οργανισμοί καραντίνας”, Τομέας Δημοσιότητας Υπουργείου Γεωργίας, Φυσικών Πόρων και Περιβάλλοντος, Λευκωσία Διαθέσιμο

on line
[http://www.moa.gov.cy/moa/da/da.nsf/All/9612574543DBE679C225740C004391D9/\\$file/12007EpiVLavisOrganismi.pdf?OpenElement](http://www.moa.gov.cy/moa/da/da.nsf/All/9612574543DBE679C225740C004391D9/$file/12007EpiVLavisOrganismi.pdf?OpenElement) [Τελευταία πρόσβαση 15/09/2010].

Rademaker J.L., De Bruijn F.J., 1997. “Characterization and classification of microbes by rep-PCR genomic fingerprinting and computer-assisted pattern analysis”, DNA markers: protocols, applications and overviews, Willey-Liss INC., New York, Σελ. 151-171

Roche, 1999. “Manual for successful PCR”, Roche, Σελ. 12-15

RT-PCR Research, 2004. “What is real time PCR”, RT-PCR Research Διαθέσιμο on line: <http://www.rt-pcr.com/> [Τελευταία πρόσβαση 6/10/2010]

Schaad N.W., Frederick D.R., 2002. “Real-time PCR and its application for rapid plant disease diagnostics” Canadian Journal of Plant Pathology, 21 :250-258

Schaad N.W., Cheong S.S., Tamaki S., Hatziloukas E., Panopoulos N.J., 1995. “A combined biological and enzymatic amplification (BIO-PCR) technique to detect *Pseudomonas syringae* p.v. *phaseolicola* in bean seed extracts”, Phytopathology, 85 :243-248

Schaad N.W., Jones J.B., Chun W., 2001. “Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria” third edition, APS PRESS, USA Σελ. 1-15, 321-352, 218-234

Schneider J.B., Zhao J., Orser C.S., 1993, “Detection of *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* by DNA amplification”, FEMS Microbiology Letters, 109 (:207-212)

Stratagene, 2006. “Introduction to Quantitative pcr”, Stratagene, La Jolla, CA. Σελ..3-11,

Τζάμος Ε., 2004. “Φυτοπαθολογία” Εκδόσεις Σταμούλη, ΑΘΗΝΑ, Σελ. 259-277, 465-466, 456-463

Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων, 2010 “Χάρτης κλιμάκωσης της καλλιέργειας της πατάτας”, Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων Διαθέσιμο on line http://www.minagric.gr/greek/agro_pol/Maps/patates1.htm [Τελευταία πρόσβαση 16/09/2010].

Φ.Ε.Κ. 562B/2007, 2007 “Μέτρα για την καταπολέμηση του παθογόνου των γεώμηλων *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* (Spieckerman και Kotthoft) Davis et al. σε συμμόρφωση προς την Οδηγία 93/85/ΕΚ του Συμβουλίου”, Εφημερίδα της Κυβερνήσεως, Αρ. Φύλλου 562, Σελ. 10815-10840