



ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΜΟΡΙΑΚΗ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΑΠΟΜΟΝΩΣΕΩΝ ΤΟΥ ΒΑΚΤΗΡΙΟΥ
***Dickeya* spp. ΑΠΟ ΠΑΤΑΤΑ**

ΜΑΡΙΑΝΘΗ ΠΑΓΟΥΛΑΤΟΥ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: Δρ. ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ ΓΚΟΥΜΑΣ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2011

Στην Ιωάννα...

Ευχαριστίες

Με την ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας, θα ήθελα να αναφέρω δυο λόγια από καρδιάς για όλους αυτούς που με βοήθησαν με οποιοδήποτε τρόπο κατά την διάρκεια των τελευταίων αυτών χρόνων.

Κατ' αρχήν, θα ήθελα να εκφράσω τις βαθύτατες ευχαριστίες μου στον εισηγητή μου, Καθηγητή κ. Δημήτριο Γκούμα, που μου έδωσε την ευκαιρία να ασχοληθώ με το συγκεκριμένο αντικείμενο, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, την καθοδήγηση, τις πολύτιμες συμβουλές και γνώσεις που μου μετέδωσε. Με έκανε να αγαπήσω ακόμα πιο πολύ το συγκεκριμένο αντικείμενο και πιστεύω βαθύτατα ότι εκτός από εξαιρετικός Καθηγητής, είναι και ένας υπέροχος άνθρωπος.

Ευχαριστώ επίσης θερμά, το Δρ. Μάνο Τραντά και το Δρ. Παναγιώτη Σαρρή, για την βοήθεια που μου προσέφεραν κατά την εκτέλεση του μοριακού μέρους της εργασίας.

Ευχαριστώ τη Δέσποινα Σταύρου για την βοήθειά που μου προσέφερε και για την άψογη συνεργασία που είχαμε κατά την διάρκεια της εκτέλεσης του πειραματικού μέρους της εργασίας. Πιστεύω ότι στο πρόσωπό της έχω βρει μια καινούρια φίλη.

Ευχαριστώ την αγαπημένη μου φίλη Ζωή Λιαντράκη, για την βαθεία και ειλικρινή φιλία της όλα αυτά τα χρόνια, όπως και όλους μου τους φίλους, τους, για την συμπαράστασή τους.

Θέλω να ευχαριστήσω ιδιαίτερα, τον Μηνά Ιακωβίδη, όχι μόνο για τη βοήθειά που μου προσέφερε, αλλά και για την συμπαράσταση, την κατανόηση, την υπομονή και την αγάπη που μου δείχνει όλα αυτά τα χρόνια. Η υποστήριξη που μου προσέφερε, είναι πολύτιμο αγαθό για μένα και νιώθω πραγματικά τυχερή που υπάρχει στη ζωή μου.

Θα ήθελα να εκφράσω την απεριόριστη ευγνωμοσύνη μου στους γονείς μου Γιώργο και Παρασκευή και στα αδέρφια μου Αλέξη, Σταύρο και Τζέρρυ για την αγάπη τους, την συμπαράστασή τους και την ηθική και οικονομική τους βοήθεια όλα τα χρόνια των σπουδών μου. Ευχαριστώ επίσης την ανιψιά μου Βίβιαν (τη Μπουμπού μου), που με την γέννησή της έφερε τεράστια χαρά σε μένα και στην οικογένειά μου. Αν και ζω τόσα χρόνια μακριά τους, η σκέψη μου και η καρδιά μου βρίσκεται κάθε στιγμή κοντά τους.

Τέλος, θα ήθελα να αφιερώσω την εργασία μου σε ένα υπέροχο πλάσμα το οποίο έφυγε πολύ νωρίς από κοντά μας και η απώλειά της έχει αφήσει τεράστιο κενό στην καρδιά όλων μας, στην Ιωάννα Καρρή.

Με εκτίμηση,
Μαριάνθη Παγουλάτου

Περίληψη

Το *Dickeya solani* (δόκιμη ονομασία), είναι ένα αναδυόμενο, έντονα μολυσματικό παθογόνο βακτήριο, το οποίο προσβάλλει κυρίως φυτά πατάτας προκαλώντας τεράστιες απώλειες στην παραγωγή. Πρόκειται για αρκετά συγγενικό είδος με το βακτήριο *Dickeya dianthicola* (συν. *Erwinia chrysanthemi*, pv. *dianthicola*), το οποίο από το 1970 προκαλούσε προβλήματα σε καλλιέργειες πατάτας στην Ευρώπη. Μεταφέρεται κυρίως μέσω μολυσμένου πολλαπλασιαστικού υλικού «πατατόσπορο» και προκαλεί συμπτώματα παρόμοια με εκείνα της ασθένειας «μελάνωση του λαιμού της πατάτας». Πολλές φορές συγχέεται με άλλα συγγενικά του είδη αλλά διαφοροποιείται από αυτά λόγω της έντονης μολυσματικότητας του ιδιαίτερα σε υψηλές θερμοκρασίες. Είναι ιδιαίτερα ανταγωνιστικό σε σχέση με τα υπόλοιπα συγγενικά του είδη, εκτοπίζοντάς τα και επικρατώντας σαν το κύριο παθογόνο αίτιο στην καλλιέργεια.

Σήμερα, τα νέα, πιο επιθετικά στελέχη του βακτηρίου έχουν εγκατασταθεί σε καλλιέργειες πατάτας σε πολλές ευρωπαϊκές χώρες και στο Ισραήλ, προκαλώντας σημαντικά προβλήματα. Η εισαγωγή μολυσμένου με το βακτήριο πολλαπλασιαστικού υλικού, θα μπορούσε να οδηγήσει σε απρόβλεπτες συνέπειες στην παραγωγή πατάτας και στην Ελλάδα, αν αναλογιστούμε ότι το 80% του απαιτούμενου στη χώρα μας πατατόσπορου εισάγεται από τις χώρες όπου το βακτήριο δημιουργεί σημαντικά προβλήματα, σε συνδυασμό με το ότι οι ξηροθερμικές κλιματολογικές συνθήκες που επικρατούν είναι ιδανικές για την ανάπτυξη του παθογόνου.

Κατά τα έτη 2009-2011, από προσβεβλημένα φυτά πατάτας, απομονώθηκαν στελέχη τα οποία σύμφωνα με προκαταρκτικές βιοχημικές δοκιμές που διεξήχθησαν στο εργαστήριο Βακτηριολογίας του Τ.Ε.Ι. Κρήτης, παρουσίασαν παρόμοιο φαινοτυπικό προφίλ με τα στελέχη του γένους *Dickeya*.

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι ο έλεγχος της παθογένειας των στελεχών του βακτηρίου *Dickeya* spp., που απομονώθηκαν από προσβεβλημένα φυτά πατάτας, καθώς και η ταυτοποίησή τους, εφαρμόζοντας διάφορες τεχνικές μοριακής αποτύπωσης (rep-PCR, BOX και ERIC-PCR *ade*-PCR, *dnaX*-PCR και 16S rDNA-PCR) και συγκρίνοντας τα αποτελέσματα με στελέχη αναφοράς του παθογόνου.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που διεξήχθησαν σε μοριακό επίπεδο και σε συνδυασμό με τα μορφολογικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά αλλά και την παθογένεια

των βακτηριακών στελεχών που απομονώθηκαν από προσβεβλημένους ιστούς πατάτας, προέκυψε ότι το παθογόνο αίτιο είναι ένα βακτήριο που ανήκει στην βιοποικιλία 3 (biovar 3) του *Dickeya* spp. (*Dickeya solani*) και πρόκειται για την πρώτη αναφορά του βακτηρίου αυτού, ως παθογόνο αίτιο της ασθένειας «μελάνωση του λαιμού της πατάτας» στην Ελλάδα.

Abstract

Dickeya solani (proposed name), is an emerging, strongly infective pathogenic bacterium, which mainly affects potato plants, causing major production losses. It is quite close related with the bacterium *Dickeya dianthicola* (syn. *Erwinia chrysanthemi* pv. *dianthicola*), which since 1970 has caused problems in potato crops in Europe. It is primarily spread through the infected propagating material “potato tubers” and causes symptoms similar to those of the disease “blackleg” of potato plants. It is often confused with other related species, but it differs from them, caused of its intense infectivity, especially in high temperature exposure. It is highly competitive, compared with other relative species, displacing them and prevailed as the main pathogen in potato crops.

Nowadays, new and more aggressive strains of this bacterium, take up residence in potato crops in many european countries and also in Israel, causing various problems. The contaminated propagating material insertion could lead to unpredictable consequences in potato production also in Greece, considering that over 80% of the hellenic required potato tubers is imported from countries where the bacterium causes significant problems, in conjunction with infected seed transmission and the dry climate in Greece, which is ideal for the pathogen.

During the years 2009-2011, from infected potato plants were isolated bacterial strains, which according to preliminary biochemical tests, conducted in the Bacteriology Laboratory of TEI Crete, showed similar phenotypic profile with the *Dickeya* genus.

The purpose of this study is to test the pathogenicity of the *Dickeya* spp. strains, isolated from infected potato plants, and their identification as well, by applying various molecular fingerprinting techniques (rep-PCR, BOX and ERIC-PCR *ade*-PCR, *dnaX*-PCR και 16S rDNA-PCR), and comparing the results, using reference strains of the pathogen.

According to the results obtaining in molecular level and in combination with morphological and biochemical characteristics and the pathogenicity of these strains as well, isolated from infected potato tissues, showed that the pathogen is the bacterium *Dickeya* spp. biovar 3 (*Dickeya solani*) and it is the first record of this bacterium as a pathogen of the “blackleg” disease in Greece so far.

Περιεχόμενα

ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1
1.1 Ανασκόπηση των σημαντικότερων βακτηρίων που προσβάλλουν την πατάτα.....	2
1.2 Συμπτώματα και στοιχεία επιδημιολογίας ασθενειών της πατάτας που προκαλούνται από βακτήρια του γένους <i>Erwinia</i> spp.....	3
1.3 Το νέο παθογόνο βακτήριο <i>Dickeya solani</i>	5
1.3.1 Εισαγωγικά στοιχεία.....	5
1.3.2 Στοιχεία επιδημιολογίας και συμπτώματα της ασθένειας που προκαλείται από το <i>Dickeya solani</i> στην πατάτα	9
1.3.3 Απώλειες στην παραγωγή ανά την Ευρώπη εξαιτίας του βακτηρίου <i>Dickeya solani</i>	10
1.4 Αντιμετώπιση	11
1.5 Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης	11
1.5.1 Εφαρμογές PCR.....	13
1.6 Μέθοδοι μοριακής ταυτοποίησης βακτηρίων	13
1.7 Διαγνωστικές μέθοδοι για την ταυτοποίηση του βακτηρίου <i>Dickeya</i> spp.	14
1.7.1 Η τεχνολογία <i>rep</i> -PCR.....	15
1.7.2 Οι <i>ade</i> εκκινητές ως εργαλείο για την μοριακή ταυτοποίηση των βακτηρίων <i>Dickeya</i> spp.....	16
1.7.3 Το γονίδιο <i>dnaX</i> ως εργαλείο για την μοριακή ταυτοποίηση του βακτηρίου <i>Dickeya</i> spp.....	16
1.7.4. Η ενίσχυση του 16s rDNA ως εργαλείο για την μοριακή ταυτοποίηση των βακτηρίων <i>Dickeya</i> spp.	17
1.8 Αλληλούχιση DNA (DNA sequencing)	17
1.10 Σκοπός της μελέτης	18
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	19
2.1 Εξαγωγή βακτηριακών στελεχών από την συλλογή	20
2.2 Δοκιμές παθογένειας	20
2.2.1 Αντίδραση υπερευαισθησίας.....	20
2.2.3 Τεχνητές μολύνσεις	22
2.3 Μοριακή ταυτοποίηση απομονώσεων του βακτηρίου <i>Dickeya</i> spp.	23
2.3.1 Δημιουργία υγρής καλλιέργειας για απομόνωση ολικού DNA από τα βακτηριακά στελέχη	23
2.3.2 Απομόνωση ολικού DNA από βακτηριακά κύτταρα	23
2.3.3 Ηλεκτροφόρηση απομονομένου DNA σε πήκτωμα αγαρόζης	24
2.4 Προετοιμασία δειγμάτων.....	25
2.5 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR).....	26
2.5.1 Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για τις αντιδράσεις PCR.....	26
2.6 Αντιδράσεις PCR.....	27
2.6.1 <i>rep</i> -PCR	27
2.6.2 <i>Ade</i> -PCR	28
2.6.3 <i>dnaX</i> PCR	29
2.6.4 16S rDNA-PCR.....	30
2.6.5 Επιβεβαίωση των προϊόντων της PCR με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.....	30
2.7 Απομόνωση επιθυμητού τμήματος DNA από πήκτωμα αγαρόζης.....	31
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	32
3.1 Δοκιμές παθογένειας	33

3.1.1 Αντίδραση υπερευαισθησίας.....	33
3.1.2 Αποτελέσματα τεχνητών μολύνσεων.....	33
3.1.3 Ανίχνευση απομονωμένων DNA σε πήκτωμα αγαρόζης.....	33
3.1.4 Υπολογισμός συγκεντρώσεων απομονωμένων DNA.....	34
3.1.5 Αποτελέσματα <i>ger</i> -PCR.....	34
3.1.6 Αποτελέσματα <i>ade</i> -PCR.....	35
3.1.7 Αποτελέσματα <i>dnaX</i> -PCR.....	35
3.1.8 Αποτελέσματα αλληλούχισης του γονιδίου <i>dnaX</i>	37
3.1.9 Αποτελέσματα 16s rDNA-PCR.....	38
ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	39
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	42
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	48
6.1 Αποτελέσματα αλληλούχισης του γονιδίου <i>dnax</i>	49
6.2 Φωτογραφικό υλικό.....	61
6.3 Δημοσίευση στο περιοδικό New Disease Reports.....	67
6.4 Poster και περίληψη συμμετοχής στο 25ο Συνέδριο της Ελληνικής Εταιρείας της Επιστήμης των Οπωροκηπευτικών.....	68
6.5 Δημοσίευση στο περιοδικό Γεωργία και Κτηνοτροφία.....	70

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Ανασκόπηση των σημαντικότερων βακτηρίων που προσβάλλουν την πατάτα

Τα σημαντικότερα βακτήρια που προσβάλλουν την πατάτα (*Solanum tuberosum* οικ. *Solanaceae*), ταξινομούνται στα βακτηριακά γένη *Erwinia*, *Clavibacter*, *Ralstonia* και *Streptomyces* (Γκούμας κ.α., 2001). Οι αντίστοιχες ασθένειες είναι γνωστές ως μαλακή σήψη, δακτυλιωτή σήψη, καστανή σήψη και ακτινομύκωση της πατάτας. Μέχρι πριν από λίγα χρόνια, ήταν κοινά αποδεκτό ότι τα βακτήρια που ανήκουν στα είδη του γένους *Erwinia* (συν. *Pectobacterium*) και σε μικρότερη έκταση στο γένος *Clavibacter*, αποτελούσαν σημαντικό πρόβλημα των εύκρατων περιοχών, ενώ στις τροπικές περιοχές το κυρίαρχο πρόβλημα αποτελούσε το βακτήριο *Ralstonia solanacearum* χωρίς τα βακτήρια του γένους *Erwinia* να έχουν μικρότερη σημασία.

Οι σύγχρονοι τρόποι καλλιέργειας της πατάτας, η έντονη διακίνηση του πολλαπλασιαστικού της υλικού, πολύ πιθανά και οι κλιματικές αλλαγές αλλά και η ευρεία εμπορία της βρώσιμης πατάτας, φαίνεται ότι οδηγούν σταδιακά στην αλλαγή του σκηνικού. Η πρόσφατη διαπίστωση της παρουσίας, εγκατάστασης, και δημιουργίας ουσιαστικών προβλημάτων από παθογόνα βακτήρια, όπως το *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* στην Ελλάδα (1997) ή το *Ralstonia solanacearum* στην Ολλανδία (1995), ή του *Dickeya solani* (συν. *Erwinia chrysanthemi* Saddler, 2010), σε διάφορες Βόρειες Ευρωπαϊκές χώρες επιβεβαιώνουν το γεγονός

Τα βακτήρια που άνηκαν μέχρι πρόσφατα στο γένος *Erwinia* spp. ευθύνονται συνήθως για ένα σύμπλοκο ασθενειών στην πατάτα. Στις ασθένειες που προκαλούν, εμπλέκονται ανεξάρτητα ή συχνά σε συνδυασμό, τρία διαφορετικά είδη και υποείδη βακτηρίων, τα οποία προσβάλλουν όλα τα μέρη του φυτού, αναπτύσσονται σε διαφορετικές συνθήκες, ενώ το αρχικό μόλυσμα προέρχεται συνήθως από διαφορετικές πηγές μόλυνσης και τα συμπτώματα που προκαλούν, στις περισσότερες περιπτώσεις μοιάζουν με εκείνα άλλων παθογόνων της πατάτας. Τα τρία αυτά συγγενικά είδη είναι τα βακτήρια *Pectobacterium carotovorum*, (συν. *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*), *Pectobacterium atrosepticum*, (συν. *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*), και *Pectobacterium chrysanthemi* (συν. *Erwinia chrysanthemi*).

Το *Pectobacterium carotovorum* (συν. *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*), είναι βακτήριο με παγκόσμια διάδοση και ευρύ κύκλο ξενιστών. Επιβιώνει σε διάφορα υποστρώματα όπως έδαφος, φυτικά υπολείμματα, επιφανειακά νερά, ενώ διατηρείται

και πολλαπλασιάζεται στην ριζόσφαιρα πολλών καλλιεργούμενων φυτών. Προκαλεί την ασθένεια σήψη στελέχους και κονδύλων της πατάτας.

Το *Pectobacterium atrosepticum*, (συν. *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*), προσβάλλει κυρίως την πατάτα που καλλιεργείται σε εύκρατα κλίματα, προκαλώντας την ασθένεια μελάνωση του λαιμού της πατάτας. Στο έδαφος δεν επιβιώνει για περισσότερο από ένα χρόνο, ενώ αντίθετα επιβιώνει πολύ περισσότερο σε μολυσμένους κονδύλους και φυτικά υπολείμματα.

Το *Pectobacterium chrysanthemi* (συν. *Erwinia chrysanthemi*), προσβάλλει πολλά φυτά (κυρίως ανθοκομικά), χαρακτηρίζεται από εξειδίκευση ως προς τον ξενιστή, εντούτοις τα στελέχη του βακτηρίου, που προσβάλλουν την πατάτα, ανήκουν σε περισσότερες από δύο παθοποικιλίες του βακτηρίου. Στην πατάτα προκαλεί την ασθένεια υγρή σήψη του στελέχους (Dickey 1979, Goumas 1987, Γκούμας κ.α., 2001).

1.2 Συμπτώματα και στοιχεία επιδημιολογίας ασθενειών της πατάτας που προκαλούνται από βακτήρια του γένους *Erwinia* spp.

Τα συμπτώματα εμφανίζονται σε όλα τα στάδια ανάπτυξης του φυτού αλλά και κατά την αποθήκευση των κονδύλων. Αυτά περιλαμβάνουν μαλακή ή/και υγρή σήψη των στελεχών του φυλλώματος και των κονδύλων του φυτού, νανισμό, μάρανση, μεταχρωματισμό των αγγείων, ξηράνσεις των φύλλων, των στελεχών και ολόκληρου του φυτού. Ο τύπος των συμπτωμάτων που εκδηλώνεται, εξαρτάται από τις επικρατούσες κλιματολογικές συνθήκες και κυρίως τις συνθήκες υγρασίας. Έτσι, ανεξάρτητα από το είδος του βακτηρίου που προκαλεί την ασθένεια, η μαλακή σήψη εμφανίζεται σε συνθήκες υψηλής σχετικής υγρασίας ενώ η μάρανση και η ξήρανση των φυτών σε συνθήκες ξηρασίας. Η προσβολή των κονδύλων της πατάτας από τα βακτήρια του γένους *Erwinia* spp., καταλήγει σχεδόν πάντα στην αποσύνθεση και στη σήψη του κονδύλου. Αντίθετα, τα συμπτώματα στο υπέργειο τμήμα του φυτού διαφέρουν σημαντικά ανάλογα με το παθογόνο (Γκούμας κ.α., 2001).

Το σύμπτωμα της μελάνωσης του λαιμού στα στελέχη της πατάτας, δηλαδή ο καστανός-μαύρος μεταχρωματισμός στη βάση του στελέχους του φυτού, προέρχεται από την σήψη του μητρικού κονδύλου (Εικ. 11) και διαφοροποιείται από τη σήψη του στελέχους που προκαλείται από μολύνσεις που γίνονται σε πληγές στα φυτά με μόλυσμα του παθογόνου που μεταφέρεται με το νερό ή τον αέρα σε συνθήκες υψηλής υγρασίας. Το σύμπτωμα αυτό, μπορεί να εμφανιστεί σε όλα τα στάδια της ανάπτυξης.

Η προσβολή ξεκινά πάντα από τον μολυσμένο μητρικό κόνδυλο και σε περιπτώσεις έντονης προσβολής, οι μητρικοί κόνδυλοι και τα φύτρα τους σαπίζουν πριν από το φύτεμα του πατατόσπορου. Αν η προσβολή εκδηλωθεί στα πρώτα στάδια της καλλιέργειας, τα φυτά παρουσιάζονται χλωρωτικά και καχεκτικά και ξεραίνονται γρήγορα. Αν η προσβολή εκδηλωθεί αργότερα, τα στελέχη των προσβεβλημένων φυτών, εμφανίζουν στη βάση τους τον τυπικό καστανόμαυρο μεταχρωματισμό, ο οποίος συχνά επεκτείνεται αρκετά ψηλά στα στελέχη. Το φύλλωμα των προσβεβλημένων φυτών συστρέφεται προς τα επάνω, συνήθως κιτρινίζει, μαραίνεται και σταδιακά ολόκληρο το φυτό ή κάποια στελέχη του ξεραίνονται (Εικ. 12). Η προσβολή των νέων κονδύλων, η οποία γίνεται διαμέσου των στολονίων, έχει σαν αποτέλεσμα την εμφάνιση χαρακτηριστικής σήψης με καστανόμαυρο περιθώριο που διαχωρίζει τους προσβεβλημένους ιστούς από τους υγιείς, η οποία αρχίζει από το σημείο πρόσφυσης του στολονίου και επεκτείνεται προς το εσωτερικό του κονδύλου (Γκούμας κ.α., 2001).

Στην περίπτωση της σήψης του στελέχους η μόλυνση προέρχεται συνήθως από εξωτερικό μόλυσμα και όχι, απαραίτητα από το μητρικό κόνδυλο. Το παθογόνο εισέρχεται από πληγές που δημιουργούνται στο φυτό από διάφορα αίτια (χαλάζι, άνεμος, προσβολή από έντομα ή καλλιεργητικές εργασίες) ή από τα στόματα. Τα προσβεβλημένα στελέχη και φύλλα αποκτούν καστανό ή μαύρο μεταχρωματισμό (Εικ. 10), με υδαρή ή όχι εμφάνιση ανάλογα με τις συνθήκες που επικρατούν, μαραίνονται και ξεραίνονται. Οι προσβεβλημένοι κόνδυλοι εμφανίζουν μαλακή σήψη. Οι ιστοί γίνονται πολλοί μαλακοί και υδαρείς, η δομή τους αποδιοργανώνεται και αποκτούν χρώμα φαιό–καστανό με μαύρο περιθώριο, που τους ξεχωρίζει από τους υγιείς. Αργότερα, λόγω δευτερογενών προσβολών, κυρίως από αναερόβια βακτήρια του γένους *Clostridium*, ο σηπόμενος κόνδυλος αποκτά δυσάρεστη οσμή. Η σήψη προκαλεί συχνά την καταστροφή των παρεγχυματικών ιστών του κονδύλου, αφήνοντας ανέπαφη την επιδερμίδα του.

Στην περίπτωση της υγρής σήψης (*Erwinia chrysanthemi*), η αρχική μόλυνση προέρχεται συνήθως από το μητρικό κόνδυλο. Η υδαρής καστανή–μαύρη σήψη μπορεί να εμφανιστεί σε όλο το μήκος του στελέχους ή κατά θέσεις. Οι ιστοί της εντεριώνης εμφανίζονται υδαρείς, μεταχρωματισμένοι και σηπόμενοι αφήνουν την θέση της εντεριώνης κενή (Εικ. 9). Ένα χαρακτηριστικό σύμπτωμα της παρουσίας της ασθένειας

στην καλλιέργεια είναι η πρόσκαιρη μάρανση των κορυφών των φυτών κατά τις θερμές ώρες της ημέρας που σταδιακά μετατρέπεται σε καθολική μάρανση των φυτών. Συνήθως τα προσβεβλημένα φυτά καταρρέουν γρήγορα μετατρέπόμενα σε μια άμορφη σπηδόμενη μάζα (Γκούμας κ.α. 2001).

Στη χώρα μας έχει καταγραφεί το βακτήριο *Dickeya dianthicola* (συν. *Erwinia chrysanthemi* pv. *dianthicola*), σε καλλιέργεια γαρίφαλου (Αλιβιζάτος 1979, Γκούμας 2003 προσωπική επικοινωνία), τομάτας (Alivizatos 1985) και πατάτας (Alivizatos and Glynos 2006).

1.3 Το νέο παθογόνο βακτήριο *Dickeya solani*

1.3.1 Εισαγωγικά στοιχεία

Τα τελευταία χρόνια, ένα νέο παθογόνο βακτήριο για το οποίο έχει προταθεί η δόκιμη ονομασία *Dickeya solani*, εμφανίστηκε και φαίνεται να αποτελεί μια αναδύομενη απειλή για την καλλιέργεια της πατάτας σε πολλές χώρες της Ευρώπης και στο Ισραήλ (Slawiak *et al.*, 2009a).

Το γένος *Erwinia*, δημιουργήθηκε το 1917, για να καλύψει όλα τα μέλη των Enterobacteriaceae που είναι παθογόνα των φυτών, συμπεριλαμβανομένων των πηκτινολυτικών (π.χ. *E. carotovora* και *E. chrysanthemi*) και των μη πηκτινολυτικών ειδών (*E. amylovora*). Το *Erwinia chrysanthemi* δημιουργήθηκε ως γένος από τον Burkholder *et al.* (1953) ως ένα παθογόνο του χρυσάνθεμου. Μεταγενέστερες μελέτες, κατέδειξαν ότι τα στελέχη του *E. chrysanthemi* προκαλούν ασθένειες σε μια μεγάλη ποικιλία από φυτά ξενιστές (Samson *et al.*, 2005). Εξαιτίας του μεγάλου εύρους των ξενιστών του *E. chrysanthemi* οι Lelliott & Dickey (1984), υποδιαίρεσαν το είδος σε 6 παθοποικιλίες (pathovars), με βάση το εύρος των ξενιστών δηλαδή τις pvns *chrysanthemi*, *dianthicola*, *dieffenbachia*, *paradisiaca*, *parthenii* και *zeae*. Αργότερα, οι Samson *et al.* (1987) ανέπτυξαν ένα σύστημα βιοποικιλιών (biovars), βασιζόμενο σε βιοχημικά χαρακτηριστικά. Ωστόσο, ο Waldee, ήδη από το 1945 είχε προτείνει, την μεταφορά των πηκτινολυτικών *Erwinia*, σε ένα νέο γένος (*Pectobacterium*), με βάση τα βιοχημικά χαρακτηριστικά, μια ομαδοποίηση που επιβεβαιώθηκε το 1998 με βάση και την μοριακή ανάλυση του 16S rDNA (Waldee, 1945, Hauben *et al.*, 1998).

Ενώ τα παθογόνα της πατάτας *Pectobacterium carotovorum* (συν. *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*) και *Pectobacterium atrosepticum* (συν. *Erwinia*

carotovora subsp. *atroseptica*), παρέμειναν σε αυτά τα γένη, βιοχημικές και μοριακές αναλύσεις στο *Pectobacterium chrysanthemi*, κατέδειξαν ότι αποκλίνει από τα υπόλοιπα στελέχη του είδους. Έτσι προτάθηκε, τα στελέχη που μέχρι πρότινος χαρακτηρίζονταν σαν *Pectobacterium chrysanthemi*, να μετονομαστούν σε *Dickeya* spp., μια ονομασία που δόθηκε προς τιμή του διακεκριμένου μικροβιολόγου Robert S. Dickey. Το *Dickeya* σήμερα, έχει διαχωριστεί σε 6 είδη (Πιν. 1) που αντιπροσωπεύουν μέχρι ενός σημείου την προγενέστερη ταξινόμηση σε επίπεδο παθοποικιλίας και βιοποικιλίας (Samson *et al.*, 2005). Εντούτοις, νέα στελέχη του *Dickeya* που απομονώνονται από καλλιέργειες πατάτας, δεν εμπίπτουν σε αυτά τα νέα 6 είδη και μπορεί περαιτέρω να ομαδοποιηθούν νέα είδη του *Dickeya* (Toth *et al.*, 2011).

Το νέο παθογόνο *Dickeya solani*, προκαλεί συμπτώματα παρόμοια με εκείνα της ασθένειας «μελάνωση του λαιμού της πατάτας», όπως μαύρισμα της περιοχής του στελέχους του φυτού που έρχεται σε επαφή με το έδαφος και λίγο πιο ψηλά, μάρανση φύλλων αλλά και ολόκληρου του φυτού και μαλακή σήψη των κονδύλων. Πρόκειται για αρκετά συγγενικό είδος με το βακτήριο *Dickeya dianthicola*, γνωστό μέχρι πρόσφατα ως *Erwinia chrysanthemi* pv. *dianthicola* το οποίο προκαλεί προβλήματα σε καλλιέργειες πατάτας στην Ευρώπη από το 1970 (Toth *et al.*, 2011).

Τα τελευταία χρόνια, νέα, πιο επιθετικά είδη/στελέχη του βακτηρίου έχουν εγκατασταθεί σε καλλιέργειες πατάτας σε πολλές ευρωπαϊκές χώρες όπως Γαλλία (Diallo *et al.*, 2009), Φιλανδία (Laurila *et al.*, 2008, 2010), Βέλγιο, Πολωνία, Ολλανδία, Ισπανία αλλά και στο Ισραήλ (Slawiak *et al.*, 2009a). Εντοπίστηκαν για πρώτη φορά σε καλλιέργεια πατάτας στην Αγγλία και στην Ουαλία το 2007 και στην Σκωτία το 2009 σε δύο σκωτσέζικες καλλιέργειες που όμως δεν προήλθαν από σκωτσέζικο πατατόσποτο (Saddler, 2010).

Πρόκειται για ένα πολύ πιο μολυσματικό βακτήριο από άλλα είδη του γένους *Dickeya* spp. και του *Pectobacterium atrosepticum* (συν., *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*). Το *Pectobacterium atrosepticum* θεωρείται το πιο συνηθισμένο παθογόνο της ασθένειας «μελάνωση του λαιμού της πατάτας», που εκδηλώνεται σε συνθήκες υγρασίας και σχετικά χαμηλών θερμοκρασιών (15 °C) κυρίως στις Βόρειες χώρες της Ευρώπης (van der Wolf *et al.*, 2009) και σπανιότερα στις Νότιες Μεσογειακές περιοχές. Αντίθετα, το νέο παθογόνο (*D. solani*), έχει προσαρμοστεί σε περιοχές που επικρατούν υψηλότερες θερμοκρασίες (μεγαλύτερες από 25 °C) και στις οποίες εμφανίζεται να

είναι πιο μολυσματικό, πιθανά λόγω της ικανότητάς του να κινείται ταχύτερα στα αγγεία του φυτού. Το *D. solani* αναπτύσσεται καλύτερα και είναι πιο επιθετικό συνήθως σε υψηλές θερμοκρασίες αν και μπορεί να προσβάλει και σε χαμηλότερες θερμοκρασίες (van der Wolf *et al.*, 2009).

Η μέχρι τώρα εμπειρία για το νέο αυτό παθογόνο δείχνει ότι, όταν εγκατασταθεί σε μια περιοχή, γρήγορα εκτοπίζει τα άλλα συγγενικά του είδη και είναι αυτό που επικρατεί ως το κύριο παθογόνο στις ασθένειες των οποίων η συμπτωματολογία συνδέεται με την μελάνωση του λαιμού και γενικότερα τις μαράνσεις και τις νεκρώσεις φυτών στις καλλιέργειες πατάτας (Toth *et al.*, 2011).

Πρόσφατα, στελέχη απομονώθηκαν από μολυσμένα φυτά πατάτας στην Ισπανία, γεγονός που δείχνει ότι ο πληθυσμός του *Dickeya* spp. στην Ευρώπη είναι πιο ποικιλόμορφος από ότι εθεωρείτο. Αυτό επίσης αποδείχτηκε με χαρακτηρισμό του 16S και 16S-23S rDNA από τις Φιλανδικές απομονώσεις που έδειξαν ότι τα στελέχη που απομονώθηκαν από μολυσμένες πατάτες ή/και νερά ποταμών, θα μπορούσαν να ομαδοποιηθούν σε τρεις ομάδες (clusters) δύο εκ των οποίων δεν είναι πανομοιότυπες με τις προηγούμενες απομονώσεις στελεχών (Laurila *et al.*, 2008, Czajkowski *et al.*, 2009).

Στην Ολλανδία, στελέχη που απομονώθηκαν πρόσφατα από πατάτα, χαρακτηρίστηκαν ως μέλη της βιοποικιλίας 3 και εμφάνισαν διαφορετικά βιοχημικά χαρακτηριστικά από τα προηγούμενα στελέχη του *Dickeya* που απομονώθηκαν από πατάτα και έμοιαζαν στα Ολλανδικά στελέχη που απομονώθηκαν από καλλιέργειες υάκινθου. Παρόμοια στελέχη απομονώθηκαν στο Ισραήλ από φυτά που προέρχονται από κονδύλους ολλανδικής προέλευσης.

Στελέχη του *Dickeya* spp. έχουν απομονωθεί επανειλημμένα από νερά ποταμών στη Νότια Σουηδία και σε άλλες χώρες της Ευρώπης (Laurila *et al.*, 2008) Τα στελέχη του *Dickeya* που απομονώνονται συχνά σε επιφανειακά νερά (ποτάμια) στην Ολλανδία, προκαλούν συμπτώματα σε φυτά πατάτας που είναι παρόμοια με εκείνα της μελάνωσης σε θερμά κλίματα. Τα στελέχη αυτά διαχωρίζονται σε τρεις ομάδες, στην μία εκ των οποίων ανήκει πιθανά το *Dickeya dianthicola* ενώ οι άλλες ομάδες δεν αντιστοιχούσαν σε ήδη χαρακτηρισμένα είδη του *Dickeya* (Laurila *et al.*, 2008).

Πίνακας 1. Νέα ονοματολογία, συνώνυμα και κυριότεροι ξενιστές των ειδών του γένους *Dickeya* spp. (Samson *et al.* 2005).

Νέα ονοματολογία	Συνώνυμα (συμπεριλαμβανομένων και των βιοποικιλιών)	Ξενιστές
<i>Dickeya dianthicola</i>	<i>Erwinia chrysanthemi</i> βιοποικιλίες 1,7 & 9 <i>Erwinia chrysanthemi</i> pv. <i>dianthicola</i> <i>Pectobacterium chrysanthemi</i> pv. <i>dianthicola</i>	Γαρύφαλλο, πατάτα, τομάτα, chicory, αγκινάρα, ντάλια, καλαγχόη
<i>Dickeya dadantii</i>	<i>E. chrysanthemi</i> βιοποικιλία 3 (κάποια στελέχη) <i>P. chrysanthemi</i> βιοποικιλία 3 (κάποια στελέχη)	Πελαργόνιο, ανανάς, πατάτα, γαρύφαλλο, <i>Euphorbia</i> , γλυκοπατάτα, μπανάνα, καλαμπόκι, <i>Philodendron</i> , <i>Saintpaulia</i>
<i>Dickeya zeae</i>	<i>E. chrysanthemi</i> βιοποικιλία 8 και άλλα στελέχη της βιοποικιλίας 3 <i>P. chrysanthemi</i> βιοποικιλία 8 και άλλα στελέχη της βιοποικιλίας 3	Καλαμπόκι, πατάτα, ανανάς, μπανάνα, καπνός, ρύζι, <i>Brachiaria</i> , χρυσάνθεμο
<i>Dickeya chrysanthemi</i> bv. <i>chrysanthemi</i>	<i>E. chrysanthemi</i> βιοποικιλία 5 <i>E. chrysanthemi</i> pv. <i>chrysanthemi</i> <i>P. chrysanthemi</i> pv. <i>chrysanthemi</i>	Χρυσάνθεμο, πατάτα, chicory, τομάτα, ηλίανθος
<i>Dickeya chrysanthemi</i> bv. <i>parthenii</i>	<i>E. chrysanthemi</i> βιοποικιλία 6 <i>E. chrysanthemi</i> pv. <i>parthenii</i> <i>P. chrysanthemi</i> pv. <i>parthenii</i>	<i>Parthenium</i> , αγκινάρα, <i>Philodendron</i>
<i>Dickeya paradisiaca</i>	<i>E. chrysanthemi</i> βιοποικιλία 4 <i>E. chrysanthemi</i> pv. <i>paradisiaca</i> <i>E. paradisiaca</i> <i>Brenneria paradisiaca</i>	Μπανάνα, καλαμπόκι, πατάτα
<i>Dickeya dieffenbachiae</i>	<i>E. chrysanthemi</i> βιοποικιλία 2 <i>E. chrysanthemi</i> pv. <i>dieffenbachiae</i> <i>P. chrysanthemi</i> pv. <i>dieffenbachiae</i>	<i>Dieffenbachia</i> , τομάτα, μπανάνα

1.3.2 Στοιχεία επιδημιολογίας και συμπτώματα της ασθένειας που προκαλείται από το *Dickeya solani* στην πατάτα

Το *Dickeya solani*, είναι ένα κατά Gram αρνητικό φυτοπαθογόνο βακτήριο που ανήκει στην οικογένεια Enterobacteriaceae. Η βακτηριακή αυτή οικογένεια, περιλαμβάνει πολλά παθογόνα ζώων και φυτών. Τα παθογόνα των φυτών, ανήκουν στα γένη *Brenneria*, *Dickeya*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Pantoea* και *Pectobacterium*. Στην οικογένεια αυτή ανήκουν επίσης και ανθρώπινα παθογόνα όπως το *Escherichia coli*, το *Salmonella enterica* και το *Yersinia pestis* (Toth *et al.*, 2003). Το βακτήριο αυτό, χαρακτηρίζεται από την παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων εξωκυτταρικών πηκτινολυτικών ενζύμων (Palacio-Bielsa *et al.*, 2010). Κατά την διάρκεια του χειμώνα επιβιώνει στο έδαφος (μικρότερο χρονικό διάστημα από το είδος *atrosepticum*), σε φυτικά υπολείμματα, σε άλλα φυτά ξενιστές (ζιζάνια κ.α.) και στο νερό άρδευσης. Διασπείρεται με το μολυσμένο πατατόσπορο, τα επιφανειακά νερά (ποτάμια, πηγάδια κ.α.) και τα μηχανήματα. Εισέρχεται στο φυτό από το έδαφος δια μέσου των ριζών και αποικίζει διασυστηματικά τα φυτά μέσω του αγγειακού ιστού (Toth *et al.*, 2001).

Τα συμπτώματα στο χωράφι είναι παρόμοια με εκείνα της μελάνωσης (Εικ. 15), αν και μπορεί να εμφανίζονται αργότερα κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας, σε σχέση με τις προσβολές από το *Pectobacterium atrosecticum* ενώ συνήθως εκδηλώνονται όταν η θερμοκρασία αυξηθεί. Συχνά, η μάρανση των φυτών είναι πολύ γρήγορη (Εικ. 13) και συνοδεύεται από εκτεταμένη μαύρη μαλακή σήψη και νέκρωση των εσωτερικών ιστών των στελεχών, ενώ συνήθως η περιοχή της εντεριώνης εμφανίζεται κενή/κούφια (Εικ. 16). Μπορεί να εμφανιστεί και κιτρίνισμα ακραίου του μεριστώματος σε φυτά πατάτας, καθώς και ημιπληγία (Εικ. 14).

Στους κονδύλους, αρχικά παρατηρείται καστανός μεταχρωματισμός του αγγειακού ιστού και στη συνέχεια σήψη και πλήρη αποδιοργάνωσή του (Εικ. 18). Στα όρια των σηπόμενων ιστών συχνά αναπτύσσονται καστανές μέχρι μαύρες χρωστικές, που συνήθως οριοθετούν την προσβολή. Τα παραπάνω συμπτώματα αλλά και ο έντονος καστανόμαυρος μεταχρωματισμός του αγγειακού ιστού ξεκινούν πάντα από τον μολυσμένο μητρικό κόνδυλο (Εικ.17). Η ένταση των συμπτωμάτων μπορεί να ποικίλει, ανάλογα με την ευπάθεια ή την αντοχή της ποικιλίας, τη στράγγιση του εδάφους, την παρουσία αλλά και τη συγκέντρωση του παθογόνου στον πατατόσπορο.

Για την πρόκληση μόλυνσης απαιτούνται σημαντικά μικρότερες συγκεντρώσεις του βακτηρίου σε σχέση με άλλα παθογόνα. Την εκδήλωση της ασθένειας υποβοηθούν η πρόκληση πληγών κατά τη συγκομιδή και τις άλλες εργασίες, η υπερβολική υγρασία του εδάφους λόγω υπεράρδευσης κλπ. Μερικές φορές η μάρανση μπορεί να εκδηλωθεί χωρίς την εμφάνιση της μελάνωσης στο λαιμό των στελεχών, ενώ εκτιμάται ότι ποσοστό μεγαλύτερο του 20% των φυτών μπορεί να εμφανίσει μάρανση σε περίπτωση που ο «πατατόσπορος» είναι μολυσμένος με το βακτήριο (Elphinstone and Saddler, 2010). Συχνά η εκδήλωση της ασθένειας συνδέεται με τη γενικότερη αλλαγή του κλίματος, την αύξηση της θερμοκρασίας και τις ηπιότερες, πιο ξηροθερμικές συνθήκες που επικρατούν τα τελευταία χρόνια σε πολλές χώρες της Ευρώπης. Το παθογόνο αποτελεί μια νέα απειλή τόσο για τη σποροπαραγωγική αλλά και για τη καλλιέργεια πατάτας φαγητού (van der Wolf *et al.*, 2009).

1.3.3 Απώλειες στην παραγωγή ανά την Ευρώπη εξαιτίας του βακτηρίου *Dickeya solani*

Πρόσφατες καταγραφές καταδεικνύουν τη σημασία του νέου παθογόνου βακτηρίου *Dickeya solani* στην καλλιέργεια της πατάτας. Αποτελέσματα επισκοπήσεων στους αγρούς στην Αγγλία αναφέρουν ότι το ποσοστό μάρανσης των φυτών πατάτας να κυμαίνεται από 1-30% στο διάστημα 1991-2008 (Saddler, 2010). Στο Ισραήλ για τα έτη 2005-2006, παρατηρήθηκε μάρανση σε ποσοστά που κυμάνθηκαν από 2-30% των φυτών και μέχρι 30% μαλακή σήψη στους νέους θυγατρικούς κονδύλους μετά από φύτευση μολυσμένου πολλαπλασιαστικού υλικού (Tsror *et al.*, 2009). Σε πρόσφατη αναφορά από τη Σλοβενία το ποσοστό μάρανσης κυμάνθηκε στο 30%, ενώ στη Δανία οι απώλειες εκτιμήθηκαν σε 10 τόνους ανά εκτάριο καλλιέργειας πατάτας. Στην Ελβετία οι προσβολές στους κονδύλους που προκλήθηκαν από είδη του γένους *Dickeya*, ήταν πιο σημαντικές από είδη του γένους *Pectobacterium* (Toth *et al.*, 2011).

Στην Ολλανδία καταγράφηκε υποβάθμιση του 16%, του παραγόμενου πατατόσπορου εξαιτίας του βακτηρίου *Erwinia* spp., κατά το χρονικό διάστημα 2003-2007. Κατά μέσο όρο οι ετήσιες απώλειες που καταγράφηκαν ήταν 12 εκατομμύρια €, ενώ εκτιμήθηκαν σε διπλάσιο ποσό το 2007. Διαπιστώθηκε ότι η πίεση της μόλυνσης ποικίλει ανάλογα με τη χρονιά και κυμάνθηκε στο 6% το 2004 και στο 22% το 2007. Στην Ολλανδία επίσης, δεν επιτρέπεται επίπεδο μόλυνσης στον πατατόσπορο μεγαλύτερο του 0.1%, ενώ επενδύθηκαν για τέσσερα χρόνια περισσότερα από 1.92

εκατομμύρια ευρώ για τον έλεγχο της ασθένειας. Στη Δανία οι απώλειες εκτιμήθηκαν σε 10 τόνους ανά εκτάριο το 2007 (Elphinstone and Saddler, 2008).

1.4 Αντιμετώπιση

Η αντιμετώπιση των βακτηρίων που προσβάλλουν την πατάτα, συμπεριλαμβανομένου και του *Dickeya solani*, βασίζεται στην πρόληψη εισόδου και εγκατάστασης του παθογόνου βακτηρίου στην πατατοκαλλιέργεια και στην λήψη των κατάλληλων καλλιεργητικών μέτρων από την έναρξη της καλλιέργειας μέχρι την διάθεση της παραγωγής. Αναλυτικότερα στοιχεία για την αντιμετώπιση της μελάνωσης του λαιμού στα στελέχη φυτών πατάτας και της σήψης των κονδύλων αναφέρονται από τους Γκούμας κ.α. (2001) και τους Czajkowski *et al.* (2011).

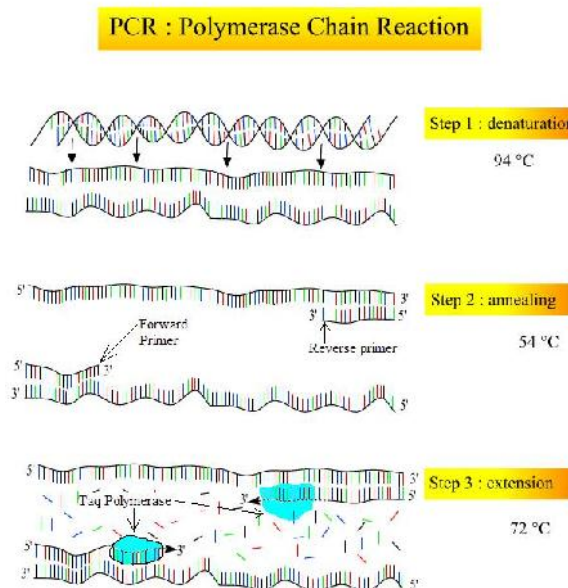
1.5 Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης

Η τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR) ανακαλύφθηκε το 1983 από τον Kary Mullis ο οποίος έλαβε το Νόμπελ Ιατρικής το 1993. Η PCR, είναι μία τεχνική που επιτρέπει τον πολλαπλασιασμό συγκεκριμένων τμημάτων δίκλωνου DNA μέσα σε λίγες ώρες. Η τεχνική αυτή έφερε επανάσταση στο χώρο της Βιολογίας, της Ιατροδικαστικής και κλινικής έρευνας, καθώς και σε άλλα πεδία όπως της Γεωπονίας για την ανίχνευση και ταυτοποίηση φυτοπαθογόνων (Ταμπακάκη και Βερβερίδης, 2003).

Η μέθοδος χρησιμοποιεί το ένζυμο DNA πολυμεράση και ειδικούς εκκινητές οι οποίοι κατασκευάζονται με βάση την αλληλουχία των άκρων του προς αντιγραφή 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 να υπάρχει μια μικρή δίκλωνη περιοχή (Εικ. 1). 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 (Λουλακάκης, 2006).

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 βήματα της αντίδρασης είναι τα εξής:

1. Αρχική αποδιάταξη του DNA: Το DNA που περιέχει το τμήμα που πρόκειται να πολλαπλασιαστεί, θερμαίνεται για να μετουσιωθεί, δηλαδή να ανοίξουν τα μόρια του δίκλωνου DNA.
2. Αποδιάταξη DNA στους 94 °C (denaturation)
3. Σύνδεση εκκινητών (annealing) στους 50-60 °C: Το μίγμα αντίδρασης κρυώνει παρουσία των εκκινητών οι οποίοι υβριδίζουν στις συμπληρωματικές τους θέσεις .
4. Επιμήκυνση (elongation) στους 72 °C: Στο βήμα αυτό πραγματοποιείται η σύνθεση του DNA με την βοήθεια της πολυμεράσης, η οποία προστίθεται στο διάλυμα μαζί με τα 4 τριφωσφορικά δεσοξυριβονουκλεοτίδια (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), έτσι ώστε να συντεθούν δύο νέες αλυσίδες DNA. Η πολυμεράση προσθέτει νουκλεοτίδια στο 3' άκρο του κάθε εκκινητή με κατεύθυνση 5' προς 3'.
5. Επανάληψη των βημάτων 2-4 για 30-40 φορές ώστε να επιτευχθεί ή αντιγραφή (ενίσχυση) του επιθυμητού τμήματος.



Εικόνα 1. Σχηματική απεικόνιση των τριών κύριων βημάτων της PCR. Αποδιάταξη (denaturation), σύνδεση (annealing), επιμήκυνση (elongation).

Στη διάρκεια της PCR επειδή οι δύο αλυσίδες του DNA αντιγράφονται, υπάρχει μια εκθετική αύξηση στον αριθμό των αντιγράφων που παράγονται. Αν τα βήματα 2-4 (αποδιάταξη, σύνδεση, επιμήκυνση) επαναληφθούν πολλές φορές (30-40), τότε το τμήμα του δίκλωνου DNA που οριοθετείται από τις αλληλουχίες των εκκινητών θα πολλαπλασιαστεί σε εκατομμύρια αντίγραφα μέσα σε λίγες ώρες. Αν υποθέσουμε ότι αρχικά υπάρχει ένα αντίγραφο του DNA-στόχου, τότε μετά από ένα κύκλο θα υπάρχουν 2 αντίγραφα, μετά από 3 κύκλους 8 κ.ο.κ. (Ταμπακάκη και Βερβερίδης, 2003).

Η PCR είναι εξαιρετικά ευαίσθητη μέθοδος και μπορεί να πολλαπλασιάσει επιλεκτικά μια αλληλουχία DNA, έστω και εάν αυτή υπάρχει σε ένα μόνο αντίγραφο (π.χ. ένα γονίδιο από ένα πολύπλοκο γονιδίωμα). Γνωρίζοντας λοιπόν την αλληλουχία των άκρων ενός τμήματος DNA αυτό μπορεί να πολλαπλασιαστεί με PCR, χωρίς την χρήση φορέων κλωνοποίησης (Λουλακάκης, 2006).

1.5.1 Εφαρμογές PCR

Παρά την πρόσφατη εισαγωγή της διαδικασίας στην μοριακή βιολογία, η PCR αποδείχτηκε επαναστατική μέθοδος επιλεκτικού πολλαπλασιασμού του γενετικού υλικού *in vitro* και χρησιμοποιείται σε πληθώρα πρακτικών εφαρμογών. Χρησιμοποιείται στην Ιατρική για την διάγνωση ασθενειών όπως το AIDS, στην εγκληματολογία για τη διαλεύκανση υποθέσεων και στην μελέτη DNA από απολιθώματα. Η μέθοδος αποτελεί σημαντικό εργαλείο στα χέρια των βελτιωτών για την ταυτοποίηση και επιλογή φυτών (Λουλακάκης, 2006).

1.6 Μέθοδοι μοριακής ταυτοποίησης βακτηρίων

Η ταυτοποίηση και ταξινόμηση των βακτηρίων είναι ζωτικής σημασίας για το περιβάλλον, την βιομηχανία, την ιατρική την γεωργική μικροβιολογία και τη φυτοπαθολογία. Ένας αριθμός διαφορετικών φαινοτυπικών/βιοχημικών και γονοτυπικών μεθόδων έχουν υιοθετηθεί πρόσφατα για την μικροβιακή ταυτοποίηση και ταξινόμηση. Κάθε μια από αυτές τις μεθόδους επιτρέπουν την φυλογενετική ταξινόμηση των γενών, των ειδών, αλλά και των ταξινομικών κατηγοριών που βρίσκονται κάτω από το είδος όπως είναι τα υποείδη, και οι βιοποικιλίες των στελεχών. Επιπλέον, κάθε μέθοδος έχει τα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματά της όσον αφορά

την ευκολία εφαρμογής, την ικανότητα αναπαραγωγής, την ανάγκη για εξοπλισμό, την αξιοπιστία, την ακρίβεια, την ταχύτητα και το επίπεδο του διαχωρισμού.

Γενικά, οι μέθοδοι που βασίζονται στο DNA εμφανίζονται ως πιο αξιόπιστες, πιο απλές και φθηνές για την ταυτοποίηση και ταξινόμηση των μικροβίων. Στην πραγματικότητα, η κατανομή των γενών/ειδών, παραδοσιακά βασίζονταν σε μεθόδους DNA-DNA υβριδισμού ενώ η μοντέρνα φυλογενετική ανάλυση βασίζεται όλο και περισσότερο σε μοριακές τεχνικές όπως οι 16S rRNA αλληλουχίες, BOX και ERIC, RFLPs, RAPDs και ανάλυση γονιδίων.

1.7 Διαγνωστικές μέθοδοι για την ταυτοποίηση του βακτηρίου *Dickeya* spp.

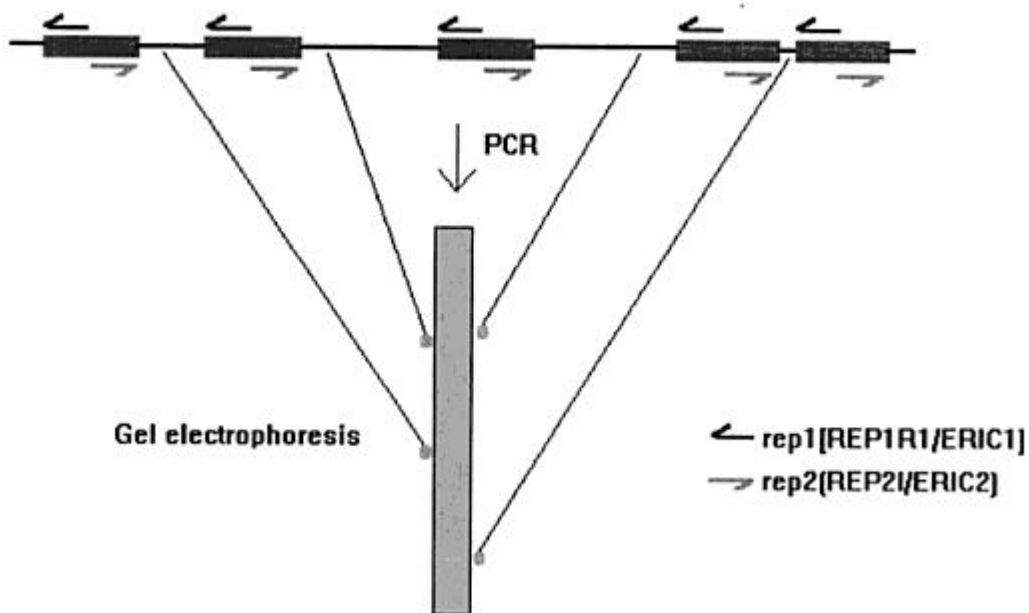
Για την ταυτοποίηση του γένους *Dickeya*, οι PCR αναλύσεις χρησιμοποιούνται όλο και περισσότερο. Οι πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες δοκιμές για την ταυτοποίηση αυτή, βασίζονται στους εκκινητές *ade1/ade2* από το γονίδιο *pectate lyase* (Nassar *et al.*, 1996).

Άλλες διαγνωστικές τεχνικές για την διαφοροποίηση του γένους *Dickeya* από το *Pectobacterium* στηρίζονται στην τεχνική της Real-Time PCR, βασισμένη στην 16S-23S rDNA αλληλουχία που αναπτύχθηκε στη Φιλανδία (Laurila *et al.*, 2010). Οι τελευταίοι ελπίζουν να συμπεριλάβουν εξειδικευμένες διαγνωστικές για το *D. dianthicola* και το *D. solani* βασιζόμενες στην αλληλούχηση διάφορων εκφραζόμενων γονιδίων, ενώ άλλες μεθοδολογίες βρίσκονται υπό έγκριση στο Ηνωμένο Βασίλειο και την Ολλανδία.

Αυτή τη στιγμή ο πιο αποτελεσματικός τρόπος για την ταυτοποίηση του *D. solani* είναι να χρησιμοποιηθεί η μέθοδος του Nassar *et al.* (1996) που χρησιμοποιήθηκε για την ταξινόμηση του γένους *Dickeya* ακολουθούμενη είτε από την αλληλουχία του *recA* γονιδίου (Parkinson *et al.*, 2009) ή του *dnaX* γονιδίου (Sławiak *et al.*, 2009b). Υπάρχουν επίσης στοιχεία που συνηγορούν ότι οι μέθοδοι rep-PCR και RFLP παρέχουν ικανοποιητική διακριτική ικανότητα για την ταυτοποίηση αυτών των παθογόνων (Tsrör *et al.*, 2009). Η παραλλακτικότητα του γένους *Dickeya*, μπορεί να προσδιοριστεί με την rep-PCR, χρησιμοποιώντας τους εκκινητές για την ενίσχυση των ERIC αλλά και των BOX περιοχών (Sławiak *et al.*, 2009b).

1.7.1 Η τεχνολογία 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 αναπτύχθηκαν αντίστοιχα οι REP-PCR, ERIC-PCR και BOX-PCR μεθοδολογίες για την ενίσχυση των τμημάτων μεταξύ των παραπάνω επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών (Εικ. 2). 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.



Εικόνα 2. Σχηματική παράσταση του τρόπου που δημιουργούνται οι ζώνες στις μεθόδους REP- και ERIC-PCR. Ουσιαστικά ενισχύονται οι περιοχές μεταξύ των περιοχών REP ή ERIC

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 ger-PCR γενωμικό αποτύπωμα. Αυτά τα αποτυπώματα, μοιάζουν σαν πρότυπα «barcodes» που χρησιμοποιούνται στο εμπόριο.

Τα ger-PCR γενωμικά αποτυπώματα που προέρχονται από απομονωμένα στελέχη βακτηρίων, επιτρέπουν την ταυτοποίηση σε επίπεδο γένους, είδους και υποείδους. Επιπλέον των μελετών αυτών οι ger-PCR έχουν καταστεί χρήσιμα εργαλεία για την ταυτοποίηση και ταξινόμηση των βακτηρίων και για επιδημιολογικές και φυλογενετικές μελέτες σε ανθρώπινα και φυτικά παθογόνα (Rademaker, 1997).

1.7.2 Οι *ade* εκκινητές ως εργαλείο για την μοριακή ταυτοποίηση των βακτηρίων *Dickeya* spp.

Πολλές μελέτες, έχουν δείξει ότι οι πηκτινάσες και ιδιαίτερα οι λυάσες της πηκτίνης (PL), εμπλέκονται στην παθογένεια του βακτηρίου *Erwinia chrysanthemi*. Επιπλέον, τα ενισχυμένα τμήματα με PCR, των *pel* γονιδίων, κάνοντας χρήση των *ade* εκκινητών, έχουν χρησιμοποιηθεί για την διαφοροποίηση υποειδών του *Erwinia carotovora* χρησιμοποιούμενα σε RFLP αναλύσεις. Γονίδια που εμπλέκονται στην παθογένεια έχουν χρησιμοποιηθεί και σε άλλες περιπτώσεις στην διαφοροποίηση φυτοπαθογόνων βακτηρίων.

Ο σχεδιασμός των *ade* εκκινητών επιτρέπει την ανίχνευση όλων των στελεχών, ακόμα και αυτών με μη ολοκληρωμένα γονίδια. Επιπλέον, επειδή τα γονίδια αυτά έχει αποδειχθεί ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στην μολυσματικότητα, οι δοκιμές PCR με αυτούς τους εκκινητές μπορούν να προσδιορίσουν όλες τις ομαδοποιήσεις των παθογόνων στελεχών του *Erwinia chrysanthemi* και άρα και των ειδών του γένους *Dickeya* (Darrasse *et al.*, 1994, Nassar *et al.*, 1996).

1.7.3 Το γονίδιο *dnaX* ως εργαλείο για την μοριακή ταυτοποίηση του βακτηρίου *Dickeya* spp.

Το γονίδιο *dnaX*, των αρνητικών κατά Gram κολοβακτηριδίων *Escherichia coli*, κωδικοποιεί την τ και γ υπομονάδα του ενζύμου DNA polymerase III, το οποίο είναι απαραίτητο για την επιμήκυνση της αλυσίδας του DNA (Chen *et al.*, 1993, Slawiak *et al.*, 2009b). Έχει βρεθεί ότι η αλληλουχία του συγκεκριμένου γονιδίου μπορεί να

χρησιμοποιηθεί για την ταυτοποίηση και την φυλογενετική ανάλυση βακτηριακών απομονώσεων.

1.7.4. Η ενίσχυση του 16s rDNA ως εργαλείο για την μοριακή ταυτοποίηση των βακτηρίων *Dickeya* spp.

Το 16s κωδικοποιεί την μεγάλη ριβοσωμική υπομονάδα του μιτοχονδρίου και είναι σχετικά συντηρημένο στην πρωτοταγή αλλά και δευτεροταγή δομή του. Γενικότερα, τα γονίδια που κωδικοποιούν τη μικρή (12S) και τη μεγάλη (16S) υπομονάδα των μιτοχονδριακών ριβοσωμάτων είναι σχετικά συντηρημένα, παρόλο που το μιτοχονδριακό DNA (mtDNA) εξελίσσεται γρηγορότερα από το πυρηνικό DNA (nDNA). Ωστόσο, το 16S έχει περισσότερες μεταβλητές περιοχές από το 12S και γι' αυτό χρησιμοποιείται πολύ συχνά σε φυλογενετικές εργασίες που αναζητούν σχέσεις σε επίπεδο γένους και κάτω. Η ενίσχυση του 16s rDNA χρησιμοποιείται και για την ταυτοποίηση βακτηριακών απομονώσεων (Slawiak *et al.*, 2009b).

1.8 Αλληλούχιση DNA (DNA sequencing)

Η αλληλούχιση του DNA είναι μια διαδικασία με την οποία διαβάζεται η σειρά των νουκλεοτιδίων κατά μήκος μιας αλυσίδας DNA. Το 1977, εικοσιτέσσερα χρόνια μετά την ανακάλυψη της δομής του DNA, αναπτύχθηκαν δύο μεθοδολογίες για την αλληλούχιση του DNA, η μέθοδος τερματισμού της αλυσίδας (chain termination method-Sanger sequencing) και η μέθοδος της χημικής αποδόμησης (Maxam-Gilbert sequencing). Και οι δύο μέθοδοι ήταν δημοφιλείς στην αρχή, αλλά μετά επικράτησε η μέθοδος τερματισμού της αλυσίδας (Ταμπακάκη και Βερβερίδης, 2003).

Η μέθοδος Sanger είναι ταχύτερη και απλούστερη από αυτή των Maxam-Gilbert και χρησιμοποιεί το ένζυμο DNA πολυμεράση που συνθέτει τη συμπληρωματική αλυσίδα ενός μονόκλωνου DNA. Στην αντίδραση, εκτός των δεοξυνουκλεοτιδίων (τα κανονικά συστατικά του DNA), προστίθενται και διδεοξυ-νουκλεοτίδια. Όταν ένα διδεοξυνουκλεοτίδιο ενσωματωθεί στην νέα αλυσίδα που συνθέτει η πολυμεράση, τότε σταματά η σύνθεση του DNA. Κατά την εκτέλεση της μεθόδου οι αλυσίδες του προς ανάλυση δίκλωνου DNA διαχωρίζονται και δημιουργούνται οι απαραίτητες συνθήκες για να αρχίσει η σύνθεση της νέας αλυσίδας (μεταξύ των άλλων προστίθεται ένας εκκινητής της αντίδρασης).

Στη συνέχεια η αντίδραση χωρίζεται σε τέσσερα ίσα μέρη, σε καθένα από τα οποία προστίθεται ένα από τα τέσσερα διδεοξυνουκλεοτίδια (ddATP, ddGTP, ddCTP ή ddTTP). Έτσι επιμηκύνεται και τερματίζεται η σύνθεση της νέας αλυσίδας. Με τον τρόπο αυτό παράγεται σε κάθε σωλήνα ένας πληθυσμός νέων αλυσίδων διαφορετικού μεγέθους με κοινό χαρακτηριστικό ότι στην άκρη τους περιέχουν το ίδιο διδεοξυνουκλεοτίδιο. Τα μόρια DNA κάθε μίας από τις τέσσερις αντιδράσεις, διαχωρίζονται με ηλεκτροφόρηση πολυακρυλαμίδης και ανιχνεύονται με αυτοραδιογραφία (Λουλακάκης, 2006).

1.10 Σκοπός της μελέτης

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η μοριακή ταυτοποίηση βακτηριακών στελεχών που απομονώθηκαν στο εργαστήριο Βακτηριολογίας του Τ.Ε.Ι. Κρήτης από ασθενή φυτά πατάτας το διάστημα 2009-2011 από διάφορες περιοχές καλλιέργειας στο Νομό Ηρακλείου, εφαρμόζοντας διάφορες τεχνικές μοριακού αποτυπώματος (PCR).

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Εξαγωγή βακτηριακών στελεχών από την συλλογή

Τα βακτήρια που χρησιμοποιήθηκαν κατά την διάρκεια της παρούσας εργασίας, προήλθαν από την συλλογή του Εργαστηρίου Βακτηριολογίας του ΤΕΙ Κρήτης (TEIC, Ds), από το Μπενάκειο Φυτοπαθολογικό Ινστιτούτο (BPIC) καθώς και από το Plant Research International (PRI). Τα στελέχη ανήκουν στα είδη *Dickeya solani*, *Pectobacterium carotovorum*, *Pectobacterium atrosepticum*, *Erwinia chrysanthemi* pv. *dianthicola* και *Erwinia* spp. Τέλος, χρησιμοποιήθηκαν και επαναπομονώσεις των προαναφερθέντων στελεχών. Ως στέλεχος αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το IPO2222. Αναλυτικά στοιχεία τους αναφέρονται στον πίνακα 2. Τα στελέχη που επιλέχθηκαν, διατηρήθηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα gelose profonde καθ' όλη την διάρκεια της εργασίας. Επιπλέον, τα βακτηριακά στελέχη του παθογόνου διατηρούνται σε διάλυμα γλυκερίνης 30% στους -80 °C.

2.2 Δοκιμές παθογένειας

2.2.1 Αντίδραση υπερευαισθησίας

Όλα τα στελέχη εξετάστηκαν αρχικά ως προς την ικανότητα πρόκλησης αντίδρασης υπερευαισθησίας (Hypersensitive reaction, HR) σε φύλλα φυτών καπνού ποικιλίας *Xanthi* με την μέθοδο της έγχυσης βακτηριακού αιωρήματος (10^8 cfu/ml) με σύριγγα. Τα φυτά μετά την έγχυση, καλύφθηκαν με σακούλες πολυαιθυλενίου για την διατήρηση της σχετικής υγρασίας σε επίπεδο κορεσμού και τοποθετήθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου (20-25 °C). Η πρόκληση αντίδρασης υπερευαισθησίας, εξετάστηκε σε διάστημα 24-48 h.

Πίνακας 2. Βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν κατά την διάρκεια της παρούσας εργασίας.

Βακτηριακά στελέχη	Παθογόνο	Ξενιστής	Προέλευση	Έτος απομόνωσης	Παθογένεια*
IPO2222	<i>Dickeya solani</i>	Πατάτα	Ολλανδία	2011	+
TEIC624	<i>Erwinia</i> spp.	Πιπεριά αγγεία	N. Λασιθίου-Ιεράπετρα	1997	+
TEIC3377	<i>Erwinia</i> spp.	Τομάτα	N. Μεσσηνίας-Κυπαρισσία	2008	+
Ds3378	<i>Dickeya solani</i>	Πατάτα	N. Ηρακλείου-Ασήμι	2010	+
Ds3383	<i>Dickeya solani</i>	Πατάτα	N. Ηρακλείου-Ασήμι	2010	+
Ds3386	<i>Dickeya solani</i>	Πατάτα	N. Ηρακλείου-Καστελλιανά	2010	+
Ds3400	<i>Dickeya solani</i>	Πατάτα	N. Ηρακλείου-Καστελλιανά	2010	+
TEIC3036	<i>Pectobacterium carotovorum</i>	Μπανάνα ρίζωμα	N. Ηρακλείου-Αρβη	1987	+
TEIC3733	<i>Pectobacterium carotovorum</i>	Κουνουπίδι	N. Ηρακλείου	2007	+
TEIC3211	<i>Pectobacterium atrosepticum</i>	Πατάτα	N. Ηρακλείου	1995	+
TEIC3737	<i>Erwinia</i> spp.	Ζάμια	N. Ηρακλείου	2011	+
Ds3402	Επαναπομόνωση (3388)	Καλαμπόκι	-	2011	+
Ds3403	Επαναπομόνωση (3378)	Γαρύφαλλο	-	2011	+
Ds3405	Επαναπομόνωση (3383)	Ποινσέτια	-	2011	+
BPIC2098	<i>Erwinia chrysanthemi</i> pv. <i>dianthicola</i>	Πατάτα	N. Δράμας	1994	+
TEIC3738	<i>Erwinia</i> spp.	Υάκινθος	N. Ηρακλείου	2011	+

*Η παθογένεια των στελεχών εξετάστηκε με την πραγματοποίηση τεχνητών μολύνσεων σε κονδύλους πατάτας (ροδέλες, ολόκληρους κονδύλους, πατατόσπορο προς φύτευση) και φυτά τομάτας

2.2.3 Τεχνητές μολύνσεις

Η παθογένεια όλων των στελεχών εξετάστηκε με την πραγματοποίηση τεχνητών μολύνσεων σε κονδύλους πατάτας, ποικιλίας Spunta (ροδέλες, ολόκληρους κονδύλους, πατατόσπορο προς φύτευση) και φυτά τομάτας.

Αρχικά πραγματοποιήθηκαν μολύνσεις σε ροδέλες κονδύλων πατάτας. Η μόλυνση πραγματοποιήθηκε αφού οι κόνδυλοι πλύθηκαν με σαπούνι και απολυμάνθηκαν εξωτερικά με οινόπνευμα. Στη συνέχεια, αφού αφαιρέθηκε ο φλοιός ασηπτικά, οι κόνδυλοι τεμαχίστηκαν σε ροδέλες και τοποθετήθηκαν σε τριβλία Petri, στα οποία είχε τοποθετηθεί απορροφητικό χαρτί εμποτισμένο με απιονισμένο και αποστειρωμένο νερό. Με τη βοήθεια αποστειρωμένης οδοντογλυφίδας, τοποθετήθηκε μικρή ποσότητα καλλιέργειας του κάθε βακτηρίου στην αντίστοιχη ροδέλα, προκαλώντας ταυτόχρονα μικρές πληγές στην επιφάνεια της. Αφού προστέθηκε αποστειρωμένο νερό, τα τριβλία μπήκαν σε πλαστικές σακούλες και ακολούθησε επώαση στους 30 °C και 35 °C. Η εκδήλωση και το επίπεδο της μόλυνσης, εκτιμήθηκε σε διάστημα 48 h.

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκαν μολύνσεις σε ολόκληρους κονδύλους πατάτας. Οι μολύνσεις αυτές, πραγματοποιήθηκαν σε πλυμένους με σαπούνι και απολυμασμένους εξωτερικά με οινόπνευμα κονδύλους. Με τη βοήθεια αποστειρωμένης οδοντογλυφίδας τοποθετήθηκε ποσότητα βακτηρίου από τα διάφορα στελέχη του παθογόνου στην περιοχή του στολονίου ενώ η οδοντογλυφίδα παρέμεινε στη θέση μόλυνσης. Οι κόνδυλοι διατηρήθηκαν σε συνθήκες εργαστηρίου και η προσβολή εκτιμήθηκε σε διάστημα τριών ημερών.

Επιπλέον, μολύνσεις πραγματοποιήθηκαν και σε πατατόσπορο προς φύτευση. Για την μόλυνση του αυτή, σχηματίστηκαν αιωρήματα, συγκέντρωσης 10^6 c.f.u./ml σε απιονισμένο και αποστειρωμένο νερό. Με τη χρήση σύριγγας εμβολιάστηκαν 15 μl εναιωρήματος από κάθε βακτήριο στη περιοχή του φύτρου προβλαστημένου κόνδυλου. Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε η επέμβαση με νερό. Οι πατατόσποροι στη συνέχεια φυτεύτηκαν σε γλάστρες με κατάλληλο εδαφικό υπόστρωμα και τοποθετήθηκαν στο θερμοκήπιο (15-30 °C). Οι παρατηρήσεις λήφθηκαν σε διάστημα 30 ημερών.

Τέλος, πραγματοποιήθηκαν μολύνσεις και σε φυτά τομάτας με την βοήθεια αποστειρωμένης οδοντογλυφίδας. Μικροποσότητα της καλλιέργειας των αντίστοιχων στελεχών εισήχθη στο στέλεχος των φυτών και η θέση της μόλυνσης καλύφθηκε με

parafilm. Τα φυτά τοποθετήθηκαν σε θάλαμο ανάπτυξης με κατάλληλες συνθήκες υγρασίας (85% RH) και θερμοκρασίας (26°C) για την εκδήλωση της μόλυνσης, η οποία εκτιμήθηκε σε διάστημα μίας εβδομάδας.

2.3 Μοριακή ταυτοποίηση απομονώσεων του βακτηρίου *Dickeya* spp.

2.3.1 Δημιουργία υγρής καλλιέργειας για απομόνωση ολικού DNA από τα βακτηριακά στελέχη

Τα βακτηριακά στελέχη που επιλέχθηκαν για την μοριακή ταυτοποίηση, εμβολιάστηκαν αρχικά με την βοήθεια αποστειρωμένης οδοντογλυφίδας σε δοκιμαστικούς σωλήνες που περιείχαν 4 ml υγρού θρεπτικού υποστρώματος καλλιέργειας Lysogeny Broth (LB 1% Bacto-tryptone, 0,5% Bacto-yeast extract, 1% NaCl, pH 7,0). Οι υγρές καλλιέργειες, μεταφέρθηκαν σε θάλαμο επώασης με ανάδευση και επώαστηκαν για 48 h στους 26 °C. Μετά την επώαση, τοποθετήθηκαν στο ψυγείο μέχρι να γίνει η απομόνωση του DNA.

2.3.2 Απομόνωση ολικού DNA από βακτηριακά κύτταρα

Η μεθοδολογία και τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση ολικού DNA από βακτηριακά κύτταρα, αναφέρονται στο εγχειρίδιο χρήσης της εταιρείας Qiagen, DNeasy[®] Blood & Tissue Kit (2006).

Αρχικά, από τα 4 ml της υγρής καλλιέργειας, πάρθηκαν 2 ml και τοποθετήθηκαν σε αποστειρωμένα δοχεία τύπου erpendorf αντίστοιχης χωρητικότητας. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 7.500 στροφές/λεπτό για 10 λεπτά. Μετά την φυγοκέντρηση, απορρίφθηκε το υπερκείμενο και προστέθηκαν 180 µl ρυθμιστικού διαλύματος ATL, καθώς και 20 µl πρωτεϊνάση K. Αφού έγινε ανάδευση σε αυτόματο αναδευτήρα (vortex), τα δείγματα επώαστηκαν σε υδατόλουτρο στους 56 °C για δύο περίπου ώρες, μέχρι να ολοκληρωθεί η λύση των βακτηριακών κυττάρων. Κατά την διάρκεια της επώασης, γινόταν ανάδευση των δειγμάτων κάθε 15 περίπου λεπτά, για να βοηθηθεί η λύση τους.

Μετά το τέλος της επώασης, τα δείγματα αναδευτήκαν για 15 δευτερόλεπτα περίπου και προστέθηκαν 200 µl ρυθμιστικού διαλύματος AL και αναδευτήκαν ξανά. Μετά την προσθήκη 200 µl αιθανόλης (καθαρότητας 99%) και αφού ακολούθησε εκ νέου ανάδευση, το περιεχόμενο των δοχείων τοποθετήθηκε στα κολωνάκια (DNeasy

Mini spin column), τα οποία τοποθετήθηκαν μέσα σε δοχεία συλλογής και φυγοκεντρήθηκαν στις 8.000 στροφές/λεπτό για ένα λεπτό. Στη συνέχεια, τα δοχεία αφαιρέθηκαν μαζί με το υπερκείμενο και τα κολωνάκια τοποθετήθηκαν σε νέα δοχεία συλλογής των 2 ml. Αφού προστέθηκαν 500 µl ρυθμιστικού διαλύματος AW1 φυγοκεντρήθηκαν για ένα λεπτό στις 8.000 στροφές/λεπτό.

Μετά την φυγοκέντρωση, τα δοχεία συλλογής αφαιρέθηκαν και τα κολωνάκια τοποθετήθηκαν σε νέα δοχεία συλλογής των 2 ml. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 500 µl ρυθμιστικού διαλύματος AW2 και έγινε φυγοκέντρωση για 3 λεπτά στις 14.000 στροφές/λεπτό, έτσι ώστε τα κολωνάκια να στεγνώσουν καλά καθώς η αιθανόλη που περιέχονταν στο ρυθμιστικό διάλυμα θα μπορούσε να επηρεάσει τις μετέπειτα βιοχημικές αντιδράσεις. Για τον λόγο αυτό ακολούθησε εκ νέου φυγοκέντρωση για 3 λεπτά στις 14.000 στροφές/λεπτό. Στη συνέχεια τα κολωνάκια τοποθετήθηκαν σε νέα δοχεία των 2 ml και προστέθηκαν 200 µl ρυθμιστικού διαλύματος AE. Αφού επώαστηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για περίπου ένα λεπτό, φυγοκεντρήθηκαν στις 8.000 στροφές/λεπτό για ένα λεπτό.

2.3.3 Ηλεκτροφόρηση απομονομένου DNA σε πήκτωμα αγαρόζης

Η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης αποτελεί την βασική μέθοδο που χρησιμοποιείται για την ανάλυση μορίων DNA μεγαλύτερων από 100 ζευγάρια βάσεων (bp). Το DNA σε αλκαλικά ρυθμιστικά διαλύματα είναι ένα μόριο αρνητικά φορτισμένο, λόγω των φωσφορικών ομάδων που βρίσκονται στον φωσφοδιεστερικό σκελετό. Επειδή οι φωσφορικές ομάδες κατανέμονται ομοιόμορφα πάνω στο μόριο, το DNA έχει ομοιόμορφη αναλογία φορτίου προς μάζα και επομένως η κίνησή του δεν επηρεάζεται από το φορτίο. Έτσι όταν το DNA βρεθεί μέσα σε ηλεκτρικό πεδίο κινείται προς τον θετικό πόλο με ταχύτητα που εξαρτάται από το μέγεθος και το σχήμα του.

Άλλοι παράγοντες που καθορίζουν τον διαχωρισμό των μορίων είναι η συγκέντρωση της αγαρόζης, η συγκέντρωση των μορίων του DNA και η τάση του ηλεκτρικού φορτίου που εφαρμόζεται. Η αγαρόζη είναι πολυσακχαρίτης που σε κατάλληλες συνθήκες δημιουργεί ένα πορώδες πήκτωμα. Η συγκέντρωσή της καθορίζει το μέγεθος των πόρων άρα και το μέγεθος των μορίων DNA που μπορούν να διαχωριστούν. Το ηλεκτρικό πεδίο δημιουργείται με κατάλληλο τροφοδοτικό το οποίο παρέχει σταθερή τάση.

Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης γίνεται ανίχνευση των μορίων DNA πάνω στο πήκτωμα αγαρόζης με ειδικές χρωστικές, όπως η φθορίζουσα ουσία βρωμιούχο αιθίδιο το οποίο παρεμβάλλεται στην διπλή έλικα των μορίων του DNA και έτσι είναι δυνατή η παρατήρησή του κάτω από υπεριώδες φως (μπορούν να ανιχνευτούν μέχρι 25 ng ανά ζώνη DNA), (Λουλακάκης 2002).

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 TBE (Tris borate EDTA), διαλύθηκαν 0,4 g αγαρόζης με θέρμανση σε φούρνο μικροκυμάτων και στην συνέχεια προστέθηκαν 2 ml χρωστικής βρωμιούχο αιθίδιο. 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 ml από το απομονωμένο DNA των στελεχών καθώς και 2 ml χρωστικής.

Στη συνέχεια ακολούθησε η ηλεκτροφόρηση για 45 λεπτά σε 55 V. Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε ο λ/EcoRI-Hind III. Μετά την ολοκλήρωση της ηλεκτοφόρησης, το gel τοποθετήθηκε στην συσκευή υπεριώδους ακτινοβολίας για παρατήρηση. Τα απομονωμένα δείγματα DNA των στελεχών αποθηκεύτηκαν στους -20 °C μέχρι να γίνει η ποσοτικοποίηση τους μέσω φωτομέτρησης και η μοριακή ταυτοποίηση τους.

2.4 Προετοιμασία δειγμάτων

Για την πραγματοποίηση των αντιδράσεων PCR, έπρεπε να υπολογιστούν οι συγκεντρώσεις του DNA που είχε απομονωθεί από τα βακτηριακά στελέχη. Η μέτρηση αυτή πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Φυτών του Πανεπιστημίου Κρήτης με την βοήθεια νανοφωτόμετρου (Nanodrop, ThermoScientific). Στην ειδική ακίδα του μηχανήματος, 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 καθαριζόταν ελαφρά με απορροφητικό χαρτί και ακολουθούσε 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.

2.5 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR)

Για την μοριακή ταυτοποίηση των στελεχών του παθογόνου εφαρμόστηκαν οι παρακάτω τεχνικές PCR μοριακού αποτυπώματος (PCR fingerprinting techniques): BOX και ERIC-PCR, *ade*-PCR, *dnaX*-PCR, 16S rDNA-PCR. Ως στέλεχος αναφοράς, για όλες τις αντιδράσεις, χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος IPO2222 το οποίο είχε ταυτοποιηθεί ως *Dickeya solani* σύμφωνα με τους Sławiak *et al.* (2009b). Επίσης χρησιμοποιήθηκε και το ελληνικό στέλεχος *Erwinia chrysanthemi* pv. *dianthicola* (BPIC 2098).

2.5.1 Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για τις αντιδράσεις PCR

Για την διεξαγωγή των αντιδράσεων PCR, χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές της εταιρίας VBC-biotech. Για τις rep-PCR (BOX και ERIC-PCR), χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές BOXA1R και ERIC1R/ERIC2 αντίστοιχα (Toth *et al.*, 2011). Για την ενίσχυση του γονιδίου pectate lyase (*pel*), χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές *ade1/ade2* με μέγεθος ενισχυόμενου τμήματος τα 420 bp (Nassar *et al.*, 1996). Οι εκκινητές για την ενίσχυση του *dnaX* ήταν οι *dnaXf/dnaXr*, με μέγεθος ενισχυόμενου τμήματος τα 535 bp (Sławiak *et al.*, 2009b), ενώ για το 16s rDNA χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές F985PTO/R1378 (Sławiak *et al.*, 2009b). Στον πίνακα 3 αναφέρονται αναλυτικά οι αλληλουχίες των εκκινητών.

Πίνακας 3. Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για τις αντιδράσεις PCR

Εκκινητές	Φορά	Αλληλουχία εκκινητών 5'→3'	Μέγεθος ενισχυόμενου τμήματος
BOXA1R		CTACGGCAAGGCGACGCTGACG	
ERIC1R	Fw	ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC	
ERIC2	Rv	AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG	
<i>ade1</i>	Fw	GATCAGAAAGCCCGCAGCCAGAT	420 bp
<i>ade2</i>	Rv	CTGTGGCCGATCAGGATGGTTTTGTCGTGC	
<i>dnaXf</i>	Fw	TATCAGGTYCTTGCCCGTAAGTGG	535 bp
<i>dnaXr</i>	Rv	TCGACATCCARCGCYTTGAGATG	
F985PTO	Fw	AACGCGAAGAACCTTAC	968-1401 bp
R1378	Rv	CGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACG	

2.6 Αντιδράσεις PCR

Για όλες τις αντιδράσεις PCR χρησιμοποιήθηκε ο θερμικός κυκλοποιητής Mastercycler Gradient της εταιρίας Eppendorf (Εικ. 3). Πραγματοποιήθηκαν οι παρακάτω αντιδράσεις PCR.



Εικόνα 3. Θερμικός κυκλοποιητής Mastercycler Gradient της εταιρίας Eppendorf

2.6.1 *rep-PCR*

Αρχικά πραγματοποιήθηκαν οι *rep-PCR*s με τον εκκινητή BOXA1R για την BOX-PCR και τους εκκινητές ERIC1R/ERIC2 για την ERIC-PCR. Η παραπάνω τεχνική εφαρμόστηκε σε όλα τα διαθέσιμα βακτηριακά στελέχη, τα οποία αναφέρονται αναλυτικά (Πιν. 2). Οι συνθήκες ήταν ίδιες και για τις δύο αντιδράσεις και ρυθμίστηκαν με το εξής πρόγραμμα: 7 λεπτά στους 95 °C, 30 κύκλοι με 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. Στους πίνακες 4 και 5 αναφέρονται αναλυτικά τα αντιδραστήρια και οι ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν για τις αντιδράσεις.

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

Αντιδραστήριο	Ποσότητα ανά αντίδραση	Τελική συγκέντρωση
DNA tamplate	2 µl	100 ngr
Kapa Buffer	2 µl	
BOXA1R (50 pMol)	0,5 µl	1,25 pMol
H ₂ O (50 pMol)	0,5 µl	1,25 pMol
dNTPs (από 10 mM)	0.5 µl	0,25 mM
MgCl ₂ (από 25 mM)	0,8 µl	2.5 mM
Taq DNA Polymerase 5units/µl	0,3 µl	1.5 units
ddH ₂ O	13,4 µl	
Τελικός όγκος	20 µl	

Πίνακας 5. Σύσταση αντιδραστηρίων ERIC-PCR σε γενωμικό DNA βακτηριακών στελεχών

Αντιδραστήριο	Ποσότητα ανά αντίδραση	Τελική συγκέντρωση
DNA tamplate	2 µl	100 ngr
Kapa Buffer	2 µl	
ERIC1R (50 pMol)	0,25 µl	0,6 pMol
ERIC2 (50 pMol)	0,25 µl	0,6 pMol
dNTPs (από 10 mM)	0.5 µl	1,25 mM
MgCl ₂ (από 25 mM)	0,8 µl	2.5 mM
Taq DNA Polymerase 5units/µl	0,35 µl	1,75 units
ddH ₂ O	13,85 µl	
Τελικός όγκος	20 µl	

2.6.2 Ade-PCR

Πραγματοποιήθηκε PCR για την ενίσχυση του γονιδίου *pectate lyase (pel)*, με τους εκκινητές *ade1/ade2*. Η παραπάνω τεχνική εφαρμόστηκε σε όλα τα διαθέσιμα βακτηριακά στελέχη (Πιν. 2). Οι συνθήκες της αντίδρασης ρυθμίστηκαν με τις εξής συνθήκες: 3 λεπτά στους 94 °C, 35 κύκλοι με 1 λεπτό στους 94 °C, 1 λεπτό στους 62°C, 1 λεπτό στους 72 °C. Με το πέρας των 35 κύκλων, ακολούθησαν 5 λεπτά στους 72 °C. Στον πίνακα 6 αναφέρονται αναλυτικά τα αντιδραστήρια και οι ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν για την αντίδραση.

Πίνακας 6. Σύσταση αντιδραστηρίων *ade*-PCR σε γενωμικό DNA βακτηριακών στελεχών

Αντιδραστήριο	Ποσότητα ανά αντίδραση	Τελική συγκέντρωση
DNA tamplate	2 µl	100 ngr
Kapa Buffer	2 µl	
<i>ade1</i> (50 pMol)	0,25 µl	0,6 pMol
<i>ade2</i> (50 pMol)	0,25 µl	0,6 pMol
dNTPs (από 10 mM)	0.5 µl	1,25 mM
MgCl ₂ (από 25 mM)	0,8 µl	2.5 mM
Taq DNA Polymerase (5units/µl)	0,35 µl	1,75 units
ddH ₂ O	13,85 µl	
Τελικός όγκος	20 µl	

2.6.3 *dnaX* PCR

Πραγματοποιήθηκε PCR για την ενίσχυση του γονιδίου *dnaX*, με τους εκκινητές *dnaXf/dnaXr* και τα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν για την συγκεκριμένη αντίδραση ήταν τα IPO2222, TEIC624, Ds3378, Ds3386, Ds4300, Ds3403, TEIC3733, TEIC3211, BPIC2098 και TEIC3738. Οι συνθήκες της αντίδρασης ρυθμίστηκαν με το εξής πρόγραμμα: 5 λεπτά στους 94 °C, 30 κύκλοι με 1 λεπτό στους 94 °C, 1 λεπτό στους 59 °C, 1 λεπτό στους 72 °C. Με το πέρας των 30 κύκλων, ακολούθησαν 5 λεπτά στους 72 °C. Στον πίνακα 7 αναφέρονται αναλυτικά τα αντιδραστήρια και οι ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν για την αντίδραση.

Πίνακας 7. Σύσταση αντιδραστηρίων *dnaX*-PCR σε γενωμικό DNA βακτηριακών στελεχών

Αντιδραστήριο	Ποσότητα ανά αντίδραση	Τελική συγκέντρωση
DNA tamplate	2 µl	100 ngr
Kapa Buffer	2 µl	
<i>dnaXf</i> (50 pMol)	0,25 µl	0,6 pMol
<i>dnaXr</i> (50 pMol)	0,25 µl	0,6 pMol
dNTPs (από 10 mM)	0.5 µl	0,25 mM
MgCl ₂ (από 25 mM)	0,8 µl	2.5 mM
Taq DNA Polymerase (5units/µl)	0,35 µl	1,75 units
ddH ₂ O	13,85 µl	
Τελικός όγκος	20 µl/reaction	

2.6.4 16S rDNA-PCR

Τέλος, πραγματοποιήθηκε 16S rDNA-PCR με τους εκκινητές F985PTO και R1378 και τα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν για την συγκεκριμένη αντίδραση ήταν τα IPO2222, Ds3378, Ds3383, Ds3386 και BPIC2098. Οι συνθήκες της αντίδρασης ήταν: 5 λεπτά στους 94 °C, 30 κύκλοι με 1 λεπτό στους 94 °C, 1 λεπτό στους 55°C, 2 λεπτά στους 72 °C. Με το πέρας των 30 κύκλων, ακολούθησαν 5 λεπτά στους 72 °C. Στον πίνακα 8 αναφέρονται αναλυτικά τα αντιδραστήρια και οι ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν για την αντίδραση.

Πίνακας 8. Σύσταση αντιδραστηρίων 16S-rDNA-PCR σε γενωμικό DNA βακτηριακών στελεχών

Αντιδραστήριο	Ποσότητα ανά αντίδραση	Τελική συγκέντρωση
DNA tamplate	2 µl	100 ngr
Kapa Buffer	2 µl	
F985PTO (50 pMol)	0,25 µl	0,6 pMol
R1378 (50 pMol)	0,25 µl	0,6 pMol
dNTPs (από 10 mM)	0.5 µl	0,25 mM
MgCl ₂ (από 25 mM)	0,8 µl	2.5 mM
Taq DNA Polymerase (5units/µl)	0,35 µl	1,75 units
ddH ₂ O	13,85 µl	
Τελικός όγκος	20 µl/reaction	

2.6.5 Επιβεβαίωση των προϊόντων της PCR με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

Για την ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε πήκτωμα αγαρόζης, συγκέντρωσης 1,3% w/v. Σε 100 ml ρυθμιστικού διαλύματος TBE (TrisCl boric acid EDTA), διαλύθηκαν 1,3 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 τάση 100 V. Η ποσότητα των δειγμάτων που φορτώθηκε ήταν 5 µl και ως

μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε DNA του φάγου λ (λάμδα) κομμένο με το περιοριστικό ένζυμο *Pst*I. Μετά την ολοκλήρωση της ηλεκτροφόρησης, το gel τοποθετήθηκε στην συσκευή υπεριώδους ακτινοβολίας για παρατήρηση.

2.7 Απομόνωση επιθυμητού τμήματος DNA από πήκτωμα αγαρόζης

Η μεθοδολογία και τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση επιθυμητού τμήματος DNA από πήκτωμα αγαρόζης, αναφέρονται αναλυτικά στο εγχειρίδιο χρήσης της εταιρίας Macherey-Nagel, NucleoSpin® Extract II (2009).

Το πήκτωμα αγαρόζης που περιείχε τις επιθυμητές ζώνες του DNA, τοποθετήθηκε πάνω σε λάμπες υπεριώδους φωτός και με νυστέρι αφαιρέθηκαν τα τμήματα που έφεραν τις επιθυμητές ζώνες. Τα κομμάτια του gel τοποθετήθηκαν σε σωλήνες τύπου erpendorf και αφού ζυγίστηκαν, προστέθηκαν 200 μl ρυθμιστικού διαλύματος NT ανά 100 mg gel.

Ακολούθησε επώαση των δειγμάτων στο υδατόλουτρο για 10 λεπτά στους 50 °C, έτσι ώστε το κομμάτι της αγαρόζης να διαλυθεί τελείως. Μετά το τέλος της επώασης, τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε κολωνάκια τα οποία με τη σειρά τους τοποθετήθηκαν μέσα σε δοχεία συλλογής των 2 ml και φυγοκεντρήθηκαν για ένα λεπτό στις 11.000 στροφές/λεπτό

Στη συνέχεια, τα δοχεία συλλογής, αφαιρέθηκαν και τα κολωνάκια τοποθετήθηκαν σε νέα δοχεία συλλογής των 2 ml. Προστέθηκαν 700 μl ρυθμιστικού διαλύματος NT3 και αφού φυγοκεντρήθηκαν, για ένα λεπτό στις 11.000 στροφές/λεπτό, απορρίφθηκε το υπερκείμενο και ακολούθησε εκ νέου φυγοκέντρηση στις 11.000 στροφές/λεπτό για δύο λεπτά. Τα κολωνάκια τοποθετήθηκαν προσεκτικά σε αποστειρωμένα δοχεία τύπου erpendorf των 2 ml και προστέθηκαν 200 μl απιονισμένου και αποστειρωμένου νερού και επώαστηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για περίπου ένα λεπτό ώστε να αυξηθεί η ποσότητα του εκλούμενου DNA. Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν, για ένα λεπτό στις 11.000 στροφές/λεπτό και αποθηκεύτηκαν στους -20 °C μέχρι να γίνει η αλληλούχισή τους.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Δοκιμές παθογένειας

3.1.1 Αντίδραση υπερευαισθησίας

Όλα τα απομονωθέντα στελέχη, εξετάστηκαν ως προς την ικανότητα πρόκλησης αντίδρασης υπερευαισθησίας (HR) σε φύλλα φυτών καπνού ποικιλίας *Xanthi*. Αρχικά, όλα τα βακτηριακά στελέχη, έδωσαν την τυπική αντίδραση υπερευαισθησίας σε διάστημα 24 h, ενώ σε διάστημα 48 h, το φύλλο του καπνού μολύνθηκε όπως στη συνέχεια και το ίδιο το φυτό.

3.1.2 Αποτελέσματα τεχνητών μολύνσεων

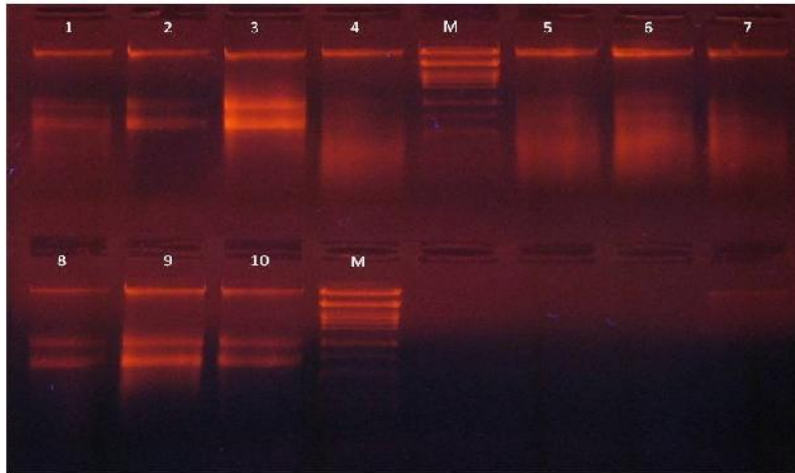
Στις ροδέλες (Εικ. 19 & 20) και στους ολόκληρους κονδύλους (Εικ. 21 & 22) πατάτας, η τυπική μαλακή σήψη αναπτύχθηκε σε διάστημα 24-48 h από τον εμβολιασμό. Η σήψη ήταν γρήγορη, εκτεταμένη και συνήθως οριοθετήθηκε από καστανό περιθώριο.

Στην περίπτωση των τεχνητά μολυσμένων με βακτηριακό αιώρημα, πατατόσπορων προς φύτευση (Εικ. 23), παρατηρήθηκε είτε προφυτρωτική (Εικ. 27) σήψη των κονδύλων είτε μεταφυτρωτική (Εικ. 25 & 26) σήψη των στελεχών της πατάτας με συμπτώματα παρόμοια εκείνων των φυσικών μολύνσεων. Δηλαδή μελάνωση του λαιμού, σήψη εντεριώνης, κιτρίνισμα ακραίου μεριστώματος (Εικ. 24), μάρανση και νέκρωση.

Όσον αφορά τις τεχνητές μολύνσεις σε φυτά τομάτας, η μόλυνση εκδηλώθηκε αρχικά με την ανάπτυξη υδαρούς κηλίδας στην αρχική θέση εμβολιασμού, η οποία σε διάστημα 2 έως 5 ημερών, κατέληξε σε σήψη, μάρανση ή/και πλήρη αποδιοργάνωση των ιστών και κατάρρευση του φυτού (Εικ. 28 & 29).

3.1.3 Ανίχνευση απομονωμένων DNA σε πήκτωμα αγαρόζης

Στην εικόνα 4 παρουσιάζεται ένα πήκτωμα αγαρόζης (0,8% w/v) στο οποίο φορτώθηκαν απομονώσεις ολικού DNA από τα φυτοπαθογόνα βακτήρια IPO2222, TEIC624, TEIC3377, Ds3378, Ds3383, Ds3386, Ds3400, TEIC3036, TEIC3733, TEIC3211. Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε για να αξιολογηθεί η ποιότητα της κάθε μιας απομόνωσης από τα βακτηριακά κύτταρα. Όπως φαίνεται από την εικόνα, η απομόνωση ολικού DNA ήταν επιτυχής για όλα τα βακτηριακά στελέχη. Στο πήκτωμα έχουν φορτωθεί 10 από τα συνολικά 16 στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν.



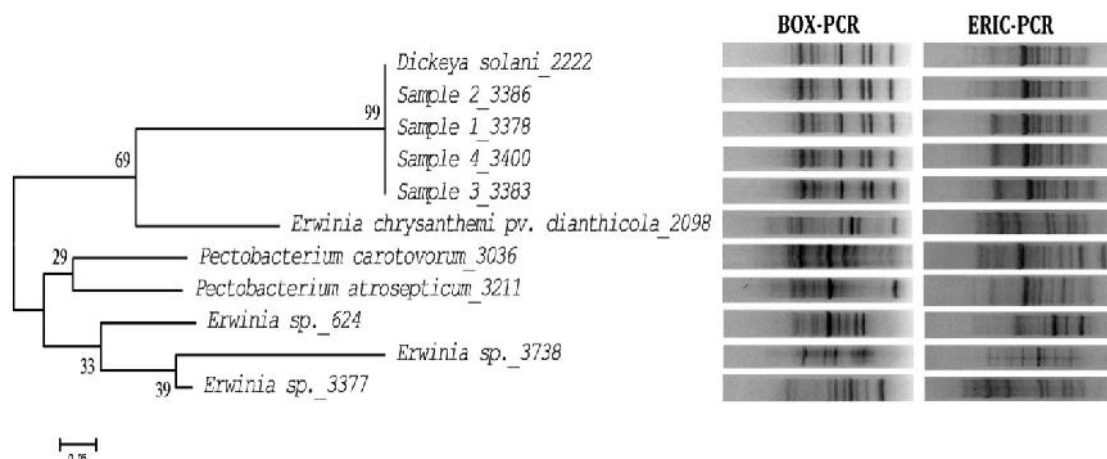
Εικόνα 4. Πήκτωμα αγαρόζης με μοριακό δείκτη τον λ EcoRI-Hind III και DNA των βακτηριακών στελεχών: 1) IPO2222, 2) TEIC624, 3) TEIC3377, 4) Ds3378, 5) Ds3383, 6) Ds3386, 7) Ds3400, 8) TEIC3036, 9) TEIC3733, 10) TEIC3211

3.1.4 Υπολογισμός συγκεντρώσεων απομονωμένων DNA

Η μέτρηση πραγματοποιήθηκε προκειμένου να καθοριστεί η συγκέντρωση των απομονωμένων DNA από τα βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν για την ταυτοποίηση. Με βάση τις αρχικές συγκεντρώσεις των απομονωθέντων DNA τα δείγματα αραιώθηκαν μέχρι τα 50 ng/μl.

3.1.5 Αποτελέσματα rep-PCR

Κατά την εφαρμογή των μοριακών δεικτών BOX και ERIC, τα βακτηριακά στελέχη που απομονώθηκαν από φυτά πατάτας (Ds3386, Ds3378, Ds3400, Ds3383), έδειξαν πλήρη ταύτιση με το στέλεχος αναφοράς (IPO2222) του *Dickeya solani*, καθώς εμφάνισαν πανομοιότυπο πρότυπο ζώνωσης (μοριακό αποτύπωμα). Ενώ υπάρχει σαφής διαφοροποίηση από τα συγγενικά βακτηριακά στελέχη του *Erwinia chrysanthemi* pv. *dianthicola* (ή *Dickeya dianthicola*) BPIC2098, *Pectobacterium carotovorum* TEIC3036, *Pectobacterium atrosepticum* TEIC3211, *Erwinia* sp. TEIC624, *Erwinia* sp. TEIC3738, και *Erwinia* sp. TEIC3377. Τα αποτελέσματα εμφανίζονται αναλυτικά στο δενδρόγραμμα της εικόνας 5. Το δενδρόγραμμα κατασκευάστηκε χρησιμοποιώντας τον αλγόριθμο NT και το πρόγραμμα MEGA5 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis).



Εικόνα 5. Δενδρόγραμμα με βάση τα αποτελέσματα των BOX και ERIC-PCR, που παρουσιάζει την ομαδοποίηση των φυτοπαθογόνων βακτηριακών στελεχών που χρησιμοποιήθηκαν.

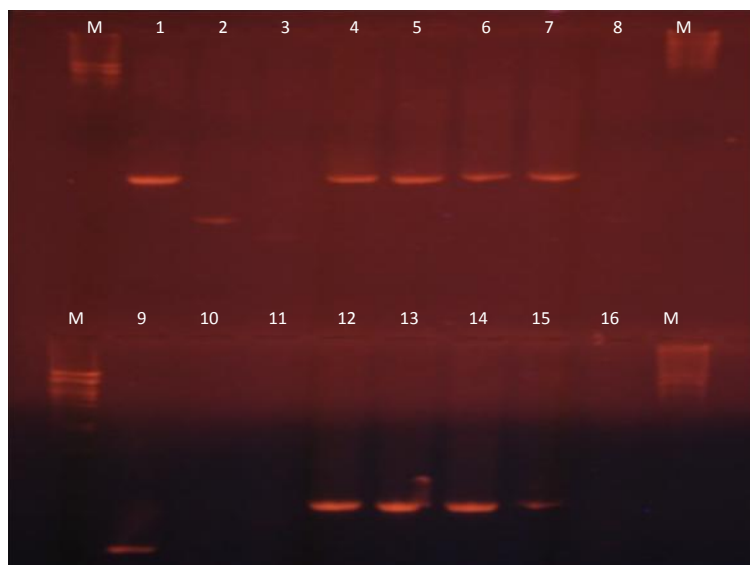
3.1.6 Αποτελέσματα *ade*-PCR

Τα αποτελέσματα της *ade*-PCR παρουσιάζονται σε πήκτωμα αγαρόζης (Εικ. 6) συγκέντρωσης 1,3% w/v, χρησιμοποιώντας τους εκκινητές *ade1/ade2*. Αυτό που παρατηρείται είναι ότι το πρότυπο ζωνών (420 bp), που εμφανίζει το στέλεχος αναφοράς IPO2222 είναι πανομοιότυπο με τα στελέχη Ds3378, Ds3383, Ds3386, Ds3400 και BPIC2098 που έχουν απομονωθεί από φυτά πατάτας, καθώς και με τα στελέχη Ds3402, Ds3403, Ds3405 που αφορούν επαναπομονώσεις των στελεχών TEIC3388, TEIC3378, TEIC3383, τα οποία έχουν επαναπομονωθεί από τις τεχνητές μολύνσεις σε καλαμπόκι, γαρύφαλλο και ποϊνσέτια αντίστοιχα. Επιπρόσθετα, τα στελέχη TEIC624, TEIC3377, TEIC3036, TEIC3733, TEIC3211, TEIC 3737 και TEIC3738 σαφώς διαφοροποιούνται.

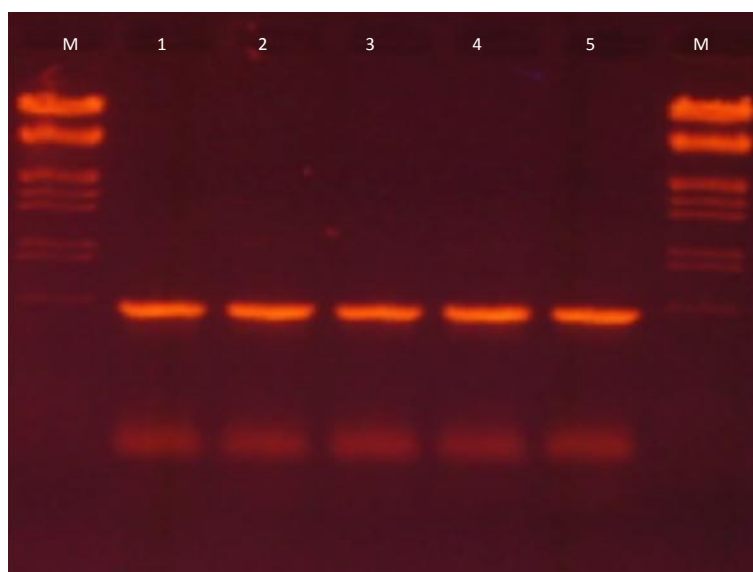
3.1.7 Αποτελέσματα *dnaX*-PCR

Στην εικόνα 7 παρουσιάζονται τα προϊόντα της *dnaX*-PCR σε πήκτωμα συγκέντρωσης 1,3% w/v. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την συγκεκριμένη αντίδραση ήταν οι *dnaXf* και *dnaXr*. Στο πήκτωμα φαίνονται τα στελέχη IPO2222, Ds3378, Ds3383, Ds3386, και το BPIC2098. Παρατηρούμε ότι εμφανίζεται μια ζώνη για όλα τα στελέχη στα 535 bp.

Η ζώνη που εμφανίζεται στο πήκτωμα και φέρει το επιθυμητό μέγεθος (535 bp), απομονώθηκε από το πήκτωμα αγαρόζης και στη συνέχεια αλληλουχίστηκε με την μέθοδο κατά Sanger. Τα αποτελέσματα της αλληλούχησης εμφανίζονται στο παράρτημα 6.1.



Εικόνα 6. Πήκτωμα αγαρόζης που απεικονίζει το προϊόν της *ade*-PCR, χρησιμοποιώντας τα στελέχη: 1) IPO2222, 2) TEIC624, 3) TEIC3377, 4) Ds3378, 5) Ds3383, 6) Ds3386, 7) Ds3400, 8) TEIC3036, 9) TEIC3733, 10) TEIC3211, 11) TEIC3737, 12) Ds3402, 13) Ds3403, 14) Ds3405, 15) BPIC2098, 16) TEIC3738. Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε ο λ /EcoRI-Hind III.



Εικόνα 7. Πήκτωμα αγαρόζης που απεικονίζει το προϊόν της *dnaX*-PCR. Στο πήκτωμα εμφανίζονται πέντε από τα δέκα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν: 1) IPO2222, 2) Ds3378, 3) Ds3383, 4) Ds3386, 5) BPIC2098. Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε ο λ /EcoRI-Hind III.

3.1.8 Αποτελέσματα αλληλούχισης του γονιδίου *dnaX*

Τα στελέχη που επιλέχθηκαν για αλληλούχιση ήταν τα εξής: IPO2222, Ds3378, Ds3386, Ds3400, Ds3403, TEIC3733, TEIC3211, TEIC3738, TEIC624 και το BPIC2098. Τα αποτελέσματα των αλληλουχίσεων (παραρτημα. 6.1) εισήχθησαν στη βάση δεδομένων National Center for Biotechnology Information (NCBI) και πήραμε τις παρακάτω πληροφορίες για τα προαναφερθέντα στελέχη:

Η αλληλούχιση του στελέχους IPO2222 έδειξε ότι όντως ανήκει στο βακτήριο *Dickeya solani* όπως αναφέρουν οι Sławiak *et al.* (2009b).

Τα στελέχη Ds3378, Ds3386, Ds3400 και Ds3403 που έχουν απομονωθεί από φυτά πατάτας, εμφάνισαν πανομοιότυπα ζευγάρια βάσεων σε ποσοστό 100% με το στέλεχος αναφοράς IPO2222 (*Dickeya solani*), που έχει απομονωθεί από πατάτα στην Ολλανδία, καθώς και με άλλα *Dickeya solani* που είναι κατατεθειμένα στη βάση δεδομένων (Εικ. 30).

Το στέλεχος TEIC3733 από κουνουπίδι, παρουσίασε πανομοιότυπα ζευγάρια βάσεων με το στέλεχος *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* SCRI1043 που έχει απομονωθεί από πατάτα στην Σκωτία, σε ποσοστό 100%.

Το στέλεχος TEIC3211 από πατάτα, παρουσίασε ομολογία σε ποσοστό 95% με το στέλεχος *Pectobacterium atrosepticum* IPO998 που έχει απομονωθεί από πατάτα στην Ολλανδία και ομολογία σε ποσοστό 93% με το στέλεχος *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* PC1 που έχει απομονωθεί από *Ornithogalum* στο Ισραήλ.

Το στέλεχος TEIC3738 από υάκινθο, παρουσίασε ομολογία σε ποσοστό 98% με το στέλεχος *Pectobacterium atrosepticum* IPO998 που έχει απομονωθεί από πατάτα στην Ολλανδία και ομολογία σε ποσοστό 93% *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* SCRI1043 που έχει απομονωθεί από πατάτα στην Σκωτία.

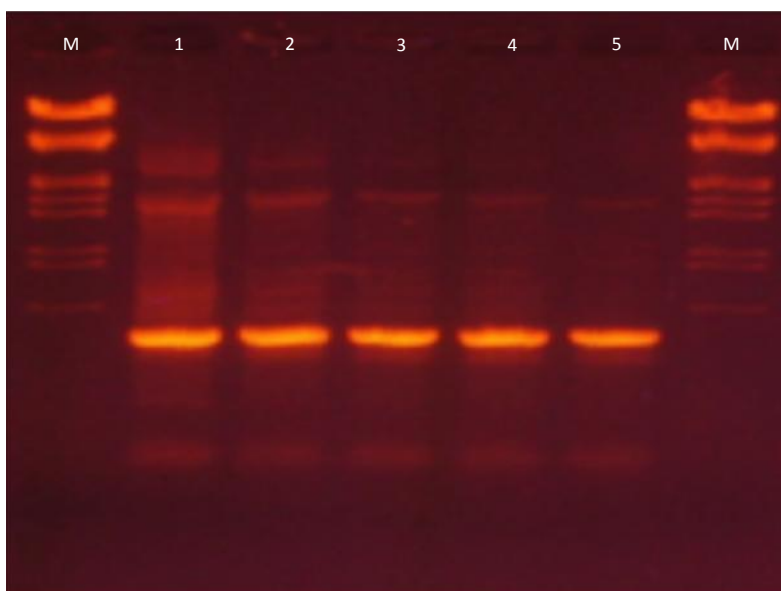
Το στέλεχος TEIC624 από πιπεριά, παρουσίασε ομολογία σε ποσοστό 95% με το στέλεχος *Pectobacterium atrosepticum* IPO998 που έχει απομονωθεί από πατάτα στην Ολλανδία και ομολογία σε ποσοστό 94% με το *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* PC1 που έχει απομονωθεί από *Ornithogalum* στο Ισραήλ.

Το στέλεχος BPIC2098 από πατάτα, παρουσίασε ομολογία σε ποσοστό 99% με το στέλεχος *Dickeya dianthicola* IPO2096 που έχει απομονωθεί από πατάτα στην Φιλανδία.

Τα αποτελέσματα της αλληλούχισης του *dnaX* για τα παραπάνω στελέχη, υπάρχουν κατατεθειμένα στη βάση δεδομένων του National Center for Biotechnology Information (NCBI) με κωδικούς καταχώρισης από το JN663794 έως το JN663803.

3.1.9 Αποτελέσματα 16s rDNA-PCR

Στην εικόνα 8 παρουσιάζονται τα προϊόντα της 16s rDNA-PCR σε πήκτωμα συγκέντρωσης 1,3% w/v. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για αυτή την αντίδραση ήταν οι F985PTO και R1378. Στο πήκτωμα φαίνονται τα στελέχη IPO2222, Ds3378, Ds3383, Ds3386, και το BPIC2098.



Εικόνα 8. Πήκτωμα αγαρόζης που απεικονίζει το προϊόν της 16s rDNA-PCR. Στο πήκτωμα εμφανίζονται πέντε από τα δέκα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν: 1) IPO2222, 2) Ds3378, 3) Ds3383, 4) Ds3386, 5) BPIC2098. Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε ο λ/EcoRI-Hind III.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Με βάση τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, εξήχθησαν τα παρακάτω συμπεράσματα:

Σύμφωνα με το μορφολογικό και βιοχημικό φαινότυπο αλλά και την παθογένεια των βακτηριακών στελεχών που απομονώθηκαν από τους προσβεβλημένους ιστούς πατάτας, προέκυψε ότι τα στελέχη αυτά ανήκουν στο γένος *Dickeya*, όπως προκύπτει και από την μελέτη της Σταύρου (2011) που ολοκληρώθηκε το ίδιο χρονικό διάστημα.

Η εφαρμογή της PCR με τους μοριακούς δείκτες BOX και ERIC, για την μοριακή ταυτοποίηση των στελεχών Ds3386, Ds3378, Ds3400, και Ds3383 που έχουν απομονωθεί από φυτά πατάτας, έδειξε την πλήρη ταύτισή τους με το στέλεχος αναφοράς IPO2222 (*Dickeya solani*) που έχει απομονωθεί επίσης από πατάτα, καθώς εμφάνισαν πανομοιότυπο πρότυπο ζώνωσης (μοριακό αποτύπωμα), ενώ τα διαφοροποιεί σαφώς από τα συγγενικά βακτηριακά στελέχη *Erwinia chrysanthemi* pv. *dianthicola* BPIC2098 (από πατάτα), *Pectobacterium carotovorum* TEIC3036 (από μπανάνα), *Pectobacterium atrosepticum* TEIC3211 (από πατάτα), *Erwinia* spp. TEIC624 (από πιπεριά), *Erwinia* sp. TEIC3738 (από υάκινθο), και *Erwinia* spp. TEIC3377 (από τομάτα).

Η εφαρμογή της *ade*-PCR, για την ενίσχυση του γονιδίου pectate lyase (*pel* gene), έδειξε ότι το στέλεχος αναφοράς IPO2222 (*Dickeya solani*), εμφάνισε το ίδιο πρότυπο ζωνών (420 bp), με τα στελέχη Ds3378, Ds3383, Ds3386, Ds3400 που έχουν απομονωθεί από φυτά πατάτας, καθώς και με τα στελέχη TEIC3402, TEIC3403, TEIC3405 που αφορούν επαναπομονώσεις των στελεχών TEIC3388, Ds 3378, Ds3383. Το στέλεχος *Erwinia chrysanthemi* pv. *dianthicola* (*Dickeya dianthicola*) BPIC2098 εμφάνισε το ίδιο πρότυπο ζωνών με τα στελέχη που έχουν απομονωθεί από φυτά πατάτας, γεγονός αναμενόμενο διότι το γονίδιο αυτό διαφοροποιεί τα βακτήρια του γένους *Dickeya* από τα βακτήρια του γένους *Pectobacterium*.

Η αλληλούχιση του γονιδίου *dnaX*, μετά την εφαρμογή της *dnaX*-PCR για την ενίσχυση του γονιδίου αυτού, έδειξε ότι τα στελέχη Ds3378, Ds3386, Ds3400 και Ds3403 που έχουν απομονωθεί από φυτά πατάτας, ανήκουν στο βακτήριο *Dickeya* spp. biovar 3 (*Dickeya solani*), καθώς παρουσίασαν πανομοιότυπα ζευγάρια βάσεων σε ποσοστό 100% με αυτά του στελέχους αναφοράς (IPO2222 *Dickeya solani*) καθώς και με άλλα στελέχη του *Dickeya solani* που είναι κατατεθειμένα στη βάση δεδομένων National Center for Biotechnology Information (NCBI). Η αλληλούχιση των υπολοίπων

στελεχών, κατέδειξε ότι ανήκουν σε άλλα συγγενικά είδη, και η αλληλουχία των βάσεων τους διαφέρει σαφώς από αυτή του *Dickeya solani*.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, αποδεικνύεται ότι το παθογόνο αίτιο της ασθένειας «μελάνωση του λαιμού της πατάτας», οφείλεται στο βακτήριο *Dickeya* spp. biovar 3 (*Dickeya solani*) που εμφανίζεται για πρώτη φορά ως παθογόνο αίτιο της ασθένειας αυτής στην Ελλάδα.

Από την ανασκόπηση της βιβλιογραφίας προκύπτει ότι το βακτήριο *Dickeya* spp. θα μπορούσε να αποτελέσει ένα σημαντικό κίνδυνο για τη καλλιέργεια της πατάτας και στην Ελλάδα, αν δε ληφθούν άμεσα μέτρα για την αποφυγή της μαζικής εισαγωγής του παθογόνου στη χώρα μας με το πολλαπλασιαστικό υλικό της πατάτας, αν αναλογιστούμε ότι το 80% του απαιτούμενου στη χώρα μας πατατόσπορου εισάγεται από τις χώρες όπου το βακτήριο δημιουργεί σημαντικά προβλήματα.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ξενόγλωσση βιβλιογραφία

- Alivizatos, A. S., 1985. Bacterial wilt of tomato in Greece caused by *Erwinia chrysanthemi*. *Plant Pathology*, 34(4), 638-639.
- Alivizatos, S., Glynos, E., 2006. Potato blackleg caused by *Erwinia chrysanthemi*. *Annals of the Benaki Phytopathological Institute*, 20(2), 101-107.
- Burkholder, W. D., Mc Fadden, L. A., Dimock, A.W., 1953. A bacterial blight of chrysanthemums. *Phytopathology*, 43, 522-526.
- Chen, K. S., Saxena, P., Walker, J. R., 1993. Expression of the *Escherichia coli dnaX* gene. *Journal of Bacteriology*, 175(20), 6663-6670.
- Czajkowski, R., Grabe, G., van der Wolf, J., 2009. Distribution of *Dickeya* spp. and *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* in naturally infected seed potatoes. *European Journal of Plant Pathology*, 125(2), 263-275.
- Czajkowski, R., Perombelon, M. C. M., van Veen, J. A., van der Wolf, J. M., 2011. Control of blackleg and tuber soft rot of potato caused by *Pectobacterium* and *Dickeya* species: a review. *Plant Pathology*, 60(6), 999-1013.
- Darrasse, A., Priou, S., Kotoujansky, A., Bertheau, Y., 1994. PCR and restriction fragment length polymorphism of a *pel* gene as a tool to identify *Erwinia carotovora* in relation to potato diseases. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(5), 1437-1443.
- Diallo, S., Latour, X., Groboillot, A., Smadja, B., Copin, P., Orange, N., Feuilloley, G. J. M., Chevalier, S., 2009. Simultaneous and selective detection of two major soft rot pathogens of potato: *Pectobacterium atrosepticum* (*Erwinia carotovora* subsp. *atrosepticum*) and *Dickeya* spp. (*Erwinia chrysanthemi*). *European Journal of Plant Pathology*, 125(2), 349-354.
- Dickey, R. S., 1979. *Erwinia chrysanthemi*: A Comparative Study of Phenotypic Properties of Strains from Several Hosts and Other *Erwinia* Species. *Phytopathology*, 69(4), 324-329.
- Elphinstone, J., Saddler, G., 2008. *Erwinia chrysanthemi* (*Dickeya dianthicola* and other *Dickeya* spp.) able to infect potatoes. Science and Advice for Scottish Agriculture. Potato council, pp. 1-18.
- George, M. L. C., Nelson, R. J., Zeigler, R. S., 1998. Leung, H. Rapid Population Analysis of *Magnaporthe grisea* by Using rep-PCR and Endogenous Repetitive

- DNA Sequences. *Phytopathology*, 88(3), 223-229.
- Goumas, D. E., 1987. Possibilites de detection d' *Erwinia chrysanthemi* pv *dianthicola* (Hellmers) Dickey 1979 agent de la bacteriose du *Dahlia* sp. Evaluation des methodes immunoenzymatiques pour le controle sanitaire du materiel de propagation. (Studies of detection methods of *Erwinia chrysanthemi* pv. *dianthicola*, the causal agent of the bacterial disease of *Dahlia*. Utilization of immunoenzymatic methods in the sanitary diagnosis of the propagative materials). *These Doctorat d Universite de Paris VI (Nouveau regime), Specialite: Sciences de la Vie et de la Sante (Phytopathologie)* pp 174, ref 112.
- Hauben, L., Moore, E. R. B., Vauterin, L., 1998. Phylogenetic position of phytopathogens within the Enterobacteriaceae. *Systematic and Applied Microbiology*, 21, 384–397.
- Laurila, J., Ahola, V., Lehtinen, A., Joutsjoki, T., Hannukkala, A., Rahkonen, A., Pirhonen, M., 2008. Characterization of *Dickeya* strains isolated from potato and river water samples in Finland. *European Journal of Plant Pathology*, 122(2), 213-225.
- Laurila, J., Hannukkala, A., Nykyri, J., Pasanen, M., Hélias, V., Garland, L., Pirhonen, M., 2010. Symptoms and yield reduction caused by *Dickeya* spp. strains isolated from potato and river water in Finland. *European Journal of Plant Pathology*, 126(2), 249-262.
- Lelliott, R. A., Dickey, R. S., 1984. Genus VII. *Erwinia* Winslow, Broadhurst, Buchanan, Krumwiede, Rogers and Smith 1920, 209AL. In: Krieg NR, Holt JG, eds. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 1. Gram-negative Bacteria of General, Medical, or Industrial Importance. Baltimore, MD, USA: Williams & Wilkins, 469–476.
- 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.
- Nassar, A., Darrasse, A., Lemattre, M., Kotoujansky, A., Dervin, C., Vedel, R., Bertheau, Y., 1996. Characterization of *Erwinia chrysanthemi* by pectinolytic isozyme polymorphism and restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified fragments of *pel* genes. *Applied and Environmental*

- Microbiology*, 62(7), 2228-2235.
- Palacio-Bielsa, A., Rodríguez Mosquera, M., Cambra Álvarez, M., Berruete Rodríguez, I., López-Solanilla, E., Rodríguez-Palenzuela, P., 2010. Phenotypic diversity, host range and molecular phylogeny of *Dickeya* isolates from Spain. *European Journal of Plant Pathology*, 127(3), 311-324.
- Parkinson, N., Stead, D., Bew, J., Heeney, J., Tsrer, L., Elphinstone, J., 2009. *Dickeya* species relatedness and clade structure determined by comparison of *recA* sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59(10), 2388–2393.
- Rademaker, J. L. W. and 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, pp. 151-171.
- Saddler, G., 2010. A New Threat to Potato—*Dickeya solani*. Science and Advice for Scottish Agriculture. The Scottish Government, pp. 1-4.
- Samson, R., Poutier, F., Saily, M., Jouan, B., 1987. Caractérisation des *Erwinia chrysanthemi* isolées de *Solanum tuberosum* et d'autres plantes-hôtes selon les biovars et sérogroupes. EPPO Bulletin, 17(1), 11–16.
- Samson, R., Legendre, J. B., Christen, R., Le Saux, M. F., Achouak, W., Gardan, L., 2005. Transfer of *Pectobacterium chrysanthemi* (Burkholder *et al.* 1953) Brenner *et al.* 1973 and *Brenneria paradisiaca* to the genus *Dickeya* gen. nov. as *Dickeya chrysanthemi* comb. nov. and *Dickeya paradisiaca* comb. nov. and delineation of four novel species, *Dickeya dadantii* sp. nov., *Dickeya dianthicola* sp. nov., *Dickeya dieffenbachiae* sp. nov. and *Dickeya zae* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(4), 1415-1427.
- Slawiak, M., Lojkwaska, E., van der Wolf, J.M., 2009a. First report of bacterial soft rot on potato caused by *Dickeya* sp. (syn. *Erwinia chrysanthemi*) in Poland. *Plant Pathology*, 58(4), 794.
- Slawiak, M., van Beckhoven, J., Speksnijder, A., Czajkowski, R., Grabe, G., & van der Wolf, J., M., 2009b. Biochemical and genetical analysis reveal a new clade of biovar 3 *Dickeya* spp. strains isolated from potato in Europe. *European Journal*

of Plant Pathology, 125(2), 245-261.

- Toth, I. K., Avrova, A. O., Hyman, L. J., 2001. Rapid Identification and Differentiation of the Soft Rot Erwinias by 16S-23S Intergenic Transcribed Spacer-PCR and Restriction Fragment Length Polymorphism Analyses. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(9), 4070-4076.
- Toth, I. K., Bell, K. S., Holeva, M. C., Birch, P. R. J., 2003. Soft rot erwiniae: from genes to genomes. *Molecular Plant Pathology*, 4(1), 17-30.
- Toth, I. K., van der Wolf, J. M., Saddler, G., Lojkowska, E., Hélias, V., Pirhonen, M., Tsrör, L., Elphinstone, J. G., 2011. *Dickeya* species: an emerging problem for potato production in Europe. *Plant Pathology*, 60(3), 385-399.
- Tsrör, L., Erlich, O., Lebiush, S., Hazanovsky, M., Zig, U., Slawiak, M., Grade, G., van der Wolf, J. M., van der Haar, J. J., 2009. Assessment of recent outbreaks of *Dickeya* sp. (syn. *Erwinia chrysanthemi*) slow wilt in potato crops in Israel. *European Journal of Plant Pathology*, 123(3), 311-320.
- Van der Wolf, J.M., Czajkowski, R., Velvis, H., Doorn, J., 2009. Why is *Erwinia chrysanthemi* (*Dickeya* sp.) taking over? –The ecology of a blackleg pathogen. Symposium KNPV Pests and climate change, 3 December, 2008.
- Waldee, E. L., 1945. Comparative studies of some peritrichous phytopathogenic bacteria. Iowa State. *Journal of Science*, 19, 435–484.

Ελληνική βιβλιογραφία

- Αλιβιζάτος, Α. Σ., 1979. Βακτηριακός νανισμός της γαρυφαλλιάς. Χρονικά του Μπενάκειου Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου (Ν. Σ.), 12 119-137.
- Γκούμας, Δ., Αυγελής, Α., Τζωρτζακάκης, Ε., Μαλαθράκης, Ν., Ροδιτάκης, Ν., 2001. “Τεχνικός οδηγός ασθενειών και εχθρών της πατάτας”. Εκδ. Περιφέρεια Κρήτης., Ηράκλειο 2001. Σελ. 56.
- Λουλακάκης, Κ. Α., 2002. Βιοτεχνολογία Φυτών, Ασκήσεις Εργαστηρίου. ΤΕΙ Κρήτης., Ηράκλειο 2002. Σελ. 98.
- Λουλακάκης, Κ. Α., 2006. Βιοτεχνολογία Φυτών, Σημειώσεις. ΤΕΙ Κρήτης., Ηράκλειο 2006. Σελ. 150.
- Σταύρου, Δ. Σ., 2011., Μια νέα ασθένεια της πατάτας: χαρακτηρισμός του παθογόνου αιτίου. Πτυχιακή εργασία. ΤΕΙ Κρήτης., Ηράκλειο 2011. Σελ. 59.

Ταμπακάκη Α., Βερβερίδης Φ., 2003. Εργαστηριακές Ασκήσεις Βιοτεχνολογίας Φυτών. ΤΕΙ Κρήτης, Ηράκλειο 2003. Σελ. 109.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

6.1 Αποτελέσματα αλληλούχισης του γονιδίου *dnaX*

Παρακάτω παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της αλληλούχισης του γονιδίου *dnaX* όπως παρουσιάστηκαν μετά την επισκόπηση της βάσης δεδομένων του National Center for Biotechnology Information (NCBI). Τα στελέχη που παρουσιάζονται είναι τα εξής: IPO2222, Ds3378, Ds3386, Ds3400, Ds3403, TEIC3733, TEIC3211, TEIC3738, TEIC624 και το BPIC2098. Ως “Query” αναφέρονται τα βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία και ως “Sbjct” αναφέρονται τα αντίστοιχα στελέχη της βάσης δεδομένων.

Στέλεχος IPO2222 σε αντιπαραβολή με το *Dickeya solani* IPO2222 DNA polymerase III gamma subunit (*dnaX*) gene, partial cds

Score = 841 bits (455), Expect = 0.0
Identities = 455/455 (100%), Gaps = 0/455 (0%)
Strand=Plus/Plus

```

Query 1      TTTGCTGATGTGGTAGGACAGGAACATGTCCTGACGGCGTTAGCCAATGGTCTTTCGTTA  60
|
Sbjct 1      TTTGCTGATGTGGTAGGACAGGAACATGTCCTGACGGCGTTAGCCAATGGTCTTTCGTTA  60

Query 61     GGCCGTATCCATCATGCCTACCTGTTTTCCGGTACCCGGGGCGTAGGCAAGACGACTATC  120
|
Sbjct 61     GGCCGTATCCATCATGCCTACCTGTTTTCCGGTACCCGGGGCGTAGGCAAGACGACTATC  120

Query 121    GCCCGTTTACTGGCGAAAGGGCTGAATTGCGAAACCGGGATCACGGCCACGCCCTGCGGC  180
|
Sbjct 121    GCCCGTTTACTGGCGAAAGGGCTGAATTGCGAAACCGGGATCACGGCCACGCCCTGCGGC  180

Query 181    CAGTGCGATACCTGTCCGGAAATCGAACAGGGGCGATTTCGTTCGATCTGATCGAGATTGAC  240
|
Sbjct 181    CAGTGCGATACCTGTCCGGAAATCGAACAGGGGCGATTTCGTTCGATCTGATCGAGATTGAC  240

Query 241    GCGGCGTCCCGCACCAAAGTGAAGATACCCGCGATCTGCTGGACAACGTCCAATACGCT  300
|
Sbjct 241    GCGGCGTCCCGCACCAAAGTGAAGATACCCGCGATCTGCTGGACAACGTCCAATACGCT  300

Query 301    CCGGCCCGCGGTTCGCTTCAAGGTTTACCTGATCGACGAAGTGCACATGCTCTCCCGCCAC  360
|
Sbjct 301    CCGGCCCGCGGTTCGCTTCAAGGTTTACCTGATCGACGAAGTGCACATGCTCTCCCGCCAC  360

Query 361    AGCTTCAATGCGTTGCTGAAAACGCTGGAAGAGCCGCCCGCATGTGAAATTCCTGCTG  420
|
Sbjct 361    AGCTTCAATGCGTTGCTGAAAACGCTGGAAGAGCCGCCCGCATGTGAAATTCCTGCTG  420

Query 421    GCGACCACCGATCCGCAAAAGCTGCCGGTACTAT  455
|
Sbjct 421    GCGACCACCGATCCGCAAAAGCTGCCGGTACTAT  455

```

Στέλεχος Ds3378 σε σύγκριση με το *Dickeya* sp. IPO2222 DNA polymerase III subunits gamma and tau (dnaX) gene, partial cds

Length=536

Score = 841 bits (455), Expect = 0.0

Identities = 455/455 (100%), Gaps = 0/455 (0%)

Strand=Plus/Plus

```

Query 1   TTTGCTGATGTGGTAGGACAGGAACATGCCTGACGGCGTTAGCCAATGGTCTTTCGTTA 60
          |||
Sbjct 36   TTTGCTGATGTGGTAGGACAGGAACATGCCTGACGGCGTTAGCCAATGGTCTTTCGTTA 95

Query 61   GGCCGTATCCATCATGCCTACCTGTTTTCCGGTACCCGGGGCGTAGGCAAGACGACTATC 120
          |||
Sbjct 96   GGCCGTATCCATCATGCCTACCTGTTTTCCGGTACCCGGGGCGTAGGCAAGACGACTATC 155

Query 121  GCCCGTTTACTGGCGAAAGGGCTGAATTGCGAAACCGGGATCACGGCCACGCCCTGCGGC 180
          |||
Sbjct 156  GCCCGTTTACTGGCGAAAGGGCTGAATTGCGAAACCGGGATCACGGCCACGCCCTGCGGC 215

Query 181  CAGTGCGATACCTGTCGGGAAATCGAACAGGGGCGATTTCGTCGATCTGATCGAGATTGAC 240
          |||
Sbjct 216  CAGTGCGATACCTGTCGGGAAATCGAACAGGGGCGATTTCGTCGATCTGATCGAGATTGAC 275

Query 241  GCGGCGTCCCGCACCAAAGTGAAGATAACCGCGATCTGCTGGACAACGTCCAATACGCT 300
          |||
Sbjct 276  GCGGCGTCCCGCACCAAAGTGAAGATAACCGCGATCTGCTGGACAACGTCCAATACGCT 335

Query 301  CCGGCCCGCGGTCGCTTCAAGGTTTACCTGATCGACGAAGTGCACATGCTCTCCGCCAC 360
          |||
Sbjct 336  CCGGCCCGCGGTCGCTTCAAGGTTTACCTGATCGACGAAGTGCACATGCTCTCCGCCAC 395

Query 361  AGCTTCAATGCGTTGCTGAAAACGCTGGAAGAGCCGCCCGCATGTGAAATTCCTGCTG 420
          |||
Sbjct 396  AGCTTCAATGCGTTGCTGAAAACGCTGGAAGAGCCGCCCGCATGTGAAATTCCTGCTG 455

Query 421  GCGACCACCGATCCGCAAAAGCTGCCGGTACTAT 455
          |||
Sbjct 456  GCGACCACCGATCCGCAAAAGCTGCCGGTACTAT 490

```

Στέλεχος Ds3386 σε σύγκριση με το *Dickeya* sp. IPO2222 DNA polymerase III subunits gamma and tau (dnaX) gene, partial cds

Length=536

Score = 811 bits (439), Expect = 0.0

Identities = 439/439 (100%), Gaps = 0/439 (0%)

Strand=Plus/Plus

```

Query 1   AGGAACATGTCCTGACGGCGTTAGCCAATGGTCTTTCGTTAGGCCGTATCCATCATGCCT 60
          |||
Sbjct 55   AGGAACATGTCCTGACGGCGTTAGCCAATGGTCTTTCGTTAGGCCGTATCCATCATGCCT 114

Query 61   ACCTGTTTTCGGTACCCGGGGCGTAGGCAAGACGACTATCGCCCGTTTACTGGCGAAAG 120
          |||
Sbjct 115  ACCTGTTTTCGGTACCCGGGGCGTAGGCAAGACGACTATCGCCCGTTTACTGGCGAAAG 174

Query 121  GGCTGAATGCGAAACCGGGATCACGGCCACGCCCTGCGGCCAGTGCATACCTGTTCGGG 180
          |||
Sbjct 175  GGCTGAATGCGAAACCGGGATCACGGCCACGCCCTGCGGCCAGTGCATACCTGTTCGGG 234

Query 181  AAATCGAACAGGGGCGATTCGTCGATCTGATCGAGATTGACGCGGCGTCCCGCACCAAAG 240
          |||
Sbjct 235  AAATCGAACAGGGGCGATTCGTCGATCTGATCGAGATTGACGCGGCGTCCCGCACCAAAG 294

Query 241  TGGAAGATACCCGCGATCTGCTGGACAACGTCCAATACGCTCCGGCCCGGGTTCGCTTCA 300
          |||
Sbjct 295  TGGAAGATACCCGCGATCTGCTGGACAACGTCCAATACGCTCCGGCCCGGGTTCGCTTCA 354

Query 301  AGGTTTACCTGATCGACGAAGTGCACATGCTCTCCCGCCACAGCTTCAATGCGTTGCTGA 360
          |||
Sbjct 355  AGGTTTACCTGATCGACGAAGTGCACATGCTCTCCCGCCACAGCTTCAATGCGTTGCTGA 414

Query 361  AAACGCTGGAAGAGCCGCGCCGCATGTGAAATTCCTGCTGGCGACCACCGATCCGCAA 420
          |||
Sbjct 415  AAACGCTGGAAGAGCCGCGCCGCATGTGAAATTCCTGCTGGCGACCACCGATCCGCAA 474

Query 421  AGCTGCCGGTGACTATTCT 439
          |||
Sbjct 475  AGCTGCCGGTGACTATTCT 493

```

Στέλεχος Ds3400 σε σύγκριση με το με το *Dickeya* sp. IPO2222 DNA polymerase III subunits gamma and tau (dnaX) gene, partial cds

Length=536

Score = 835 bits (452), Expect = 0.0

Identities = 452/452 (100%), Gaps = 0/452 (0%)

Strand=Plus/Plus

```

Query 1      GCTGATGTGGTAGGACAGGAACATGTCCTGACGCGTTAGCCAATGGTCTTTCGTTAGGC 60
             |||
Sbjct 39     GCTGATGTGGTAGGACAGGAACATGTCCTGACGCGTTAGCCAATGGTCTTTCGTTAGGC 98

Query 61     CGTATCCATCATGCCTACCTGTTTCCGGTACCCGGGGCGTAGGCAAGACGACTATCGCC 120
             |||
Sbjct 99     CGTATCCATCATGCCTACCTGTTTCCGGTACCCGGGGCGTAGGCAAGACGACTATCGCC 158

Query 121    CGTTTACTGGCGAAAGGGCTGAATTGCGAAACCGGGATCACGGCCACGCCCTGCGGCCAG 180
             |||
Sbjct 159    CGTTTACTGGCGAAAGGGCTGAATTGCGAAACCGGGATCACGGCCACGCCCTGCGGCCAG 218

Query 181    TCGGATACCTGTCGGGAAATCGAACAGGGCGATTTCGTCGATCTGATCGAGATTGACGCG 240
             |||
Sbjct 219    TCGGATACCTGTCGGGAAATCGAACAGGGCGATTTCGTCGATCTGATCGAGATTGACGCG 278

Query 241    GCGTCCCGCACCAAAGTGAAGATACCCGCGATCTGCTGGACAACGTCCAATACGCTCCG 300
             |||
Sbjct 279    GCGTCCCGCACCAAAGTGAAGATACCCGCGATCTGCTGGACAACGTCCAATACGCTCCG 338

Query 301    GCCCGCGGTCGCTTCAAGGTTTACCTGATCGACGAAGTGCACATGCTCTCCCGCCACAGC 360
             |||
Sbjct 339    GCCCGCGGTCGCTTCAAGGTTTACCTGATCGACGAAGTGCACATGCTCTCCCGCCACAGC 398

Query 361    TTCAATGCGTTGCTGAAAACGCTGGAAGAGCCCGCCGCATGTGAAATTCCTGCTGGCG 420
             |||
Sbjct 399    TTCAATGCGTTGCTGAAAACGCTGGAAGAGCCCGCCGCATGTGAAATTCCTGCTGGCG 458

Query 421    ACCACCGATCCGCAAAAGCTGCCGGTGACTAT 452
             |||
Sbjct 459    ACCACCGATCCGCAAAAGCTGCCGGTGACTAT 490

```

Στέλεχος Ds3403 σε σύγκριση με το 2222 *Dickeya* sp. IPO2222 DNA polymerase III subunits gamma and tau (dnaX) gene, partial cds

Length=536

Score = 841 bits (455), Expect = 0.0

Identities = 455/455 (100%), Gaps = 0/455 (0%)

Strand=Plus/Plus

```

Query 1   TTTGCTGATGTGGTAGGACAGGAACATGTCCTGACGGCGTTAGCCAATGGTCTTTCGTTA 60
          |||
Sbjct 36   TTTGCTGATGTGGTAGGACAGGAACATGTCCTGACGGCGTTAGCCAATGGTCTTTCGTTA 95

Query 61   GGCCGTATCCATCATGCCTACCTGTTTTCCGGTACCCGGGGCGTAGGCAAGACGACTATC 120
          |||
Sbjct 96   GGCCGTATCCATCATGCCTACCTGTTTTCCGGTACCCGGGGCGTAGGCAAGACGACTATC 155

Query 121  GCCCGTTTACTGGCGAAAGGGCTGAATTGCGAAACCGGGATCACGGCCACGCCCTGCGGC 180
          |||
Sbjct 156  GCCCGTTTACTGGCGAAAGGGCTGAATTGCGAAACCGGGATCACGGCCACGCCCTGCGGC 215

Query 181  CAGTGCGATACCTGTCGGGAAATCGAACAGGGGCGATTTCGTCGATCTGATCGAGATTGAC 240
          |||
Sbjct 216  CAGTGCGATACCTGTCGGGAAATCGAACAGGGGCGATTTCGTCGATCTGATCGAGATTGAC 275

Query 241  GCGGCGTCCCGCACCAAAGTGAAGATAACCGCGATCTGCTGGACAACGTCCTCAATACGCT 300
          |||
Sbjct 276  GCGGCGTCCCGCACCAAAGTGAAGATAACCGCGATCTGCTGGACAACGTCCTCAATACGCT 335

Query 301  CCGGCCCGCGGTCGCTTCAAGGTTTACCTGATCGACGAAGTGCACATGCTCTCCGCCAC 360
          |||
Sbjct 336  CCGGCCCGCGGTCGCTTCAAGGTTTACCTGATCGACGAAGTGCACATGCTCTCCGCCAC 395

Query 361  AGCTTCAATGCGTTGCTGAAAACGCTGGAAGAGCCGCCCGCATGTGAAATTCCTGCTG 420
          |||
Sbjct 396  AGCTTCAATGCGTTGCTGAAAACGCTGGAAGAGCCGCCCGCATGTGAAATTCCTGCTG 455

Query 421  GCGACCACCGATCCGCAAAAGCTGCCGGTGACTAT 455
          |||
Sbjct 456  GCGACCACCGATCCGCAAAAGCTGCCGGTGACTAT 490

```

Στέλεχος TEIC3733 σε σύγκριση με το *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* SCRI1043, complete genome

Length=5064019

Score = 826 bits (447), Expect = 0.0

Identities = 447/447 (100%), Gaps = 0/447 (0%)

Strand=Plus/Plus

```

Query 1      AGTTGTCGGTCAGGAACATGTCTGACCGCGTTGGCTAACGGCCTTCCCTAGGTCGAAT 60
              |||
Sbjct 1330337 AGTTGTCGGTCAGGAACATGTCTGACCGCGTTGGCTAACGGCCTTCCCTAGGTCGAAT 1330396

Query 61     CCATCACGCTTATTTGTTTTCTGGCACCCGCGGTGTCGGGAAGACGACGATTGCCCGTTT 120
              |||
Sbjct 1330397 CCATCACGCTTATTTGTTTTCTGGCACCCGCGGTGTCGGGAAGACGACGATTGCCCGTTT 1330456

Query 121    GCTGGCAAAGGGCTGAATTGCGAACAGGGTGTAACGGCAACGCGTGC GGCCAGTGTGA 180
              |||
Sbjct 1330457 GCTGGCAAAGGGCTGAATTGCGAACAGGGTGTAACGGCAACGCGTGC GGCCAGTGTGA 1330516

Query 181    TAATGCGCGAGAAATCGAACAGGGCCGTTTTGTGCGATTTGATCGAAATCGACGCCGCTTC 240
              |||
Sbjct 1330517 TAATGCGCGAGAAATCGAACAGGGCCGTTTTGTGCGATTTGATCGAAATCGACGCCGCTTC 1330576

Query 241    TCGCACTAAAGTCGAAGACACGCGCGATCTGTTGGATAATGTGCAGTATGCTCCCGCGCG 300
              |||
Sbjct 1330577 TCGCACTAAAGTCGAAGACACGCGCGATCTGTTGGATAATGTGCAGTATGCTCCCGCGCG 1330636

Query 301    CGGGCGATTCAAGGTGTACCTGATTGACGAAGTACACATGTTATCGCGCCACAGCTTTAA 360
              |||
Sbjct 1330637 CGGGCGATTCAAGGTGTACCTGATTGACGAAGTACACATGTTATCGCGCCACAGCTTTAA 1330696

Query 361    TGGCGTGTAAAAACGCTGGAAGAGCCACCTCCGCACGTCAAATTCCTATTGGCGACCAC 420
              |||
Sbjct 1330697 TGGCGTGTAAAAACGCTGGAAGAGCCACCTCCGCACGTCAAATTCCTATTGGCGACCAC 1330756

Query 421    CGATCCGCAGAAACTGCCGGTGACCAT 447
              |||
Sbjct 1330757 CGATCCGCAGAAACTGCCGGTGACCAT 1330783

```

Στέλεχος TEIC3211 σε σύγκριση με το *Pectobacterium atrosepticum* strain IPO998 DNA polymerase III subunits gamma and tau (*dnaX*) gene, partial cds

Length=533

Score = 710 bits (384), Expect = 0.0

Identities = 428/450 (95%), Gaps = 0/450 (0%)

Strand=Plus/Plus

```

Query  9      CCATGTTGTCGGTCAGGAGCATGTCCTGACCGCGTTGGCTAATGGCCTTTCCTAGGCAG  68
          |||
Sbjct  38      CCATGTTGTCGGTCAGGAACATGTCCTGACCGCGTTGGCTAACGGCCTTTCCTAGGCAG  97

Query  69      AATTCATCACGCGTATTTGTTTTCTGGCACCCGCGGTGTCGGGAAGACGTCGATTGCCCG  128
          |||
Sbjct  98      AATTCATCACGCGTATTTGTTTTCCGGCACCCGCGGTGTCGGGAAGACGTCGATTGCCCG  157

Query  129     TTTGCTGGCAAAAAGGGCTGAATTGCGAACAGGGCGTGACGGCAACGCCTTGTGGTCAGTG  188
          |||
Sbjct  158     TTTGTTGGCAAAAAGGGCTGAATTGCGAACAGGGCGTGACGGCAACGCCTTGTGGTCAGTG  217

Query  189     TGACAAC TGCCGCGAAAATCGAACAGGGCGTTTTGTCGATTTGATCGAAATCGATGCCGC  248
          |||
Sbjct  218     TGACAAC TGCCGTGAAAATCGAGCAGGGTCGTTTTGTCGATTTGATCGAAATCGATGCCGC  277

Query  249     GTCTCGCACTAAAGTCAAGACACGCGGATCTGCTGGATAATGTGCAGTACGCCCCCGC  308
          |||
Sbjct  278     GTCTCGCACTAAAGTCAAGGACACGCGGATCTGCTGGATAATGTGCAGTACGCTCCTGC  337

Query  309     TCGTGGGCGATTCAAGGTGTATCTGATCGACGAAGTACACATGCTATCGCGCCACAGCTT  368
          |||
Sbjct  338     GCGTGGGCGGTTCAAGGTGTACCTGATTGACGAAGTACACATGCTATCGCGCCACAGCTT  397

Query  369     TAATGCACTGCTGAAAACGCTGGAAGAACC GCCTCCGCACGTCAAATTCCTGCTGGCGAC  428
          |||
Sbjct  398     TAATGCGCTGCTGAAAACGCTGGAAGAGCCACCTCCGCACGTCAAATTCCTGCTGGCGAC  457

Query  429     CACCGATCCACAAAAACTGCCTGTGACCAT  458
          |||
Sbjct  458     CACCGACCCGCAAAAAC TGCCGGTGACCAT  487

```

Στέλεχος TEIC3211 σε σύγκριση με το *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* PC1, complete genome

Length=4862913

Score = 680 bits (368), Expect = 0.0

Identities = 428/458 (93%), Gaps = 0/458 (0%)

Strand=Plus/Plus

```

Query 1      ACCTTTGCCCATGTTGTCGGTCAGGAGCATGTCCTGACCGCGTTGGCTAATGGCCTTTCC 60
          ||||| ||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 1249734 ACCTTTACCCAAGTTGTCGGTCAGGAACATGTCCTGACCGCGTTGGCTAACGGCCTTTCC 1249793

Query 61     CTAGGCAGAATTCATCACGCGTATTTGTTTTCTGGCACCCGCGGTGTCGGGAAGACGTCG 120
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 1249794 TTAGGCAGAATCCATCACGCTTATTTGTTTTCTGGCACCCGTTGGCGTCGGGAAGACGTCG 1249853

Query 121    ATTGCCCGTTTGCTGGCAAAGGGCTGAATTGCGAACAGGGCGTGACGGCAACGCCTTGT 180
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 1249854 ATTGCCCGTTTGCTGGCAAAGGGCTGAATTGCGAACAGGGCGTGACGGCGACGCCTTGT 1249913

Query 181    GGTCAAGTGTGACAACTGCCGCGAAATCGAACAGGGCCGTTTTGTCGATTTGATCGAAATC 240
          || ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 1249914 GGCCAGTGTGACAACTGCCGCGAAATCGAACAGGGCCGTTTTGTTGATTTGATCGAAATC 1249973

Query 241    GATGCGGCGTCTCGCACTAAAGTCAAGACACGCGCATCTGCTGGATAATGTGCAGTAC 300
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 1249974 GATGCTGCGTCTCGTACTAAAGTAGAAGATACACGCGATCTGCTGGATAACGTGCAGTAC 1250033

Query 301    GCCCCCGCTCGTGGCGATTCAAGGTGTATCTGATCGACGAAGTACACATGCTATCGCGC 360
          ||||| || || ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 1250034 GCCCCCGCGCGCGGACGATTTAAGGTGTACTTGATGACGAAGTACACATGCTATCGCGC 1250093

Query 361    CACAGCTTTAATGCACTGCTGAAAACGCTGGAAGAACCCTCCGCACGTCAAATTCCTG 420
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 1250094 CACAGCTTTAATGCGCTGCTGAAAACGCTGGAAGAACCCTCCGCACGTCAAATTCCTG 1250153

Query 421    CTGGCGACCACCGATCCACAAAACTGCCTGTGACCAT 458
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 1250154 CTGGCGACTACCGATCCACAGAACTGCCAGTGACCAT 1250191

```


Στέλεχος TEIC624 σε σύγκριση με το *Pectobacterium atrosepticum* IPO998 DNA polymerase III subunits gamma and tau (dnaX) gene, partial cds

Length=533

Score = 669 bits (362), Expect = 0.0

Identities = 402/422 (95%), Gaps = 0/422 (0%)

Strand=Plus/Plus

```

Query 4   CATGTCCTGACCGCGTTGGCTAACGGCCTTTCCTAGGCAGAATTCATCACGCGTATTTG 63
          |||
Sbjct 57   CATGTCCTGACCGCGTTGGCTAACGGCCTTTCCTAGGCAGAATTCATCACGCGTATTTG 116

Query 64   TTTTCTGGCACCCGCGGTGTCGGTAAGACGTCGATTGCCCGTTTGTGGCAAAAGGGCTG 123
          |||
Sbjct 117  TTTTCCGGCACCCGCGGTGTCGGGAAGACGTCGATTGCCCGTTTGTGGCAAAAGGGCTG 176

Query 124  AATTGCGAACAGGGCGTGACGGCAACGCCTTGTGGTCAGTGTGACAAC TGCCGCAAATC 183
          |||
Sbjct 177  AATTGCGAACAGGGCGTGACGGCAACGCCTTGTGGTCAGTGTGACAAC TGCCGCAAATC 236

Query 184  GAACAGGGCCGTTTGTGCGATTTGATCGAAATCGATGCGCGTCTCGCACTAAAGTCGAA 243
          ||
Sbjct 237  GAGCAGGGTCGTTTGTGCGATTTGATCGAAATCGATGCGCGTCTCGCACTAAAGTCGAG 296

Query 244  GACACGCGGATCTGCTGGATAATGTGAGTACGCCCCGCTCGTGGGCGATTCAAGGTG 303
          |||
Sbjct 297  GACACGCGGATCTGCTGGATAATGTGAGTACGCTCCTGCGCGTGGGCGTTCAAGGTG 356

Query 304  TATCTGATCGACGAAGTACACATGCTATCGCGCCACAGCTTTAATGCACTGCTGAAAACG 363
          ||
Sbjct 357  TACCTGATGACGAAGTACACATGCTATCGCGCCACAGCTTTAATGCGCTGCTGAAAACG 416

Query 364  CTGGAAGAACCGCTCCGCACGTCAAATTCCTGCTGGCGACCACCGATCCACAAAAC TG 423
          |||
Sbjct 417  CTGGAAGAGCCACCTCCGCACGTCAAATTCCTGCTGGCGACCACCGACCCGCAAAAAC TG 476

Query 424  CC 425
          ||
Sbjct 477  CC 478

```

Στέλεχος TEIC624 σε σύγκριση με το *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* PC1, complete genome

Length=4862913

Score = 636 bits (344), Expect = 4e-179

Identities = 396/422 (94%), Gaps = 0/422 (0%)

Strand=Plus/Plus

```

Query 4          CATGTCCTGACCGCGTTGGCTAACGGCCTTCCCTAGGCAGAATTCATCACGCGTATTTG 63
                |||
Sbjct 1249761    CATGTCCTGACCGCGTTGGCTAACGGCCTTCCCTAGGCAGAATCCATCACGCTTATTTG 1249820

Query 64          TTTTCTGGCACCCGCGGTTCGGTAAGACGTCGATTGCCCGTTTGTGGCAAAGGGCTG 123
                |||
Sbjct 1249821    TTTTCTGGCACCCGTCGGGTAAGACGTCGATTGCCCGTTTGTGGCAAAGGGCTG 1249880

Query 124         AATTGCGAACAGGGCGTGACGGCAACGCCCTGTGGTCAAGTGTGACAACGCGCGAAATC 183
                |||
Sbjct 1249881    AATTGCGAACAGGGCGTGACGGGACGCCCTGTGGCCAGTGTGACAACGCGCGAAATC 1249940

Query 184         GAACAGGGCGTTTTGTGCGATTTGATCGAAATCGATGCGGCGTCTCGCACTAAAGTCGAA 243
                |||
Sbjct 1249941    GAACAGGGCGTTTTGTGTTGATTTGATCGAAATCGATGCTGCGTCTCGTACTAAAGTAGAA 1250000

Query 244         GACACGCGGATCTGCTGGATAATGTGCAGTACGCCCCGCTCGTGGGCGATTCAAGGTG 303
                |||
Sbjct 1250001    GATACACGCGGATCTGCTGGATAACGTGCAGTACGCCCCGCGCGGACGATTTAAGGTG 1250060

Query 304         TATCTGATCGACGAAGTACACATGCTATCGCGCCACAGCTTTAATGCACTGCTGAAAACG 363
                |||
Sbjct 1250061    TACCTGATTGACGAAGTACACATGCTATCGCGCCACAGCTTTAATGCGCTGCTGAAAACG 1250120

Query 364         CTGGAAGAACCGCCTCCGCACGTCAAATTCCTGCTGGCGACCACCGATCCACAAAACG 423
                |||
Sbjct 1250121    CTGGAAGAACCGCCTCCGCACGTTAAATTCCTGCTGGCGACTACCGATCCACAGAAACG 1250180

Query 424         CC 425
                ||
Sbjct 1250181    CC 1250182

```

Στέλεχος BPIC2098 σε σύγκριση με το *Dickeya dianthicola* strain IPO2096 DNA polymerase III subunits gamma and tau-like (dnaX) gene, partial sequence

Length=533

Score = 835 bits (452), Expect = 0.0

Identities = 455/456 (99%), Gaps = 1/456 (0%)

Strand=Plus/Plus

```

Query 3      CTTTGCTGACGTGGTAGGTCAGGAACATGTCCTGACGGCGTTAGCCAATGGTCTTTCGTT 62
             |||
Sbjct 33     CTTTGCTGA-GTGGTAGGTCAGGAACATGTCCTGACGGCGTTAGCCAATGGTCTTTCGTT 91

Query 63     AGGCCGTATCCATCATGCTTACCTGTTTTCCGGCACTCGGGCGTAGGCAAGACGACTAT 122
             |||
Sbjct 92     AGGCCGTATCCATCATGCTTACCTGTTTTCCGGCACTCGGGCGTAGGCAAGACGACTAT 151

Query 123    CGCCCGTTTACTGGCGAAAGGGCTGAATTGCGAAACCGGGATCACGGCCACGCCCTGCGG 182
             |||
Sbjct 152    CGCCCGTTTACTGGCGAAAGGGCTGAATTGCGAAACCGGGATCACGGCCACGCCCTGCGG 211

Query 183    CCAGTGCGATACCTGCCGGAAATCGAACAGGGGCGATTTGTCGATCTGATCGAGATCGA 242
             |||
Sbjct 212    CCAGTGCGATACCTGCCGGAAATCGAACAGGGGCGATTTGTCGATCTGATCGAGATCGA 271

Query 243    CGCAGCGTCCCGACCAAAGTGAAGATACCCGCGATCTGCTGGATAACGTGCAATACGC 302
             |||
Sbjct 272    CGCAGCGTCCCGACCAAAGTGAAGATACCCGCGATCTGCTGGATAACGTGCAATACGC 331

Query 303    TCCGGCCCGGGCCGCTTCAAGGTTTACCTGATCGACGAAGTACACATGCTCTCCGCCA 362
             |||
Sbjct 332    TCCGGCCCGGGCCGCTTCAAGGTTTACCTGATCGACGAAGTACACATGCTCTCCGCCA 391

Query 363    CAGCTTCAACGCGTTGCTGAAAACGCTGGAAGAGCCCGCCGCATGTGAAATTCCTGCT 422
             |||
Sbjct 392    CAGCTTCAACGCGTTGCTGAAAACGCTGGAAGAGCCCGCCGCATGTGAAATTCCTGCT 451

Query 423    GGCACCACCGATCCGCAAAGCTGCCGGTGACTAT 458
             |||
Sbjct 452    GGCACCACCGATCCGCAAAGCTGCCGGTGACTAT 487

```

6.2 Φωτογραφικό υλικό



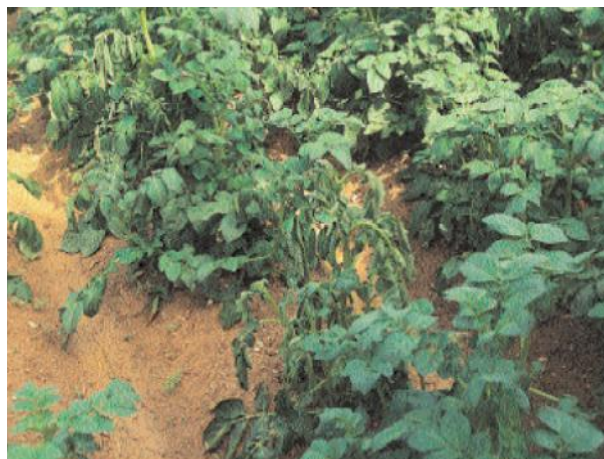
Εικόνα 9. Σήψη εντεριώνης σε στέλεχος πατάτας οφειλόμενη σε προσβολή από το βακτήριο *Erwinia chrysanthemi*



Εικόνα 10. Προσβολή στελέχους και φύλλου φυτού πατάτας οφειλόμενη στο βακτήριο *Pectobacterium carotovorum*



Εικόνα 11. Προσβολή μητρικού κονδύλου από το *Pectobacterium atrosepticum* και ανάπτυξη της σήψης λαιμού



Εικόνα 12. Μάρανση φυτού πατάτας οφειλόμενη σε προσβολή από το *Pectobacterium atrosepticum*



Εικόνα 13. Φυτό πατάτας με συμπτώματα καθολικής μαρανσης και νέκρωσης των φύλλων από φυσικές μολύνσεις του βακτηρίου *Dickeya solani*



Εικόνα 14. Φύλλο πατάτας με συμπτώματα ημιπληγίας από φυσικές μολύνσεις του βακτηρίου *Dickeya solani*



Εικόνα 15. Σύμπτωμα μελάνωσης σε στέλεχος φυτού πατάτας από φυσικές μολύνσεις του βακτηρίου *Dickeya solani*



Εικόνα 16. Μεταχρωματισμός αγγείων του στελέχους σε φυτό πατάτας και σήψη εντεριώνης από προσβολή του βακτηρίου *Dickeya solani*



Εικόνα 17. Σήψη μητρικού κονδύλου από φυσικές μολύνσεις του βακτηρίου *Dickeya solani*



Εικόνα 18. Σύμπτωμα σήψης κονδύλου από φυσικές μολύνσεις του βακτηρίου *Dickeya solani*



Εικόνα 19. Τυπική μαλακή σήψη σε ροδέλες πατάτας από τεχνητές μολύνσεις στους 30 °C με στελέχη του γένους *Dickeya*



Εικόνα 20. Εκτεταμένη μαλακή σήψη σε ροδέλες πατάτας από τεχνητές μολύνσεις στους 35 °C με στελέχη του γένους *Dickeya*



Εικόνα 21. Τυπική μαλακή σήψη σε ροδέλες πατάτας από τεχνητές μολύνσεις με στελέχη του *Dickeya solani*



Εικόνα 22. Τυπική μαλακή σήψη σε ροδέλες πατάτας από τεχνητές μολύνσεις με στελέχη του *Dickeya solani*



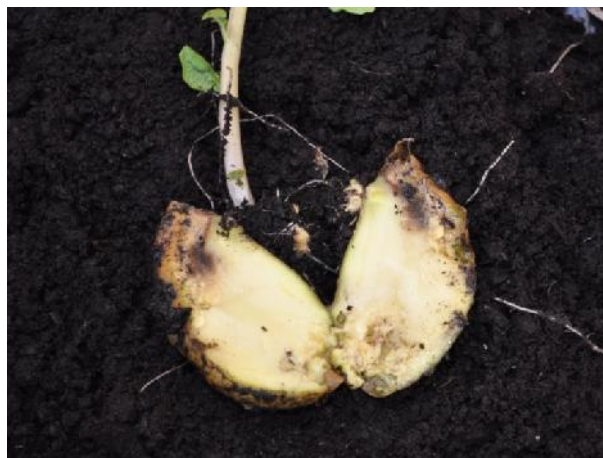
Εικόνα 23. Τεχνητές μολύνσεις σε πατατόσπορους προς φύτευση με όλα τα βακτηριακά στελέχη



Εικόνα 24. Κιτρίνισμα ακραίου μεριστώματος μετά από τεχνητές μολύνσεις σε πατατόσπορο προς φύτευση με στελέχη του γένους *Dickeya*



Εικόνα 25. Μεταφυτρωτική σήψη στελεχών πατάτας από τεχνητές μολύνσεις με στελέχη του βακτηρίου *Dickeya solani*



Εικόνα 26. Μεταφυτρωτική σήψη στελεχών πατάτας από τεχνητές μολύνσεις με στελέχη του γένους *Dickeya*



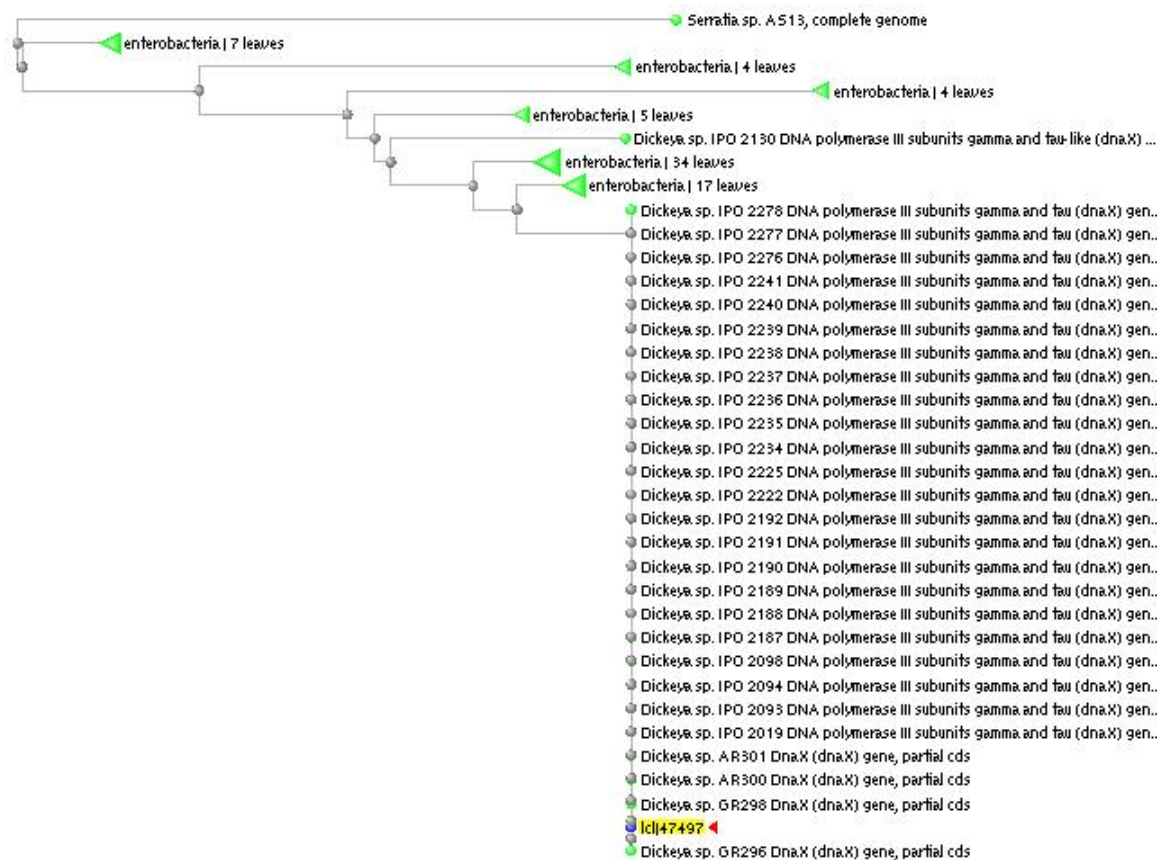
Εικόνα 27. Προφυτρωτική σήψη κονδύλων πατάτας από τεχνητές μολύνσεις με στελέχη του βακτηρίου *Dickeya solani*



Εικόνα 28. Σύμπτωμα μάρανσης σε φυτό τομάτας, από τεχνητές μολύνσεις με στελέχη του βακτηρίου *Dickeya solani*




Εικόνα 29. Συμπτώματα σήψης, πλήρους αποδιοργάνωσης των ιστών και κατάρρευση φυτού τομάτας από τεχνητές μολύνσεις με στελέχη του βακτηρίου *Dickeya solani*



Εικόνα 30. Αντιστοιχία του στελέχους Ds3378 με τα *Dickeya* sp. που είναι κατατεθειμένα στη βάση δεδομένων NCBI

6.4 Poster και περίληψη συμμετοχής στο 25ο Συνέδριο της Ελληνικής Εταιρείας της Επιστήμης των Οπωροκηπευτικών



Ανώτατο Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα Κρήτης
Σχολή Τεχνολογίας Γεωπονίας, Τμήμα Φυτικής Παραγωγής
Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας – Βακτηριολογίας
Τ.Θ. 1939, 71004 Ηράκλειο Κρήτης
email: dqoumas@staff.teicrete.gr


25ο Συνέδριο της Ελληνικής Εταιρείας της Επιστήμης των Οπωροκηπευτικών
 Λεμεσός, 1 - 4 Νοεμβρίου 2011

ΠΡΩΤΗ ΑΝΑΦΟΡΑ ΤΟΥ DICKEYA SP. BIONAR 3 ΩΣ ΠΑΘΟΓΟΝΟΥ ΤΗΣ ΜΕΛΑΝΩΣΗΣ ΤΗΣ ΠΑΤΑΤΑΣ ΣΤΗΝ ΕΛΛΑΔΑ
Δέσποινα Σταύρου, Μαριάνθη Παγουλάτου, Παναγιώτης Σαρρής, Εμμανουήλ Τραντάς, Φίλιππος Βερβερίδης & Δημήτρης Γκούμας

• Η ΑΙΘΗΣΙΑ: Την άνοιξη του 2009 & 2010 παρατηρήθηκαν σημαντικές βακτηριολογικές προσβολές σε καλλιέργειες πατάτας (*Solanum tuberosum* L., cv 'Spruta'), στην περιοχή της Μεσοαρίας στην Κρήτη. Τα ασθενή φυτά παρουσίαζαν μείλνωση & σήση στη βάση των στελεχών, κοστανό μέχρι μέρη μετακρωματισμό των αγγείων & της εντερμόνης, μαλακή σήση των μητρικών και των θυγατρικών κονδύλων & τελικά μείλνωση και νέκρωση (Εικόνα 1). Το 2009 στη προσβολή συμμετείχαν από 5-20%, ενώ σε δύο καλλιέργειες, συνολικής έκτασης 20 στρεμμάτων, ήταν μεγαλύτερο του 50%. **Σκοπός της εργασίας:** Ο χαρακτηρισμός του παθογόνου αίτιου της ασθένειας της μείλνωσης του στελέχους της πατάτας στην Κρήτη.

• ΠΑΘΟΓΟΝΟ: Απομόνωση & Ταυτοποίηση. Πραγματοποιήθηκαν απομονώσεις σε άφρακτα υποστρώματα CVP (Crystal Violet Pectate) και NAG (Nutrient Agar Glucose), από αντιπροσωπευτικά δείγματα φυτών πατάτας με συμπτώματα μείλνωσης του στελέχους και από κονδύλους πατάτας με μαλακή σήση. Αποικίες με τον χαρακτηριστικό φαινότυπο απενόωσης (CVP) ή/και «πιγανιού αινού» (NAG) μετατρανσφίθηκαν και ελέγχθηκε η καθαριότητά τους. Είκοσι απομονώσεις, προκαταρκτικά, ταυτοποιήθηκαν ως *Dickeya* spp. (syn. *Erwinia chrysanthemi*, *Pectobacterium chrysanthemi*). Οι απομονώσεις, ήταν κατά Gram αρνητικές, προαιρετικά αναερόβιες, αρνητικές στην παραγωγή οξείδωσης, αναπτύσσονταν στους 37°C, ήταν ευαίσθητες στην ερυθρομυκίνη (15μg), παρήγαγαν φουραζολιδία και ινδόλη, δεν παρήγαγαν οξύ από α-μεθυλ-γλυκοζίδιο ή τρεχαλιδίνη, ενώ προκάλεσαν μαλακή σήση σε ροδέλες κονδύλων πατάτας. Έξι από τις απομονωθέντα στελέχη του παθογόνου εξετάστηκαν αναλυτικότερα και ταυτοποιήθηκαν ως βιοσουλιά 3 του *Dickeya* spp. (Πίνακας 1 & Εικόνα 2). Επιπλέον, τα στελέχη αυτά βιοχημικά βρέθηκαν να είναι πανομοιότυπα με το αλλαντικό στελέχος αναφοράς *Dickeya* sp. (IPO 2222), ενώ διαφοροποιούνται από το ελληνικό στελέχος αναφοράς του *Dickeya dianthicola* (BPIC 2098) από πατάτα. Η εφαρμογή των μοριακών δεκτών BOX and ERIC, για τη μοριακή ταυτοποίηση στελεχών του παθογόνου βακτηρίου, έδειξε την πλήρη ταύτητά τους με το στελέχος αναφοράς (IPO 2222), καθώς εμφανίζουν πανομοιότυπο πρότυπο ζώνωσης (μοριακά αποτυπώματα), ενώ τα διαφοροποιούν από τα συγγενικά βακτηριακά στελέχη των *Dickeya dianthicola* (BPIC 2098), *Pectobacterium carotinarum* (TEIC 3936), *Pectobacterium atrosepticum* (TEIC 3311), που εξετάστηκαν συγκριτικά (Εικόνα 3).


ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΟΛΟΓΙΑ (ΕΙΚΟΝΑ)



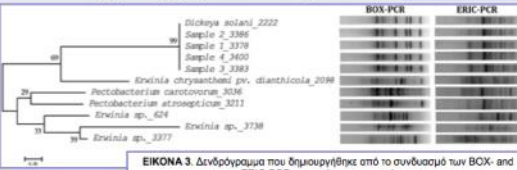
ΠΙΝΑΚΑΣ 1. Ταυτοποίηση απομονώσεων από ασθενή φυτά πατάτας									
ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ	Απομόνωση από στελέχος	Βιοσουλιά	Βιοσουλιά	Απομόνωση από κονδύλο	Απομόνωση από κονδύλο	Απομόνωση από κονδύλο	Απομόνωση από κονδύλο	Απομόνωση από κονδύλο	Απομόνωση από κονδύλο
Απομόνωση 1	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Απομόνωση 2	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Απομόνωση 3	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Απομόνωση 4	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Απομόνωση 5	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Απομόνωση 6	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Απομόνωση 7	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Απομόνωση 8	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Απομόνωση 9	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Απομόνωση 10	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Απομόνωση 11	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Απομόνωση 12	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Απομόνωση 13	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Απομόνωση 14	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Απομόνωση 15	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Απομόνωση 16	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Απομόνωση 17	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Απομόνωση 18	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Απομόνωση 19	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Απομόνωση 20	+	+	+	+	+	+	+	+	+

• ΔΟΚΙΜΕΣ ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑΣ: Ο έλεγχος της παθογένειας των απομονώσεων της πατάτας πραγματοποιήθηκε με τεχνητές μολύνσεις σε φυτά και κονδύλους πατάτας (cv. Spruta) είτε με έκχυση 20μl βακτηριακού αιωρήματος (10⁷ cfu/ml⁻¹) είτε με την ενανόθεση μολύσματος με τη μέθοδο της οδοντογλυφίδας στο στελέχος ή στον κόνδυλο. Σε διάστημα 2- 10 ημερών εκδηλώθηκαν τα τυπικά συμπτώματα της ασθένειας (Εικόνα 4). Με παρόμοια μεθοδολογία, τεχνητές μολύνσεις πραγματοποιήθηκαν σε φυτά: τομάτες, πεπόνια, μπιζνίτσες, χροσάνθησος, γαρφαλάκι, καλαγχόη, αλεξανδρινό και σε κερπιάς τομάτες ή φύλλα σπανάκι. Σε όλες τις περιπτώσεις το κόρυμ σήματμα που εκδηλώθηκε ήταν η σήση των εμβολιασμένων ιστών. Τα στελέχη που απονευμονώθηκαν από τα τεχνητά μολυσμένα φυτά, φύλλα, κονδύλους ή κερπιάς εμφανίζουν όμοιο βιοχημικό προφίλ και μοριακά αποτυπώματα με τα βακτηριακά στελέχη των τεχνητών μολύνσεων.

ΕΙΚΟΝΑ 2. Δοκιμές ταυτοποίησης απομονώσεων από ασθενή φυτά πατάτας.



ΕΙΚΟΝΑ 3. Δενδρόγραμμα που δημιουργήθηκε από το συνδυασμό των BOX- and ERIC-PCR μοριακών αποτυπώματων.



ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ: Με βάση τα μορφολογικά, βιοχημικά, φυσιολογικά και μοριακά φαινότυπα αλλά και την παθογένεια των βακτηριακών στελεχών που απομονώθηκαν από τους προσβεβλημένους ιστούς της πατάτας, προκύπτει ότι το βακτήριο *Dickeya* sp., biovar 3 αποτελεί το παθογόνο αίτιο της ασθένειας. Η εργασία αυτή αποτελεί την πρώτη αναφορά του βακτηρίου (*Dickeya* sp., biovar 3) ως παθογόνου αίτιου της μείλνωσης του στελέχους της πατάτας στην Ελλάδα, υποδεικνύοντας τη διάδοση του παθογόνου με το πολλαπλασιαστικό υλικό από την Ολλανδία, όπου αρχικά διαπιστώθηκε το 2004. Η περαιτέρω διασπορά του παθογόνου θα μπορούσε να είχε απρόβλεπτες οικονομικές συνέπειες στην παραγωγή πατάτας στην Ελλάδα, αφού περιλαμβάνει ιδιαίτερα μολυσματικά στελέχη, που αναπτύσσονται σε σχετικά υψηλές θερμοκρασίες. Τα τελευταία πέντε χρόνια το βακτήριο προκάλεσε ετήσιες απώλειες €30M στην παραγωγή πολλαπλασιαστικού υλικού στην Ολλανδία (Toth *et al.*, 2011).

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ: Γκούμας Δ., Παγουλάτου Μ., Σαρρής Π., Τραντάς Ε., Βερβερίδης Φ. & Γκούμας Δ., 2011. *Dickeya solani*: Μια αναδυόμενη απειλή για την καλλιέργεια της πατάτας, Γεωργία - Κτηνοτροφία, 6, 98-104.
 Γκούμας Δ., Αναλιμάς Α., Τραντάς Ε., Μπαλδάνος Ν. & Ροδόπουλος Ν., 2001. Τεχνικές Οδούς Απομόνωσης και Έμφανση της Πρώτης Εμφάνισης απόδοσης Δ. Γκούμας, ΠΕΤ/Μελέτης, Ηράκλειο, Κρήτης, σελ. 98 (ISBN: 960-87112-0-7).
 Lapidis J., Haniotaki A., Ntougas S., Papanikolaou M., Velias V., Galletti L. and Pithonchou N., 2010. Symptoms and yield reduction caused by *Dickeya* spp. strains isolated from potato and river water in Greece. *European Journal of Plant Pathology* **128**, 249-42. doi:10.1007/s10998-009-9537-9.
 Steukamp M., van Beckhoven J., Sprengel J., Czaplinski R., Grabe G. van der Wolf J., 2009. Biochemical and genetical analysis reveal a new clade of biovar 3 *Dickeya* spp. strains isolated from potato in Europe. *European Journal of Plant Pathology* **125**, 249-281. doi:10.1007/s10998-009-9479-2.
 Toth K., van der Wolf M., Soodler G., Lobjecka E., Velias V., Pithonchou N., Tarr P., Larkins, L. 2011. *Dickeya* species: an emerging problem for potato production in Europe. *Plant Pathology* **60**(3), 385-399. doi:10.1111/j.1365-3059.2011.02427.x

PP-142

ΠΡΩΤΗ ΑΝΑΦΟΡΑ ΤΟΥ *Dickeya* sp. ΒΙΟVAR 3 ΩΣ ΠΑΘΟΓΟΝΟΥ ΤΗΣ ΜΕΛΑΝΩΣΗΣ ΤΗΣ ΠΑΤΑΤΑΣ ΣΤΗΝ ΕΛΛΑΔΑ

Π. Σαρρής, Ε. Τραντάς, Μ. Παγουλάτου, Δ. Σταύρου, Φ. Βερβερίδης & Δ. Γκούμας

Σχολή Τεχνολογίας Γεωπονίας, Τμήμα Φυτικής Παραγωγής, ΤΕΙ Κρήτης, 71004 Ηράκλειο

Την άνοιξη του 2009 και του 2010 παρατηρήθηκαν σημαντικές βακτηριολογικές προσβολές σε καλλιέργειες πατάτας *Solanum tuberosum* L. (ποικ. 'Sprunta'), στην πεδιάδα της Μεσσαράς στην Κρήτη. Τα ασθενή φυτά παρουσίαζαν συμπτώματα μελάνωσης και σήψης στη βάση των στελεχών, καστανού μεταχρωματισμού των αγγείων, μάρανσης και μαλακή σήψη των μητρικών και των θυγατρικών κονδύλων της πατάτας. Το ποσοστό της προσβολής κυμαινόταν από 5-20%, ενώ σε δύο καλλιέργειες, συνολικής έκτασης 20 στρεμμάτων, ήταν μεγαλύτερο του 50%. Σκοπός της εργασίας ήταν ο χαρακτηρισμός του παθογόνου αιτίου της ασθένειας της μελάνωσης του στελέχους της πατάτας. Απομονώσεις πραγματοποιήθηκαν σε θρεπτικά υποστρώματα CVP (Crystal Violet Pectate) και NAG (Nutrient Agar Glucose), από αντιπροσωπευτικά δείγματα φυτών πατάτας με συμπτώματα μελάνωσης του στελέχους και από κονδύλους πατάτας με μαλακή σήψη. Αποικίες με το χαρακτηριστικό φαινότυπο ηκτινολύσης (CVP) ή/και «τηγανιτού αυγού» (NAG) μεταφτεύθηκαν και ελέγχθηκε η καθαρότητά τους. Είκοσι απομονώσεις, προκαταρκτικά, ταυτοποιήθηκαν ως *Dickeya* spp. (συν. *Erwinia chrysanthemi*, *Pectobacterium chrysanthemi*). Οι απομονώσεις, ήταν κατά Gram αρνητικές, προαιρετικά αναερόβιες, αρνητικές στην παραγωγή οξειδάσης, αναπτύσσονταν στους 37°C, ήταν ευαίσθητες στην ερυθρομυκίνη (15 µg), παρήγαγαν φωσφατάση και ινδόλη, δεν παρήγαγαν οξύ από α-μεθυλ-γλυκοζίδιο ή τρεχαλόζη, ενώ προκάλεσαν μαλακή σήψη σε ροδέλες κονδύλων πατάτας. Έξι από τα απομονωθέντα στελέχη του παθογόνου εξετάστηκαν αναλυτικότερα και ταυτοποιήθηκαν ως βιοποικιλία 3 του *Dickeya* spp. Επιπλέον, τα στελέχη αυτά βιοχημικά βρέθηκαν να είναι πανομοιότυπα με το ολλανδικό στέλεχος αναφοράς *Dickeya* sp. (IPO 2222), ενώ διαφοροποιούνται από το ελληνικό στέλεχος αναφοράς του *Dickeya dianthicola* (BPIC 2098). Η εφαρμογή των μοριακών δεικτών BOX και ERIC, για τη μοριακή ταυτοποίηση στελεχών του παθογόνου βακτηρίου, έδειξε την πλήρη ταύτισή τους με το στέλεχος αναφοράς (IPO 2222), καθώς εμφάνισαν πανομοιότυπο πρότυπο ζώνωσης (μοριακό αποτύπωμα), ενώ τα διαφοροποιεί σαφώς από τα συγγενικά βακτηριακά στελέχη των *Dickeya dianthicola* (BPIC 2098), *Pectobacterium carotovorum* (TEIC 3936), *Pectobacterium atrosepticum* (TEIC 3311), που εξετάστηκαν συγκριτικά. Η παθογένεια των στελεχών ελέγχθηκε με τεχνητές μολύνσεις σε φυτά και κονδύλους πατάτας. Σε διάστημα 2-5 ημερών εκδηλώθηκαν τα τυπικά συμπτώματα της ασθένειας. Τα στελέχη που επαναπομονώθηκαν από τα τεχνητά μολυσμένα φυτά εμφάνισαν όμοιο βιοχημικό προφίλ και μοριακό αποτύπωμα με τα βακτηριακά στελέχη των τεχνητών μολύνσεων. Η εργασία αυτή αποτελεί την πρώτη αναφορά του βακτηρίου (*Dickeya* sp., biovar 3) ως παθογόνου αιτίου της μελάνωσης του στελέχους της πατάτας στην Ελλάδα, υποδεικνύοντας τη διάδοση του παθογόνου με το πολλαπλασιαστικό υλικό από την Ολλανδία, όπου αρχικά διαπιστώθηκε το 2004. Η περαιτέρω διασπορά του παθογόνου θα μπορούσε να είχε απρόβλεπτες οικονομικές συνέπειες στην παραγωγή πατάτας στην Ελλάδα, αφού περιλαμβάνει ιδιαίτερα μολυσματικά στελέχη, που αναπτύσσονται σε σχετικά υψηλές θερμοκρασίες.

6.5 Δημοσίευση στο περιοδικό Γεωργία και Κτηνοτροφία

ΑΦΙΕΡΩΜΑ: Η καλλιέργεια της πατάτας

Βακτήριο *Dickeya solani****Dickeya solani*: Μια αναδυόμενη απειλή για την καλλιέργεια της πατάτας**

Δέσποινα Σταύρου, Μαριάνθη Παγουλάτου, Παναγιώτης Σαρρής, Εμμανουήλ Τραντάς, Φίλιππος Βερβερίδης & Δημήτρης Γκούμας

Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα Κρήτης, Σχολή Τεχνολογίας Γεωπονίας, Τμήμα Φυτικής Παραγωγής, Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας – Βακτηριολογίας Email: dgoumas@staff.teicrete.gr

- Τα τελευταία έξι χρόνια, εμφανίστηκε ένα νέο παθογόνο βακτήριο (*Dickeya solani*) το οποίο φαίνεται να αποτελεί μια αναδυόμενη απειλή για την καλλιέργεια της πατάτας, μετά τη διασπορά του με το πολλαπλασιαστικό υλικό σε πολλές χώρες της Ευρώπης. Το νέο παθογόνο προκαλεί συμπτώματα παρόμοια με εκείνα της ασθένειας «μελάνωση του λαιμού της πατάτας», όπως μαύρισμα στη βάση του στελέχους του φυτού, που έρχεται σε επαφή με το έδαφος και λίγο ψηλότερα, μαράνσεις και νεκρώσεις φύλλων, στελεχών ή/και ολόκληρων φυτών σπανιότερα, αλλά και μαλακή σήψη των κονδύλων της πατάτας. Σε αντίθεση με τα άλλα γνωστά παθογόνα της ασθένειας «μελάνωση του λαιμού της πατάτας» τα οποία ευνοούνται από σχετικά χαμηλές θερμοκρασίες (15°C), το νέο παθογόνο έχει προσαρμοστεί σε περιοχές που επικρατούν υψηλότερες θερμοκρασίες (> 25°C) και στις οποίες επιπλέον εμφανίζεται να είναι πιο μολυσματικό, πιθανά λόγω της ιδιαίτερης ικανότητάς του να κινείται ταχύτερα στα αγγεία του φυτού.

Για το νέο παθογόνο βακτήριο έχει προταθεί η δόκιμη ονομασία *Dickeya solani*. Πρόκειται για συγγενικό είδος του βακτηρίου *Dickeya dianthicola*, μέχρι πρόσφατα γνωστού ως *Erwinia chrysanthemi* pv. *dianthicola*, το οποίο από τη δεκαετία του 1970, σποραδικά προκαλεί προβλήματα στην καλλιέργεια της πατάτας σε διάφορες χώρες της Ευρώπης. Στην Ελλάδα το *Dickeya dianthicola* έχει απομονωθεί από τα εργαστήρια Βακτηριολογίας του Μπενάκειου Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου και της Σχολής Τεχνολογίας Γεωπονίας του ΤΕΙ Κρήτης από πατάτα, τομάτα και διάφορα ανθοκομικά φυτά (γαρυφαλλιά, ντάλια, κ.α.). Όμως, τα τελευταία χρόνια ένα νέο πιο μολυσματικό είδος/στέλεχος του γένους *Dickeya* spp. έχει εγκατασταθεί σε καλλιέργειες πατάτας σε διάφορες ευρωπαϊκές χώρες όπως το Βέλγιο, τη Φιλανδία, τη Γαλλία, την Ολλανδία, την Ισπανία, την Αγγλία, την Πολωνία αλλά και πρόσφατα το Ισραήλ. Πρόκειται για ένα πολύ πιο μολυσματικό βακτήριο σε σχέση με τα άλλα είδη του γένους *Dickeya* spp. (*dianthicola*, *zeae*, *dadantii*) και του *Pectobacterium atrosepticum* (συν., *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*) ή του *Pectobacterium carotovorum* (συν., *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*) που εμπλέκονται ως παθογόνα αίτια, στην ασθένεια «μελάνωση της πατάτας» ή παρεμφερούς συμπτωματολογίας ασθνειών του φυτού. Το βακτήριο *Pectobacterium atrosepticum* αποτελεί το πιο συνηθισμένο παθογόνο αίτιο της ασθένειας «μελάνωση του λαιμού της πατάτας», η οποία εκδηλώνεται συνήθως σε συνθήκες υψηλής υγρασίας και σχετικά χαμηλών θερμοκρασιών (15°C) κυρίως στις βόρειες χώρες της Ευρώπης. Αντίθετα, το νέο παθογόνο (*Dickeya solani*) έχει προσαρμοστεί σε περιοχές που επικρατούν υψηλότερες

θερμοκρασίες (> 25°C) και στις οποίες επιπλέον εμφανίζεται να είναι πιο μολυσματικό, πιθανά λόγω της ιδιαίτερης ικανότητάς του να κινείται ταχύτερα στα αγγεία του φυτού. Η εμπειρία μέχρι σήμερα δείχνει ότι, όταν το παθογόνο αυτό εγκατασταθεί σε μια περιοχή γρήγορα εκτοπίζει τα άλλα συγγενικά του είδη και είναι αυτό που επικρατεί ως το κύριο παθογόνο στις ασθένειες των οποίων η συμπτωματολογία συνδέεται με τη μελάνωση του λαιμού αλλά και γενικότερα με μαράνσεις και με νεκρώσεις φυτών σε καλλιέργειες πατάτας. Η διασπορά του παθογόνου με το πολλαπλασιαστικό υλικό έχει κατά πολύ αυξήσει το ποσοστό 25%, που αναλογούσε μέχρι πρόσφατα σε βακτήρια του γένους *Dickeya* spp. σε σχέση με το σύμπτωμα της μελάνωσης του λαιμού.

Οι άμεσες απώλειες στην παραγωγή πατατόσπορου στην Ολλανδία το 2008 έφτασαν στο ποσό των 30 εκατ. €, από πέντε εκατ. € το 2002, λόγω της υποβάθμισης ή/και της απόρριψης, ποσοστού μεγαλύτερου του 20% της παραγωγής, κατά τη διαδικασία πιστοποίησης, λόγω της ασθένειας της μελάνωσης. Στο Ισραήλ το ποσοστό μάρανσης των φυτών σε καλλιέργειες πατάτας εκτιμήθηκε να κυμαίνεται από 2-30% των φυτών, ενώ η εκδήλωση μαλακής σήψης στους νέους θυγατρικούς κονδύλους μετά από φύτευση μολυσμένου πολλαπλασιαστικού υλικού εκτιμήθηκε μέχρι 30%. Επίσης, στο Ισραήλ, σημειώθηκε μείωση της παραγωγής κατά 20-25% σε καλλιέργειες πατάτας όταν το ποσοστό εμφάνισης της ασθένειας ήταν μεγαλύτερο του 15%. Στη Δανία οι απώλειες εκτιμήθηκαν σε 10 τόνους ανά εκτάριο (10 στρέμματα) στη διάρκεια μιας καλλιεργητικής περιόδου. Αν και για την Ελλάδα δεν υπάρχουν μετρήσιμες

ΑΦΙΕΡΩΜΑ: Η καλλιέργεια της πατάτας



Βακτήριο *Dickeya solani*

Εκδήλωση της ασθένειας στο χωράφι 1

Φυτό πατάτας με έντονα συμπτώματα προσβολής 1



Γεωργία - Κτηνοτροφία, τεύχος 6/2011

99

ΑΦΙΕΡΩΜΑ: Η καλλιέργεια της πατάτας

Βακτήριο *Dickeya solani*

Συμπτώματα μερικής (ημιπληγία) ή καθολικής μάρανσης - ξήρανσης των φύλλων εξαιτίας προσβολής από το βακτήριο.



εκτιμήσεις για πιθανές απώλειες στην παραγωγή, από μελέτη που βρίσκεται σε εξέλιξη τα δεδομένα πιστοποιούν την εμφάνιση του παθογόνου σε καλλιέργειες πατάτας τουλάχιστον στην Κρήτη.

Τα συμπτώματα στο χωράφι είναι παρόμοια με εκείνα της μελάνωσης, που προκαλούνται από το *Pectobacterium atrosepticum*, αν και μπορεί να εμφανίζονται χρονικά, αργότερα κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας, ενώ συνήθως εκδηλώνονται όταν η θερμοκρασία έχει αυξηθεί. Συχνά, σε συνθήκες χαμηλής υγρασίας και υψηλής θερμοκρασίας, η μάρανση των φυτών είναι πολύ γρήγορη και συνοδεύεται από εκτεταμένη μαύρη, μαλακή σήψη και νέκρωση των εσωτερικών ιστών των στελεχών, ενώ η περιοχή της εντεριόνης μπορεί να εμφανίζεται κενή (κούφια). Συμπερασματικά φαίνεται ότι η ασθένεια που προκαλείται από το *Dickeya* spp., σε ζεστές και υγρές συνθήκες, οδηγεί συνήθως σε σήψη στελέχους με συμπτώματα παρόμοια με εκείνα του

P. atrosepticum, ενώ σε χαμηλότερα επίπεδα υγρασίας, παρατηρείται περιορισμένη σήψη, που όμως συνοδεύεται με μάρανση, με αυξημένη νέκρωση των φύλλων, καστανό μεταχρωματισμό του στελέχους, καθώς επίσης και από κούφιο στέλεχος. Τα συμπτώματα στους κονδύλους φαίνεται να μην διαφοροποιούνται από εκείνα του *P. atrosepticum* και μπορεί να κυμαίνονται μεταξύ της εμφάνισης ενός ασθενούς καστανού μεταχρωματισμού του αγγειακού ιστού και της σήψης και της πλήρους αποδιοργάνωσής του. Στα όρια των σηπόμενων ιστών συχνά αναπτύσσονται καστανές μέχρι μαύρες χρωστικές, που συνήθως οριοθετούν την προσβολή. Η αρχική προσβολή στους κονδύλους ξεκινά από τα φακίδια, από τη θέση πρόσφυσης του στολόνιου ή από πληγή ενώ η προκαλούμενη σήψη χαρακτηρίζεται ως εντονότερη, ταχύτερη και δριμύτερη σε σχέση με εκείνη που προκαλεί το *P. atrosepticum*. Τα παραπάνω συμπτώματα αλλά και ο έντονος καστανόμαυρος μεταχρωματισμός του αγγειακού ιστού ξεκινούν πάντα από το μολυσμένο μητρικό κόνδυλο, ο οποίος συνήθως σήπεται ως μη όφειλε. Στην περίπτωση που η προσβολή εκδηλωθεί πριν ή αμέσως μετά τη βλάστηση των φύτρων των κονδύλων, παρατηρείται έντονη ανομοιομορφία στο φύτερωμα. Τα νεαρά στελέχη συχνά αποκτούν σκούρο πράσινο χρώμα, σταδιακά γίνονται χλωρωτικά, μαραίνονται και εμφανίζουν το σύμπτωμα της μελάνωσης στο λαιμό.

Σύγχυση των συμπτωμάτων της ασθένειας στο υπέργειο τμήμα του φυτού μπορεί να γίνει με εκείνα άλλων ασθενειών (αδρομυκώσεις, αδροβακτηριώσεις) που εκδηλώνονται με μαράνσεις, ιδιαίτερα σε ξηροθερμικές συνθήκες (*Verticillium dahliae*), ενώ η προσβολή στους κονδύλους μερικές φορές μπορεί να μοιάζει με εκείνες της καστανής (*Ralstonia solanacearum*) και της δακτυλιωτής σήψης της πατά-



ΑΦΙΕΡΩΜΑ: Η καλλιέργεια της πατάτας (*Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*). Τα συμπτώματα μπορεί να ποικίλουν ανάλογα με την ευπάθεια ή την αντοχή της ποικιλίας, τη στράγγιση του εδάφους, τις επικρατούσες καιρικές συνθήκες (υγρασία, θερμοκρασία), την παρουσία αλλά και τη συγκέντρωση και την ταχύτητα αποικισμού και διάσποράς του παθογόνου στον αγγειακό ιστό του φυτού. Για την πρόκληση μόλυνσης φαίνεται να απαιτούνται σημαντικά μικρότερες συγκεντρώσεις του βακτηρίου σε σχέση με άλλα συγγενικά παθογόνα. Την εκ-

Συμπτώματα μεταχρωματισμού αγγείων και νέκρωσης εντεριώνης, αρχικό στάδιο και προχωρημένα στάδια



ΑΦΙΕΡΩΜΑ: Η καλλιέργεια της πατάτας

Βακτήριο *Dickeya solani*

Το σύμπτωμα της μελάνωσης του λαιμού



δήλωση της ασθένειας υποβοηθούν η πρόκληση πληγών κατά τη συγκομιδή και τις άλλες εργασίες, η υπερβολική υγρασία του εδάφους λόγω υπεράρδευσης κλπ. Μερικές φορές η μάρανση μπορεί να εκδηλωθεί χωρίς την εμφάνιση του συμπτώματος της μελάνωσης στο λαιμό των στελεχών, ενώ εκτιμάται ότι ποσοστό μεγαλύτερο του 20% των φυτών μπορεί να εμφανίσει μάρανση σε περίπτωση που ο «πατατόσπορος» είναι μολυσμένος με το βακτήριο. Συχνά η εκδήλωση της ασθένειας, ιδιαίτερα στις βόρειες ευρωπαϊκές χώρες, φαίνεται να συνδέεται με τη γενικότερη αλλαγή του κλίματος, την αύξηση της θερμοκρασίας και τις ηπιότερες, (πιο ξηροθερμικές), συνθήκες που επικρατούν τα τελευταία χρόνια στις περιοχές αυτές. Η θερμοκρασία αποτελεί τον πιο καθοριστικό παράγοντα αφού το *D. solani*, αναπτύσσεται σε υψηλές θερμοκρασίες μέχρι και 39°C στις οποίες εμφανίζεται πιο μολυσματικό σε σχέση με το *Pectobacterium atrosepticum* και το *Dickeya dianthicola* που αποτυγχάνουν να προκαλέσουν ασθένεια σε αυτές τις συνθήκες. Το παθογόνο αποτελεί μια νέα απειλή τόσο για τη σποροπαραγωγική, αλλά και για την καλλιέργεια πατάτας για φαγητό. Διασπείρεται σε μεγάλες αποστάσεις και ανάμεσα στα κράτη κυρίως με το μολυσμένο πολλαπλα-

σιαστικό υλικό (κόνδυλος/πατατόσπορος με λανθάνουσες μολύνσεις), τα επιφανειακά νερά (ποτάμια, πηγάδια κλπ) και τα μηχανήματα. Το παθογόνο μεταφέρεται εξωτερικά στην επιφάνεια των κονδύλων, προστατεύεται στα φακίδια, αλλά συνήθως βρίσκεται εσωτερικά, στο αγγειακό σύστημα του κονδύλου, στο οποίο εισέρχεται διασυστηματικά δια μέσου του στολονίου από το προσβεβλημένο μητρικό φυτό ή δια μέσου των ριζών και σταδιακά αποικίζει το φυτό μέσω του αγγειακού του ιστού. Το βακτήριο δεν φαίνεται να επιβιώνει στο έδαφος για μεγάλο χρονικό διάστημα.

Η αντιμετώπιση της ασθένειας είναι πολύ δύσκολη και ουσιαστικά περιορίζεται στη χρησιμοποίηση υγιούς πολλαπλασιαστικού υλικού το οποίο να έχει προκύψει μέσα από ένα αυστηρό σύστημα πιστοποίησης. Τα επίπεδα ανο-



ΑΦΙΕΡΩΜΑ: Η καλλιέργεια της πατάτας

Σήψη μητρικού κονδύλου, μεταφυτρωτική σήψη των φύτερων και σήψη και αποδιοργάνωση των θυγατρικών κονδύλων, εξαιτίας προσβολής από το βακτήριο



Βακτήριο *Dickeya solani*



χής στην εμφάνιση του συμπτώματος της μελάνωσης μετά από μακροσκοπικό έλεγχο, κατά τη διαδικασία παραγωγής του «πατατόσπορου», ποικίλουν ανάμεσα στις ευρωπαϊκές χώρες και κυμαίνονται από 0 μέχρι και 4%, ανάλογα με το επίπεδο πιστοποίησής του (Πίνακας 1). Σε κάθε περίπτωση ανεξάρτητα από την αυστηρότητα της διαδικασίας οι λανθάνουσες μόλυνσεις είναι δυνατόν να διαφεύγουν της διαδικασίας αυτής. Η χρησιμοποίηση απολυμασμένων μηχανημάτων, εργαλείων και μέσων καλλιέργειας, συλλογής, αποθήκευσης και εμπορίας φαίνεται ότι αποτελεί σημαντικό παράγοντα στην αποφυγή δημιουργίας νέων εστιών μόλυνσης ή διασποράς του παθογόνου. Άλλες πηγές μόλυνσης μπορεί να παίζουν σημαντικό ρόλο για την

ανάπτυξη της ασθένειας, όπως τα μολυσμένα φυτικά υπολείμματα, τα φυτά εθελοντές, οι εναλλακτικοί ξενιστές είτε πρόκειται για ζιζάνια είτε για άλλα καλλιεργούμενα φυτά, το νερό άρδευσης, τα αερολύματα ή/και τα έντομα.

Αν αναλογιστούμε ότι περίπου το 80% του απαιτούμενου στη χώρα μας πατατόσπορου εισάγεται από τις χώρες, όπου τα τελευταία χρόνια το βακτήριο *Dickeya solani* δημιουργεί σημαντικά προβλήματα, σε συνδυασμό με το γεγονός ότι μεταφέρεται κυρίως με τον πατατόσπορο αλλά και το γεγονός ότι οι ξηροθερμικές κλιματολογικές συνθήκες στη χώρα μας είναι ιδανικές για το παθογόνο, η μαζική εισαγωγή μολυσμένου πολλαπλασιαστικού υλικού με λανθάνουσα ή μη μόλυνση από το βακτήριο μπορεί να

ΑΦΙΕΡΩΜΑ: Η καλλιέργεια της πατάτας

Βακτήριο *Dickeya solani*Αποικίες, σε καλλιέργεια του βακτηρίου *Dickeya* sp., με εμφάνιση τηγανητού αυγού.

Πίνακας 1: Επίπεδα ανοχής, κατά τις επισκοπήσεις (μακροσκοπικός έλεγχος), στην ασθένεια μελάνωση της πατάτας (από *P. atrosepticum*, *P. carotovorum* ή *Dickeya* spp.) κατά τη διαδικασία παραγωγής «πατατόσπορου» σε χώρες της Ευρώπης (προσαρμογή από βιβλιογραφική πηγή 3)

Χώρα	Προβασικός	Βασικός	Πιστοποιημένος
Βέλγιο	0	0	0,3-0,6
Φιλανδία	0	0-0,5	1,0-2,0
Γαλλία	0	0-0,5	1,0
Γερμανία	0	0,2-0,5	1,2
Ολλανδία	0	0	0,03-0,1
Πολωνία	0-1,0	1,0-2,0	3,0-4,0
Αγγλία & Ουαλία	0	0,25-1,0	2,0
Σκωτία (<i>Pectobacterium</i> spp.)	0	0,25-1,0	Δεν φυτεύεται
UK (Σκωτία) <i>Dickeya</i> spp.	0	0	Δεν φυτεύεται

οδηγήσει σε απρόβλεπτες απώλειες στην παραγωγή.

Στο Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας-Βακτηριολογίας του ΤΕΙ Κρήτης, τα τρία τελευταία χρόνια, έχουν απομονωθεί, επανειλημμένα, βακτήρια του γένους *Dickeya* spp. από καλλιέργειες πατάτας στην πεδιάδα της Μεσσαράς και στις περιοχές Αγίας Βαρβάρας, Βενεράτου κ.α. στο νομό Ηρακλείου. Φυτά πατάτας που προσκομίστηκαν στο εργαστήριο ή συλλέχθηκαν από προσβεβλημένες καλλιέργειες συνήθως εμφάνιζαν την παραπάνω περιγραφείσα συμπτωματολογία σε έντονη μορφή. Σύμφωνα με τους καλλιεργητές οι απώλειες ήταν μεγαλύτερες του 50% της αναμενόμενης παραγωγής σε δύο τουλάχιστον καλλιέργειες, έκτασης περίπου 20 στρεμμάτων. Σε σχετική μελέτη που βρίσκεται σε εξέλιξη, στα δυο εμπλεκόμενα εργαστήρια του τμήματος Φυτικής Παραγωγής (εργ. Φυτοπαθολογίας, και εργ. Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας Φυτών), όλα τα βακτηριακά στελέχη που απομονώθηκαν τα τελευταία χρόνια από ασθενή φυτά πατάτας από την Κρήτη βρέθηκαν κατά τον βιοχημικό αλλά και το μοριακό προσδιορισμό τους να είναι ταυτόσημα με τα στελέχη του παθογόνου που απομονώνονται σε άλλες ευρωπαϊκές χώρες και ιδιαίτερα στην Ολλανδία, δηλαδή χαρακτηρίστηκαν ως μέλη του πιθανά νέου είδους

Dickeya solani. Στις περιπτώσεις όπου παρατηρούνται από καλλιεργητές παρόμοια συμπτώματα σε καλλιέργειες πατάτας θα πρέπει να έρχονται άμεσα σε επαφή με το εργαστήριο Φυτοπαθολογίας για τη διερεύνηση της κάθε περίπτωσης. Καλό είναι να γίνει αντιληπτό ότι, τα συμπτώματα από μόνα τους δεν αρκούν πάντα για να τον προσδιορισμό της αιτίας, που τα προκάλεσε αφού όμοια ή σχετικά παρόμοια συμπτώματα μπορεί να προκληθούν από τελείως διαφορετικά παθογόνα αίτια. Το *Dickeya solani* είναι ένα νέο παθογόνο και υπάρχουν ακόμα πολλά ερωτήματα που πρέπει να απαντηθούν σε σχέση με την επιδημιολογία και την αντιμετώπισή του.

Επιλεγμένη βιβλιογραφία

1. Γκούμας Δ., Αυγελής Α., Τζωρτζακάκης Ε., Μαλαθράκης Ν. & Ροδιτάκης Ν. 2001. Τεχνικός Οδηγός Ασθενειών και Εχθρών της Πατάτας. Επιμέλεια έκδοσης: Δ. Γκούμας, ΠΕΠ-Κρήτης, Ηράκλειο, Κρήτης, σελ. 56 (ISBN: 960-87112-0-7).
2. Laurila J, Hannukkala A, Nykyri J et al., 2010. Symptoms and yield reduction caused by *Dickeya* spp. strains isolated from potato and river water in Finland. *European Journal of Plant Pathology* 126, 249–62.
3. Toth I. K., van der Wolf J. M., Saddler G., Lojkowska E., Hellas V., Pirhonen M., Tsror (Lahkim) L. and Elphinstone J. G., 2011. *Dickeya* species: an emerging problem for potato production in Europe. *Plant Pathology* 60, 385–399.