

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ
ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ
ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ



TECHNOLOGICAL
EDUCATIONAL
INSTITUTE *of* CRETE
DEPARTMENT *of* CROP SCIENCE

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

«ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ
ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΑΠΟ ΤΗΝ ΑΣΘΕΝΕΙΑ ΝΕΚΡΩΣΗ
ΤΗΣ ΕΝΤΕΡΙΩΝΗΣ ΤΗΣ ΤΟΜΑΤΑΣ»

ΠΕΝΤΑΡΗ ΜΑΡΙΑΝΝΑ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ Δρ. ΓΚΟΥΜΑΣ Ε. ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ

ΙΟΥΝΙΟΣ, 2012

ΚΑΘΗΓΗΤΕΣ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

ΚΑΘ. ΓΚΟΥΜΑΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ
ΚΑΘ. ΤΡΑΝΤΑΣ ΕΜΜΑΝΟΥΗΛ
ΚΑΘ. ΓΚΑΤΖΙΛΑΚΗΣ ΧΡΗΣΤΟΣ

**ΤΟ ΕΡΓΟ ΑΥΤΟ ΥΛΟΠΟΙΗΘΗΚΕ ΣΤΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ &
ΒΑΚΤΗΡΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΘΩΣ ΚΑΙ ΣΤΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ &
ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΦΥΤΩΝ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΤΗΣ ΣΧΟΛΗΣ
ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΤΟΥ ΤΕΙ ΚΡΗΤΗΣ**

ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΑΠΟ ΤΗΝ ΑΣΘΕΝΕΙΑ
ΝΕΚΡΩΣΗ ΤΗΣ ΕΝΤΕΡΙΩΝΗΣ ΤΗΣ ΤΟΜΑΤΑΣ

*Αφιερωμένο στους γονείς μου,
Γιώργο και Δήμητρα*

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διατριβή ξεκίνησε και ολοκληρώθηκε στο εργαστήριο Φυτοπαθολογίας-Βακτηριολογίας του τμήματος Φυτικής Παραγωγής, της Σχολής Γεωπονίας, του ΤΕΙ Κρήτης με την επιστημονική υποστήριξη του εργαστηρίου Φυτοπαθολογίας-Βακτηριολογίας. Αυτή τη στιγμή που το έργο έχει ολοκληρωθεί, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή μου Δρ. Γκούμα Δημήτριο, για την ευκαιρία που μου έδωσε να εργαστώ στο εργαστήριό του, καθώς και για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε από την αρχή μέχρι το τέλος της πτυχιακής διατριβής μου. Είμαι απόλυτα ευτυχής που συνεργαστήκαμε, γιατί είναι ένας αξιόλογος άνθρωπος, πάντα προσιτός και φιλότιμος. Τον ευχαριστώ από καρδιάς.

Θα ήθελα, ακόμα, να ευχαριστήσω τον καθηγητή Δρ. Τραντά Εμμανουήλ, με τον οποίο συνεργάστηκα άψογα στο μοριακό μέρος της εργασίας μου, που έλαβε χώρα στο εργαστήριο Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας φυτών. Με βοήθησε, τόσο στην πραγματοποίηση του πειράματός μου, όντας πάντα δίπλα μου σε ό,τι χρειαζόμουν, όσο και στη συγγραφή της πτυχιακής μελέτης.

Επίσης, να ευχαριστήσω τη συμφοιτήριά μου Μπαλαντινάκη Ευαγγελία, η οποία με βοήθησε καταρχήν στην ένταξή μου στο εργαστήριο και αργότερα, στη συγγραφή της εργασίας μου. Ευχαριστώ για τη στήριξη και συμπαράσταση που μου έδειξε και για τη φιλία που τελικά μου προσέφερε. Βέβαια, δε θα μπορούσα να παραλείψω τους φίλους εκείνους, που ανεξάρτητα από την εργασία μου, βοήθησαν καθένας με το δικό του τρόπο, δίνοντάς μου δύναμη να προσπαθώ για το καλύτερο.

Τέλος, αναμφίβολα πολλά ευχαριστώ αξίζουν οι γονείς μου, Γιώργος και Δήμητρα, καθώς και τα αδέρφια μου, Ασπασία και Παναγιώτης, για τη συνεχή στήριξη -οικονομική και ηθική- την κατανόηση και την αγάπη που μου πρόσφεραν όλα τα χρόνια της φοίτησής μου.

Με εκτίμηση,
Πεντάρη Μαριάννα

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ	4
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	5
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	7
1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	8
1.2 ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΑ ΤΗΣ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΗΣ ΝΕΚΡΩΣΗΣ ΤΗΣ ΕΝΤΕΡΙΩΝΗΣ	10
1.3 ΤΟ ΠΑΘΟΓΟΝΟ ΒΑΚΤΗΡΙΟ <i>PSEUDOMONAS CORRUGATA</i>	12
1.4 ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑΣ	13
1.5 ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ	15
1.6 ΜΟΡΙΑΚΗ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ	15
1.6.1 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR).....	16
1.6.2 Η ΜΕΘΟΔΟΣ ΤΗΣ REP PCR	17
1.6.3 Η ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΠΟΤΥΠΩΣΗΣ ΜΕΣΩ ΤΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΗΣΗΣ ΠΟΛΛΑΠΛΩΝ ΓΕΝΩΜΙΚΩΝ ΠΕΡΙΟΧΩΝ).....	19
1.6.4 ΤΑ ΓΟΝΙΔΙΑ <i>gyrB</i> , <i>rpoD</i> ΚΑΙ <i>rpoB</i>	19
1.6.5 ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗ DNA (DNA SEQUENCING)	20
1.7 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	20
2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	22
2.1 ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ.....	23
2.2 ΒΙΟΧΗΜΙΚΗ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ	23
2.3 ΟΡΟΛΟΓΙΚΗ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ	25
2.4 ΔΟΚΙΜΕΣ ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑΣ	26
2.4. ΜΟΡΙΑΚΗ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΑΠΟΜΟΝΩΣΕΩΝ ΤΟΥ ΒΑΚΤΗΡΙΟΥ <i>PSEUDOMONAS CORRUGATA</i>	28
2.4.1 ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΥΓΡΗΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΓΙΑ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA	28
2.4.2 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΟΛΙΚΟΥ DNA ΑΠΟ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ	28
2.4.3 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΑΠΟΜΟΝΩΜΕΝΟΥ DNA ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ	29
2.4.4 ΦΩΤΟΜΕΤΡΗΣΗ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	29
2.5 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (POLYMERASE CHAIN REACTION, PCR).....	29
2.5.1 ΕΚΚΙΝΗΤΕΣ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ ΓΙΑ ΤΙΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΙΣ PCR.....	30
2.6 ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΙΣ PCR.....	30
2.6.1 PC1 ΚΑΙ PC5-PCR.....	31
2.6.2 BOX ΚΑΙ ERIC-PCR.....	32
2.6.3 <i>gyrB</i> -PCR.....	33
2.6.4 <i>rpoD</i> -PCR	33
2.6.5 <i>rpoB</i> -PCR.....	34
2.6.6 ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΣΗ ΤΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΤΗΣ PCR ΜΕ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ 1, 3% W/V	35
2.7 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΕΠΙΘΥΜΗΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ DNA ΑΠΟ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ.....	35
3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	37

ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΑΠΟ ΤΗΝ ΑΣΘΕΝΕΙΑ
ΝΕΚΡΩΣΗ ΤΗΣ ΕΝΤΕΡΙΩΝΗΣ ΤΗΣ ΤΟΜΑΤΑΣ

3.1 ΒΙΟΧΗΜΙΚΗ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ	38
3.2 ΟΡΟΛΟΓΙΚΗ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ	39
3.3 ΔΟΚΙΜΕΣ ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑΣ	40
3.4 ΜΟΡΙΑΚΗ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ	44
3.4.1 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΑΠΟΜΟΝΩΜΕΝΩΝ DNA ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ	44
3.4.2 ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΩΝ ΑΠΟΜΟΝΩΜΕΝΩΝ DNA	44
3.4.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΤΗΣ PC1 & PC5 PCR	44
3.4.4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΤΗΣ REP-PCR	45
3.4.5 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ <i>GYR</i> B-PCR, <i>RPO</i> B-PCR ΚΑΙ <i>RPO</i> D-PCR	47
3.4.6 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗΣ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ <i>GYR</i> B, <i>RPO</i> B, <i>RPO</i> D	49
4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ	52
5 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	56
6 ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	61

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η νέκρωση της εντεριώνης της τομάτας προκαλείται από το βακτήριο *Pseudomonas corrugata*. Τα προσβεβλημένα φυτά αναγνωρίζονται από τη γενική χλωρωτική εμφάνιση, τη σταδιακή μάρανση και τη νέκρωση της εντεριώνης των φυτών. Από πρόσφατες μελέτες, προκύπτει ότι το βακτήριο *Pseudomonas mediterranea* το οποίο απομονώνεται στις καλλιέργειες παραμεσόγειων χωρών, αποτελεί ένα νέο παθογόνο αίτιο της ασθένειας. Η εργασία αυτή ασχολείται με το χαρακτηρισμό βακτηριακών απομονώσεων της ασθένειας στην Κρήτη για το χρονικό διάστημα 1991-2009. Από 72 απομονώσεις της συλλογής του εργαστηρίου Φυτοπαθολογίας-Βακτηριολογίας του ΤΕΙ Κρήτης, επιλέχθηκαν 36 με βάση τα φαινοτυπικά τους χαρακτηριστικά (απουσία φθορισμού και παραγωγή οξειδάσης), την ικανότητά τους να προκαλούν την τυπική αντίδραση υπερευαισθησίας και να μολύνουν φυτά τομάτας. Στη συνέχεια, τα 36 βακτηριακά στελέχη αναλύθηκαν με κλασικές βακτηριολογικές δοκιμές και αποδείχθηκε πως τα 28 ταξινομούνται ως *Pseudomonas mediterranea* και τα υπόλοιπα οκτώ ως *Pseudomonas corrugata*, ανάμεσά τους και τα στελέχη αναφοράς CFBP5447T και NCPPB2445 αντίστοιχα. Στην ίδια ομαδοποίηση κατέληξαν τα αποτελέσματα με τη χρήση του εξειδικευμένου αντιορού anti-PC14, για το *Pseudomonas corrugata*. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώθηκαν και μοριακά, με τη χρήση των εξειδικευμένων εκκινητών PC1 και PC5, πρωτοκόλλων μοριακής αποτύπωσης rep-PCR (BOX- και ERIC-PCR) και μερικής αλληλούχισης τριών γονιδίων (*gyrB*, *rpoB* και *rpoD*). Από τη φυλογενετική ανάλυση επιλεγμένων στελεχών δεν προέκυψε σημαντική γενετική παραλλακτικότητα μεταξύ των στελεχών του ίδιου είδους. Η εργασία αυτή αποτελεί την πρώτη αναφορά στην Ελλάδα του βακτηρίου *Pseudomonas mediterranea* ως παθογόνο αίτιο της ασθένειας νέκρωση της εντεριώνης της τομάτας και της πιπεριάς.

1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Η ασθένεια

Η νέκρωση της εντεριώνης είναι μια βακτηριολογική ασθένεια που προσβάλλει τα φυτά τομάτας σε οποιοδήποτε στάδιο ανάπτυξης και σε διαφορετικά συστήματα καλλιέργειας (θερμοκηπιακές, υπαίθριες, υδροπονικές καλλιέργειες). Περιγράφηκε για πρώτη φορά στη Μεγάλη Βρετανία το 1970 από Scarlett *et al.* (1978). Ως παθογόνο αίτιο προσδιορίστηκε το βακτήριο *Pseudomonas corrugata*. Στη συνέχεια, η ασθένεια αναφέρθηκε να προκαλεί σημαντικές προσβολές σε καλλιέργεια τομάτας σε Γαλλία, Γερμανία, Δανία, Ν. Αφρική, Ιταλία, Η. Π. Α, Ελβετία, Ισραήλ, Πορτογαλία, Σουηδία, Νέα Ζηλανδία, Ισπανία, Αργεντινή, Αλβανία, Λευκορωσία, Καναδά, Ινδία, Λετονία, Συρία, Τανζανία, Π.Γ.Δ.Μ., Ολλανδία, Νορβηγία, Πολωνία, Γιουγκοσλαβία, Ιαπωνία, Μεγάλη Βρετανία, πρώην Σοβιετική Ένωση, Βραζιλία και Τουρκία (Παναγόπουλος, 2000 & Janse, 2005). Το ίδιο βακτήριο έχει απομονωθεί από τις ρίζες ασυμπτωματικών φυτών μηδικής (Lucezic, 1979). Η ασθένεια έχει παρουσιαστεί από το 1980 σε διάφορες περιοχές της Ισπανίας σε φυτά τομάτας και το 1985 το παθογόνο αίτιο απομονώθηκε για πρώτη φορά από ασθενή φυτά πιπεριάς (Lopez, 1988). Στη χώρα μας αναφέρθηκε για πρώτη φορά το 1984 σε καλλιέργειες τομάτας θερμοκηπίου, σε περιοχές της Πελοποννήσου (Alivizatos *et al.*, 1984). Έκτοτε, η ασθένεια εμφανίζεται σταθερά σε όλες σχεδόν τις περιοχές της χώρας και κυρίως στην Κρήτη (Χανιά, Τυμπάκι, Ηράκλειο, Ιεράπετρα), σε υπό κάλυψη και υπαίθριες καλλιέργειες και αποτελεί ένα σοβαρό πρόβλημα ιδίως στις υπό κάλυψη τοματοκαλλιέργειες, στη διάρκεια του χειμώνα (Buonauro *et al.*, 1993, Μαλαθράκης κ. ά., 2007). Σύμφωνα με τον Αλιβιζάτο (1988), η νέκρωση της εντεριώνης της τομάτας παρατηρήθηκε για πρώτη φορά το 1976 στην περιοχή Καλλονής Τροιζηνίας, ενώ το 1977 σε θερμοκήπια των περιοχών Ιωαννίνων, Ρεθύμνου, Χανίων Κρήτης, με σοβαρές ζημιές. Μέχρι το 1988 η ασθένεια είχε εξακριβωθεί σε περιοχές της Πελοποννήσου, Αττικής, Βοιωτίας, Ηπείρου, Θεσσαλίας και στα νησιά Κρήτη, Χίο, Λέσβο, Εύβοια, Σαλαμίνα, Πόρο. Επίσης, η ασθένεια με τη συμπτωματολογική εικόνα της νέκρωσης της εντεριώνης αποδόθηκε στα βακτήρια: *Pseudomonas* spp., *Pseudomonas viridiflava*, *Pseudomonas fluorescens* (biovar II), και το *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. Την ίδια περίοδο στην Κρήτη, μια ασθένεια με παρόμοια συμπτωματολογία που αναφέρεται σαν βακτηριακή μαλακή σήψη της τομάτας αποδίδεται από τους Malathrakis & Goumas (1987) στα παθογόνα *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*, *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*, *Pseudomonas viridiflava* και *Pseudomonas fluorescens* biotype I. Για

πολλά χρόνια, η νέκρωση της εντεριώνης σε καλλιέργειες τομάτας αποδιδόταν αποκλειστικά στο βακτήριο *Erwinia carotovora* (Jones *et al.*, 1983). Σε πρόσφατες μελέτες ως επικρατές παθογόνο αίτιο της ασθένειας στις παραμεσόγειες περιοχές θεωρείται κυρίως το βακτήριο *Pseudomonas mediterranea*, συγγενικό είδος του *Pseudomonas corrugata*. Το βακτήριο *Pseudomonas mediterranea* έχει απομονωθεί από ασθενή φυτά με συμπτώματα νέκρωσης της εντεριώνης από την Ιταλία (Catara *et al.*, 2002), Πορτογαλία (Moura *et al.*, 2005), την Τουρκία (Sahin *et al.*, 2005), την Βραζιλία (Alice *et al.*, 2007), τη Σαουδική Αραβία (Molan *et al.*, 2010) και την Αργεντινή (Alippi *et al.*, 2010). Στην Ελλάδα αναφέρεται σε αυτή την εργασία για πρώτη φορά.

1.2 Συμπτώματα της βακτηριακής νέκρωσης της εντεριώνης

Το βακτήριο *Pseudomonas corrugata* θεωρείται ένα ήπιο και ευκαιριακό παθογόνο. Εντούτοις, έχουν παρατηρηθεί προσβολές που πλησιάζουν το 100% των φυτών που οδηγούν είτε στην απώλεια της καλλιέργειας είτε σε σημαντικές οικονομικές απώλειες. Συνήθως, τέτοια επίπεδα προσβολών σχετίζονται με την παρουσία ιδιαίτερων συνθηκών κατά την καλλιέργεια της τομάτας. Σε πολλές αναφορές, το ποσοστό των προσβεβλημένων φυτών από το *Pseudomonas corrugata* κυμαίνεται συνήθως από 5-10% (Lai *et al.*, 1983, Carroll *et al.*, 1992, Scortichini, 1989), αλλά σε ορισμένες ποικιλίες και σε ορισμένες καλλιέργειες το ποσοστό μπορεί να φτάσει το 50% (Scarlet *et al.*, 1978).

Σε φυτά **τομάτας** (*Solanum lycopersicum*), τα πρώτα ασθενή φυτά εντοπίζονται όταν οι καρποί του πρώτου σταυρού είναι πλήρως ανεπτυγμένοι, αλλά ακόμη πράσινοι. Αρχικά, παρατηρείται μόνο ελαφριά μάρανση και κάποιες φορές χλώρωση στην κορυφή του φυτού. Αργότερα, τα φυτά παρουσιάζουν παροδική, μονόπλευρη ή ολική μάρανση, ή μερική κατάρρευση του φυτού (Εικ. 16-17). Υδαρείς και καστανόχρωμες περιοχές εμφανίζονται στην επιφάνεια της επιδερμίδας, οι οποίες μπορεί να εξαπλώνονται σε μεγάλο τμήμα κατά μήκος του βλαστού (Εικ. 20) (Μαλαθράκης κ. ά., 2007). Ενίοτε, μπορεί να παρατηρηθούν ίχνη από βακτηριακό έκκριμα από τις ουλές των φύλλων (Catara, 2007). Επιπλέον, στο στέλεχος αναπτύσσονται επίκτητες, ρίζες, οι οποίες μπορεί να εμφανιστούν στο στέλεχος σε ύψος μέχρι και ένα μέτρο από το έδαφος (Εικ. 18-19). Η παρουσία τέτοιων επίκτητων ριζών αποτελεί διαγνωστικό σύμπτωμα, διαφορικής διάγνωσης της ασθένειας (Catara, 2007). Το χαρακτηριστικό

σύμπτωμα της ασθένειας, όπως φαίνεται από την ονομασία της, είναι η νέκρωση της εντεριώνης του στελέχους του φυτού. Η διάγνωση της ασθένειας επιβεβαιώνεται όταν σε κατά μήκος τομή του στελέχους ή του μίσχου διαπιστώσουμε ότι η εντεριώνη έχει όψη υδαρή, με έντονο καστανό μέχρι μαύρο μεταχρωματισμό, αρχικά στα όρια της προσβολής και στη συνέχεια σε όλο το τμήμα του προσβεβλημένου φυτού (Εικ. 22 α, β, γ). Η εντεριώνη άλλοτε είναι συμπαγής με ή χωρίς κοιλότητες και άλλοτε συρρικνώνεται σε μια λεπτή στρώση καστανού ιστού που βρίσκεται σε επαφή με τον αγγειώδη ιστό, ο οποίος συχνά είναι καστανά μεταχρωματισμένος και σε προχωρημένο στάδιο της ασθένειας νεκρώνεται. Η νέκρωση της εντεριώνης, μπορεί επίσης να προσβάλλει ακόμα και την κύρια ρίζα του φυτού και περιστασιακά τις μικρότερες ρίζες. Τα φυτά που τυχόν ανακάμπτουν της προσβολής αναπτύσσουν νέα στελέχη με μικρότερη διάμετρο, ενώ όταν η προσβολή περιορίζεται μόνο στην εντεριώνη τα φυτά μπορεί να δώσουν κανονική παραγωγή. Σε προχωρημένο στάδιο προσβολής ο αγγειακός ιστός μεταχρωματίζεται και νεκρώνεται. Η ασθένεια, συνήθως, εκδηλώνεται από τη βάση του στελέχους και κατευθύνεται σταδιακά προς τα πάνω προσβάλλοντας τους μίσχους και τους ποδίσκους του φυτού. Αν και σπάνια, η ασθένεια έχει αναφερθεί σε σπορόφυτα στο φυτώριο όπου μπορεί να προκαλέσει την ολοκληρωτική καταστροφή τους.

Η ασθένεια έχει αναφερθεί σε πιπεριά (*Capsicum annum*) (Lopez *et al.*, 1988), χρυσάνθεμο (*Chrysanthemum morifolium*) (Fiori, 1992) και γεράνι (*Geranium* sp) (Magyarosy & Buchanan, 1995) με κύριο σύμπτωμα τη νέκρωση της εντεριώνης. Στην Ιταλία σε υπαίθρια καλλιέργεια πιπεριάς τα προσβεβλημένα φυτά εμφανίζουν χλώρωση και μαρανση των φύλλων και εκτεταμένη νέκρωση της εντεριώνης. Επιπλέον, στην **πιπεριά** εξωτερικά στο στέλεχος παρατηρείται καστανός-μαύρος μεταχρωματισμός. Δεν έχει αναφερθεί η παρουσία επίκτητων ριζών, ενώ η προσβολή εκτιμήθηκε στο 15% των φυτών (Scorchini, 1989). Στην Ισπανία η ασθένεια σε φυτά πιπεριάς παρατηρείται σπάνια και εμφανίζεται συνήθως σε εκτάσεις, όπου η νέκρωση της εντεριώνης την ίδια χρονιά ήταν ενδημική σε φυτά τομάτας (Lopez *et al.*, 1994). Στο **χρυσάνθεμο**, παρατηρείται καστανή κηλίδωση στη βάση των στελεχών με έξοδο βακτηριακού εκκρίματος. Η κηλίδωση στα στελέχη επεκτείνεται προς τα πάνω, ενώ τα φύλλα κιτρινίζουν σταδιακά από την κορυφή προς το μίσχο και από τα κατώτερα προς τα ανώτερα. Η εντεριώνη αρχικά είναι καστανή και υδαρής και τελικά σήπεται και αποδιοργανώνεται. Στην ίδια περιοχή οι αγγειακοί ιστοί εμφανίζουν καστανό

μεταχρωματισμό. Τελικά, τα προσβεβλημένα στελέχη σήπονται και το φυτό νεκρώνεται. Στα μεγαλύτερης ηλικίας φυτά η εξάπλωση της ασθένειας είναι πιο αργή. Στο χρυσάνθεμο έχει αναφερθεί η παρουσία επίκτητων ριζών (Fiorì, 1992).

1.3 Το παθογόνο βακτήριο *Pseudomonas corrugata*

Το *Pseudomonas corrugata* ανήκει στη γ-υποκλάση των πρωτεοβακτηρίων (γ-proteobacteria), στην οικογένεια *Pseudomonadaceae* του γένους *Pseudomonas sensu stricto*, το οποίο περιλαμβάνει είδη που ομαδοποιούνται στην ομάδα I ή στο *fluorescens* rRNA κλάδο. Το γένος αυτό, περιλαμβάνει κυρίως είδη που φθορίζουν, αλλά περιλαμβάνει και μερικά μη φθορίζοντα είδη μεταξύ των οποίων το βακτήριο *Pseudomonas corrugata*. Φυλογενετική ανάλυση βασιζόμενη στην αλληλούχιση του 16S rRNA τοποθετεί το *Pseudomonas corrugata* μεταξύ των μελών του κλάδου του *Pseudomonas fluorescens* (Anzai *et al.*, 2000), ενώ σε άλλες μελέτες βασιζόμενες σε συνδυασμένη αλληλούχιση των νουκλεοτιδίων των γονιδίων *rpoB* και *gyrB*, το κατατάσσουν στο ενδογενετικό σύμπλεγμα του *Pseudomonas fluorescens* (Yamamoto *et al.*, 2000). Πρόκειται για αρνητικά κατά Gram βακτήρια, δεν παράγουν φθορίζουσες χρωστικές σε θρεπτικό υπόστρωμα King's B και ανάγουν τα νιτρικά. Σε σχέση με τις διαγνωστικές δοκιμές L.O.P.A.T. (L-παραγωγή Levan, O-παραγωγή οξειδάσης, P-πηκτινόλυση κονδύλων πατάτας, A-διάσπαση αργινίνης, T-υπερευαισθησία καπνού), δεν παράγουν Levan, είναι θετικά στην παραγωγή οξειδάσης, δεν είναι πηκτινολυτικά, ποικίλουν ως προς την υδρόλυση της αργινίνης και τέλος, εκλύουν τυπική αντίδραση υπερευαισθησίας σε φύλλα καπνού. Ταξινομικές μελέτες βασιζόμενες σε ανάλυση των λιπαρών οξέων και σε SDS-PAGE των κυτταρικών πρωτεϊνών, ταξινομούν το *Pseudomonas corrugata* μεταξύ των φθορίζουσών ψευδομονάδων.

Άλλες μελέτες πολυφασικής προσέγγισης ταυτοποίησης, προσδιορίζουν δύο στενά συνδεδεμένα αλλά διακριτά taxa ανάμεσα στα βακτήρια που συμπεριλαμβάνονται στο είδος *Pseudomonas corrugata*. Το taxon που περιλαμβάνει το τυπικό στέλεχος βακτηρίου διατηρεί το όνομα *Pseudomonas corrugata*, ενώ το δεύτερο ονομάζεται πλέον *Pseudomonas mediterranea* (Catara *et al.*, 2002). Το *Pseudomonas corrugata* και το *Pseudomonas mediterranea* έχουν παρόμοιους φαινοτυπικούς χαρακτήρες οι οποίοι περιγράφονται αναλυτικά από την Catara (2007). Το *Pseudomonas corrugata* και το *Pseudomonas mediterranea* διαφοροποιούνται φαινοτυπικά από την ικανότητα των στελεχών του δεύτερου να χρησιμοποιούν το

μεσοτρυγικό οξύ, το 2-κετογλουκονικό νάτριο και την ισταμίνη. Καθώς το *Pseudomonas mediterranea* περιγράφηκε πρόσφατα δεν είναι γνωστή η γεωγραφική κατανομή των δύο ειδών αφού δεν έχουν αναλυθεί εργαστηριακά σε μεγάλη έκταση, στελέχη που πιθανά έχουν συμπεριληφθεί στο είδος *Pseudomonas corrugata*. Αυτό έχει διαπιστωθεί σε μελέτες στη Γαλλία, Ιταλία και Ισπανία με στελέχη του παθογόνου που έχουν απομονωθεί από τομάτα και πιπεριά.

Η ποικιλομορφία του βακτηρίου *Pseudomonas corrugata* προκύπτει από διάφορες μελέτες που αφορούν τα φαινοτυπικά, χημειοταξονομικά, ορολογικά χαρακτηριστικά και από τα δεδομένα DNA/DNA υβριδισμού (Siverio *et al.*, 1993, 1996, Catara *et al.*, 1997, Sutra *et al.*, 1997). Αρχικά, αναγνωρίστηκαν μεταξύ στελεχών των απομονώσεων του *Pseudomonas corrugata* από τη Σικελία της Ιταλίας τρεις φαινοτυπικές ομάδες (1, 2 και 3) (Catara *et al.*, 1997). Οι Sutra *et al.*, (1997) παρατήρησαν, ότι το rphenon, το οποίο περιλαμβάνει 87 στελέχη του *Pseudomonas corrugata* από όλο τον κόσμο, διαιρέθηκε σε δυο subphena, το 1a και το 1b. Το μέσο ποσοστό επανασύνδεσης του DNA με το τυπικό στέλεχος του *Pseudomonas corrugata* ήταν στο 91% για τα στελέχη του subphenon 1a και 75% για τα στελέχη του subphenon 1b, υποδηλώνοντας τη γονιδιακή ποικιλομορφία ανάμεσα στα στελέχη του *Pseudomonas corrugata*. Γονιδιακή ποικιλομορφία έχει επίσης παρατηρηθεί για το *Pseudomonas corrugata* και σε άλλες γονιδιακές μελέτες (Achouak *et al.*, 2000) (Catara *et al.*, 2000).

1.4 Στοιχεία επιδημιολογίας

Το βακτήριο *Pseudomonas corrugata* επιβιώνει στο έδαφος και στη ριζόσφαιρα των φυτών-ξενιστών του και σε άλλα φυτικά είδη, τα οποία αποτελούν τις πηγές-δεξαμενές για τις νέες μολύνσεις. Επιβιώνει για μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα σε αργιλοαμμώδη εύφορα παρά σε αμμώδη εδάφη. Στα ακαλλιέργητα εδάφη βρέθηκε ότι ο βακτηριακός πληθυσμός μειώνεται σημαντικά σε διάστημα 10 ημερών σε σύγκριση με εδάφη στα οποία καλλιεργούνται φυτά τομάτας, όπου ο πληθυσμός του βακτηρίου παραμένει σταθερός. Το βακτήριο είναι ικανό να αποικήσει τη ριζόσφαιρα των φυτών της τομάτας και να ξεκινήσει τον ενδοφυτικό αποικισμό του ξεκινώντας τόσο από μόλυσμα που υπάρχει στο έδαφος, όσο και από μολυσμένους σπόρους (Bella *et al.*, 2003, Cirvilleri *et al.*, 2000). Συνήθως, το *Pseudomonas corrugata* εισέρχεται στον ξενιστή δια μέσου των πληγών στο στέλεχος (Εικ. 21) στη ζώνη που έρχεται σε επαφή

με το έδαφος και από τις ρίζες (Bella *et al.*, 2003, Nauman *et al.*, 1989, Scarlett *et al.*, 1978, Scortichini, 1989). Το βακτήριο φαίνεται ότι αρχικά αποικίζει τους παρεγχυματικούς ιστούς των φυτών ξενιστών. Ο αποικισμός επιτυγχάνεται με τη βοήθεια εξωπολυσακχαριτών (alginate) που υποβοηθούν την προσκόλληση των βακτηρίων στο φυτικό κύτταρο. Το μέτωπο της μόλυνσης επεκτείνεται κατά 3 έως 6 εκατοστά πέρα από το όριο των ορατών συμπτωμάτων, με τη συγκέντρωση των βακτηρίων σε ιστούς χωρίς συμπτώματα να είναι περίπου 10^5 cfu/g και να προσεγγίζει εκείνη των 10^8 cfu/g στους ιστούς με συμπτώματα. Ο αποικισμός του στελέχους της τομάτας μπορεί να γίνει διαμέσου του αγγειακού ιστού και του φλοιού, από όπου το βακτήριο, σε συνθήκες υψηλής υγρασίας, μπορεί να εκρέει με μορφή βακτηριακού εκκρίματος. Από διάφορα ερευνητικά δεδομένα προκύπτει ότι το βακτήριο μεταφέρεται με το σπόρο. Μολυσμένοι σπόροι έχουν αναφερθεί στο Ισραήλ και στην Αίγυπτο, αλλά επειδή ο έλεγχος των σπόρων δεν είναι συστηματικός, η διακύμανση του ποσοστού μόλυνσης δεν είναι γνωστή (Zutra, 1989, Abdalla, 2000). Το βακτήριο διασπείρεται από τα προσβεβλημένα φυτά με το νερό της βροχής, του ποτίσματος και της δρόσου, αλλά και με τις καλλιεργητικές εργασίες. Στις καλλιέργειες εκτός εδάφους το βακτήριο μπορεί να εξέλθει από τις ρίζες στο θρεπτικό διάλυμα και να κυκλοφορήσει με αυτό μολύνοντας τα υγιή φυτά (Fiori, 2002, Naumann *et al.*, 1989, Sadowska-Rybak *et al.*, 1997). Επιπλέον, το νερό του ποτίσματος μπορεί να παίζει σημαντικό ρόλο στη διασπορά του παθογόνου (Scarlett *et al.*, 1978). Η παρουσία ελεύθερου νερού στις επιφάνειες των φύλλων και των στελεχών, που συνήθως οφείλεται στον κακό αερισμό, στην υπερβολική άρδευση και στις σημαντικές διακυμάνσεις της θερμοκρασίας μεταξύ ημέρας και νύχτας, όπως και τα υψηλά επίπεδα αζώτου στο έδαφος, τα οποία συμβάλλουν στην ανάπτυξη ζωηρών αλλά όχι εύρωστων φυτών, ευνοούν τις μολύνσεις από το βακτήριο *Pseudomonas corrugata* και την ανάπτυξη της ασθένειας της νέκρωσης της εντεριώνης (Carroll *et al.*, 1992, Naumann *et al.*, 1989, Scarlett *et al.*, 1978). Εκτιμάται ότι το μόλυσμα σε καλλιέργειες χρυσάνθεμου, προέρχεται από το έδαφος το οποίο έχει καλλιεργηθεί το προηγούμενο έτος με τομάτα με έντονες προσβολές βακτηριακής νέκρωσης. Επίσης, το βακτήριο έχει απομονωθεί από σπόρους ρυζιού, από φύτρα φασολιάς και από κεφάλες μπρόκολου (Catara *et al.*, 2002). Μετά από τεχνητές μολύνσεις με στελέχη του *Pseudomonas corrugata* προσβάλλονται φυτά μελιτζάνας, φασολιάς, σέλινου, αγγουριάς, πεπονιάς, αρακά, καπνού και κολοκυθιάς (Catara *et al.*, 1997 & 2002, Sutra *et al.*, 1997). Έχει διαπιστωθεί ότι οι καλλιεργούμενες

ποικιλίες και τα υβρίδια τομάτας είναι πιο ευπαθή στις προσβολές σε σχέση με τα άγρια είδη του *Lycopersicon* spp. (Scorchini and Rossi, 1993).

1.5 Αντιμετώπιση

Η ασθένεια μπορεί να προληφθεί, ακόμα και να θεραπευτεί με την αποφυγή της έκθεσης των φυτών σε πολύ υψηλή υγρασία, με βελτίωση του αερισμού του θερμοκηπίου, με αποφυγή υπερβολικής αζωτούχας λίπανσης και με την εφαρμογή ισορροπημένης λίπανσης καλίου και ασβεστίου (Scarlett *et al.*, 1978). Το βακτήριο μεταφέρεται με το σπόρο και επιβιώνει στο έδαφος σε φυτικά υπολείμματα. Η χρησιμοποίηση υγιούς σπόρου απαλλαγμένου από τον παθογόνο ή σπόρου που έχει δεχθεί επεμβάσεις με υποχλωριώδες νάτριο, αντιβιοτικά, όπου επιτρέπεται ή με θερμό νερό, θεωρούνται αποτελεσματικές. Η εξέταση της θερμικής ευαισθησίας αντιπροσωπευτικών στελεχών του βακτηρίου έδειξε ότι ο βακτηριακός πληθυσμός στο έδαφος μειώθηκε ή εξαλείφθηκε μετά από 30 λεπτά επέμβασης στους 60 °C (Bella *et al.*, 2003). Ένα πλεονέκτημα της επέμβασης με θερμό νερό, είναι η ελάττωση της ποσότητας των μικροβιοκτόνων και η πιθανή αρνητική επίδραση στο περιβάλλον (Mathre *et al.*, 1995). Στο φυτώριο συστήνονται εβδομαδιαίες επεμβάσεις με χαλκούχα σκευάσματα για την αντιμετώπιση του βακτηρίου. Στις υδροπονικές καλλιέργειες πρέπει να γίνεται τακτικός έλεγχος για πιθανή μόλυνση του ανακυκλούμενου διαλύματος με το βακτήριο *Pseudomonas corrugata*.

1.6 Μοριακή ταυτοποίηση

Για την ταυτοποίηση των βακτηρίων χρησιμοποιούνται όλο και πιο συχνά μέθοδοι που βασίζονται στο γενετικό τους υλικό (DNA), οι οποίες εμφανίζονται ως πιο αξιόπιστες, πιο απλές και πιο γρήγορες σε σχέση με τις κλασικές βιοχημικές δοκιμές ταυτοποίησης των φυτοπαθογόνων βακτηρίων. Η ταξινόμηση σε γένη και σε είδη, παραδοσιακά βασιζόταν σε μεθόδους DNA-DNA υβριδισμού, ενώ η μοντέρνα φυλογενετική ανάλυση βασίζεται όλο και περισσότερο σε μοριακές τεχνικές αποτύπωσης (fingerprinting) όπως αυτές που στηρίζονται στην ανάλυση αλληλουχιών επιλεγμένων γονιδίων (MLST), στην ανάλυση 16S ριβοσωμικών αλληλουχιών, στην BOX και ERIC ανάλυση, στα RFLPs και στα RAPDs (Yamamoto *et al.*, 2000).

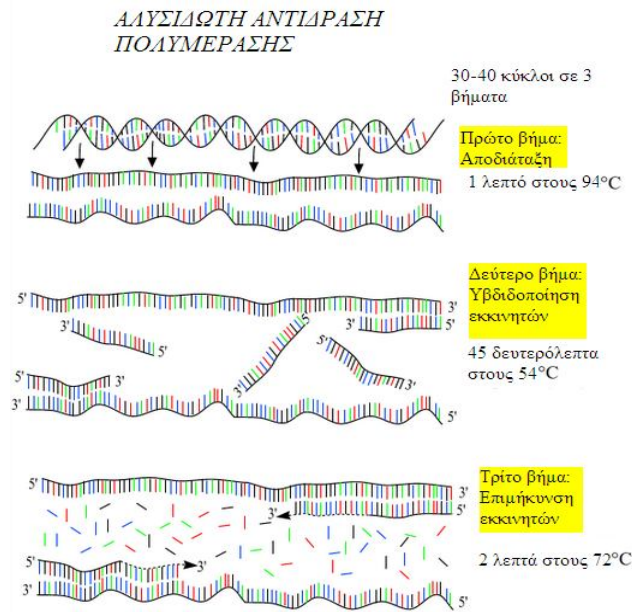
1.6.1 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) είναι μια μέθοδος που επιτρέπει τον επιλεκτικό πολλαπλασιασμό αλληλουχιών DNA, σε σύντομο χρονικό διάστημα. Η μέθοδος αυτή παρουσιάστηκε από τον Kary Mullis το 1984.

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 μικρών συνθετικών τμημάτων μονόκλωνου DNA, μεγέθους 15-30 νουκλεοτιδίων με αλληλουχία συμπληρωματική με το 3' άκρο 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 30-35 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) Αποδιάταξη του δίκλωνου DNA (denaturation).
- 2) Υβριδοποίηση εκκινητών (primer annealing) στις αλληλουχίες του DNA-στόχου.
- 3) Επιμήκυνση εκκινητών (extension).



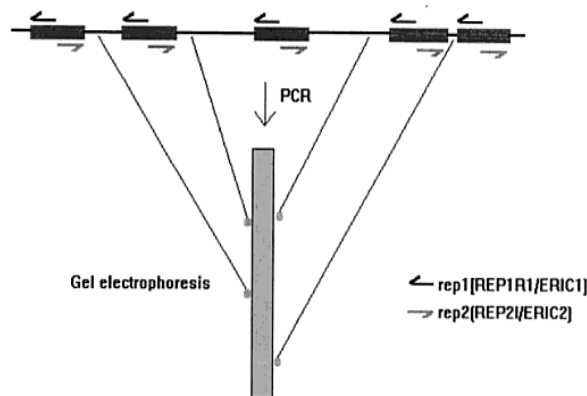
Εικόνα 1. Σχηματική απεικόνιση των τριών κύριων βημάτων της PCR. Αποδιάταξη (denaturation), σύνδεση (annealing), επιμήκυνση (elongation).

Στο πρώτο βήμα της αντίδρασης γίνεται η αποδιάταξη του δίκλωνου DNA με την αύξηση της θερμοκρασίας στους 94°C για ένα λεπτό, προκειμένου να επιτευχθεί ο διαχωρισμός των αλυσίδων. Στο δεύτερο στάδιο, η θερμοκρασία μειώνεται στους 50-65 °C και μένει σταθερή για 1 λεπτό περίπου, προκειμένου οι εκκινητές να ενωθούν με τις συμπληρωματικές αλληλουχίες πάνω στην αλυσίδα του DNA (υβριδοποίηση). Τέλος, στο τρίτο βήμα, η θερμοκρασία αυξάνεται και πάλι στους 72°C και μένει σταθερή για 1-3 λεπτά. Πραγματοποιείται η ένωση των νουκλεοτιδίων (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) με τη βοήθεια της πολυμεράσης, πάνω στο μόριο του DNA συνθέτοντας εκ νέου την αλυσίδα (επιμήκυνση). Τα βήματα αυτά επαναλαμβάνονται 30-35 φορές ώστε να επιτευχθεί η αντιγραφή του επιθυμητού τμήματος.

1.6.2 Η μέθοδος της *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 έχει 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 διαγενετικές θέσεις σε ολόκληρο το γονιδίωμα. Τα επαναλαμβανόμενα στοιχεία, ενδέχεται να παρουσιάζονται και στις δύο αλυσίδες του DNA και εκκινητές έχουν σχεδιαστεί για την αντιγραφή του DNA, εξωτερικά των επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών. Τα ενισχυμένα αυτά τμήματα αναλύονται στη συνέχεια σε πήκτωμα αγαρόζης, οδηγώντας σε ένα προφίλ που αναφέρεται σαν rep-PCR γενωμικό αποτύπωμα. Αυτά τα αποτυπώματα, μπορούν να παρομοιαστούν με τα πρότυπα «barcodes» που χρησιμοποιούνται στο εμπόριο.

Τα rep-PCR γενωμικά αποτυπώματα που προέρχονται από απομονωμένα στελέχη βακτηρίων, επιτρέπουν την ταυτοποίηση σε επίπεδο γένους, είδους και υποείδους. Επιπλέον των μελετών αυτών οι rep-PCR έχουν καταστεί χρήσιμα εργαλεία για την ταυτοποίηση και ταξινόμηση των βακτηρίων και για επιδημιολογικές και φυλογενετικές μελέτες σε ανθρώπινα και φυτικά παθογόνα (Yamamoto *et al.*, 2000).

1.6.3 Η μέθοδος αποτύπωσης μέσω της αλληλούχησης πολλαπλών γενωμικών περιοχών)

Μία μέθοδος που χρησιμοποιείται σήμερα για τον προσδιορισμό και την ταυτοποίηση μολυσματικών στελεχών που προκαλούν ασθένειες πρωταρχικής σημασίας είναι η μεθοδολογία αποτύπωσης μέσω της αλληλούχησης πολλαπλών γενωμικών περιοχών (*Multilocus Sequence Typing, MLST*), η οποία μπορεί να εφαρμοστεί σε όλα σχεδόν τα βακτηριακά είδη. Η τυποποίηση μέσω της μεθοδολογίας MLST χρησιμοποιεί περισσότερες της μιας γενωμικές περιοχές, σε αντίθεση με την SLST (Single Locus Sequence Typing), και για αυτό τα αποτελέσματά της θεωρούνται πιο αντιπροσωπευτικά. Το μεγαλύτερο πλεονέκτημα της MLST είναι ότι τα αποτελέσματα είναι πραγματικά φορητά, επιτρέποντας έτσι τη δυνατότητα ανταλλαγής δεδομένων μεταξύ των εργαστηρίων (Yamamoto *et al.*, 2000).

1.6.4 Τα γονίδια *gyrB*, *rpoD* και *rpoB*.

Τα κριτήρια για την ταξινόμηση του γένους *Pseudomonas*, έχουν αναθεωρηθεί μαζί με την πρόοδο της ταξινόμησης των βακτηρίων. Σήμερα, η μέθοδος του DNA-DNA υβριδισμού συστήνεται σαν γνώμονας για την ταυτοποίηση των βακτηριακών ειδών, αλλά έχει το μειονέκτημα ότι δεν είναι αποτελεσματική στην εκτίμηση των γενετικών διαφορών μεταξύ ειδών που έχουν μακρινή συγγένεια. Συχνά χρησιμοποιείται η ανάλυση της ακολουθίας του 16S rRNA συμπληρωματικά της μεθόδου DNA-DNA υβριδισμού. Ωστόσο, ο βαθμός ανάλυσης που λαμβάνεται με την ανάλυση της ακολουθίας του 16S rRNA δεν είναι αρκετός ώστε να επιτρέψει την ανάλυση διαγενετικών σχέσεων μέσα στο είδος, λόγω του εξαιρετικά αργού ρυθμού εξέλιξης του (Yamamoto *et al.*, 2000). Εξαιτίας των μειονεκτημάτων που παρουσιάζουν οι δυο αυτές μέθοδοι, στη μελέτη μας αποφασίστηκε να πραγματοποιηθεί η μοριακή ταυτοποίηση των στελεχών του *Pseudomonas corrugata* χρησιμοποιώντας την μεθοδολογία MLST με συνδυασμό των αλληλουχιών των γονιδίων *gyrB*, *rpoD* και *rpoB*.

Το *gyrB* γονίδιο κωδικοποιεί την Β υπομονάδα της DNA γυράσης. Είναι το υπεύθυνο ένζυμο για την εισαγωγή αρνητικών περιελίξεων στα βακτηριακά χρωμοσώματα και παίζει σημαντικό ρόλο στην αναπαραγωγή των χρωμοσωμάτων. Το *rpoD* είναι ένας σ παράγοντας (σ70) που βοηθάει στην δέσμευση της πολυμεράσης στον υποκινητή, για την εκκίνηση της μεταγραφής (Yamamoto *et al.*, 2000). Το γονίδιο

rpoB κωδικοποιεί για την β υπομονάδα της βακτηριακής RNA πολυμεράσης, ένα γονίδιο που κωδικοποιεί ένα μέρος του ενζύμου που συνθέτει RNA. Όλα τα επιλεγμένα γονίδια ανήκουν στον βασικό μεταβολισμό (housekeeping) και υπάρχουν σε ένα μόνο αντίγραφο σε όλα τα βακτήρια (Tayeb, 2005).

1.6.5 Αλληλούχιση DNA (DNA sequencing)

Η αλληλούχιση 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, προστίθενται και διδεοξυνουκλεοτίδια. Όταν ένα διδεοξυνουκλεοτίδιο ενσωματωθεί στην νεοσυνθετιμένη αλυσίδα, η σύνθεση του DNA σταματά. 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 αντίδραση 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).

1.7 Σκοπός της εργασίας

Η εργασία αυτή, έχει ως σκοπό να διερευνήσει και να ταυτοποιήσει σε επίπεδο είδους βακτηριακά στελέχη που προέρχονται από τη συλλογή του εργαστηρίου Φυτοπαθολογίας-Βακτηριολογίας του ΤΕΙ Κρήτης. Όλα τα στελέχη απομονώθηκαν από

συμπτωματικά φυτά τομάτας προσβεβλημένα με την ασθένεια της νέκρωσης της εντεριώνης, το χρονικό διάστημα 1991-2009. Τα στελέχη αυτά επιλέχθηκαν ανάμεσα σε περισσότερα μη φθορίζοντα παθογόνα στελέχη προκαταρκτικά ταυτοποιημένα ως *Pseudomonas* spp. με κριτήριο τον ξενιστή, την περιοχή καλλιέργειας και τη χρονολογία απομόνωσης.

2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν

Τα βακτήρια που χρησιμοποιήθηκαν κατά την διάρκεια της παρούσας εργασίας, προήλθαν από την συλλογή του Εργαστηρίου Φυτοπαθολογίας-Βακτηριολογίας του ΤΕΙ Κρήτης. Πρόκειται για προκαταρκτικά ταυτοποιημένα στελέχη που ανήκουν σε μη φθορίζοντα γένη του *Pseudomonas* spp., τα οποία απομονώθηκαν από το 1991-2009 από φυτά τομάτας και πιπεριάς, με συμπτώματα βακτηριακής νέκρωσης της εντεριώνης (Πίνακας 1). Επιπλέον, στον Πίνακα 2 αναφέρονται τα στελέχη αναφοράς που χρησιμοποιήθηκαν σε διάφορες δοκιμές κατά τη διάρκεια της μελέτης, για συγκριτικούς σκοπούς. Τα στελέχη ανήκουν στα είδη *Pseudomonas corrugata*, *Pseudomonas mediterranea*, *Pseudomonas cichorii*, *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*, *Pseudomonas viridiflava*, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, *Pseudomonas syringae* pv. *alisalensis* και *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Κατά τη διάρκεια των εργασιών, τα βακτηριακά στελέχη όταν χρειάζονταν μεταφυτεύονταν σε θρεπτικό υπόστρωμα NA-G 1% glucose ή σε King's B και διατηρήθηκαν σε καλλιέργειες σωλήνα στους 4 °C.

2.2 Βιοχημική ταυτοποίηση

Αρχικά, όλα τα στελέχη εξετάστηκαν ως προς τις δοκιμές L.O.P.A.T. (παραγωγή levan, δραστηριότητα οξειδάσης, πηκτινόλυση σε ροδέλες πατάτας, αναερόβια διάσπαση αργινίνης, αντίδραση υπερευαισθησίας στον καπνό) και στη συνέχεια χαρακτηρίστηκαν αναλυτικότερα με βάση τις μορφολογικές, φυσιολογικές και βιοχημικές δοκιμές που αναφέρονται στον Πίνακα 10 και Πίνακα 11. Η ταυτοποίηση των απομονώσεων έγινε σύμφωνα με τη μεθοδολογία που ακολουθείται από το εργαστήριο Βακτηριολογίας του ΤΕΙ Κρήτης (Goumas, 1987 & 1999, Schaad, 2001). Ορισμένες βιοχημικές δοκιμές πάρθηκαν ή επιβεβαιώθηκαν με βάση τις δοκιμές API 20NE που πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με τις οδηγίες της BioMerieux SA (Marcy-l'Etoile/France).

Πίνακας 1: Απομονώσεις βακτηριακών στελεχών από ασθενή φυτά με προσβολή από την ασθένεια νέκρωση της εντεριώνης

ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ	ΞΕΝΙΣΤΕΣ	ΠΕΡΙΟΧΗ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ	ΗΜΕΡ/ΝΙΑ
TEIC1022	Τομάτα	Χανιά-Κουντούρα (1)	18/11/1999
TEIC1024	"	"	"
TEIC1025	"	"	"
TEIC1033	Τομάτα	Χανιά-Κουντούρα (2)	"
TEIC1035	"	"	"
TEIC1065	Τομάτα	Ηράκλειο-Πλώρα	29/10/1998
TEIC1066	"	"	"
TEIC1069	Τομάτα	Ηράκλειο-Τυμπάκι	"
TEIC1074	"	"	"
TEIC1077	"	"	"
TEIC1079	"	"	"
TEIC1087	"	"	"
TEIC1095	Τομάτα	Μπενάκειο-Αθήνα (PC14)	1987 ?
TEIC1105	Τομάτα	Ηράκλειο-Βώροι	28/11/1991
TEIC1106	Τομάτα	Ηράκλειο-Τυμπάκι	"
TEIC1109	"	"	"
TEIC1111	Τομάτα	Ηράκλειο-Μοίρες	"
TEIC1112	"	"	"
TEIC1114	Τομάτα	Ηράκλειο	17/4/1995
TEIC1115	"	"	"
TEIC1116	"	"	"
TEIC1117	"	"	"
TEIC1128	"	"	"
TEIC1137	Τομάτα	Ηράκλειο-Τυμπάκι	5/12/2003
TEIC1138	"	"	"
TEIC1145	Πιπεριά	Ιεράπετρα	18/12/2003
TEIC1146	Τομάτα	"	"
TEIC1148	Τομάτα	"	24/2/2004
TEIC1149	"	"	"
TEIC1150	"	"	"
TEIC1151	"	"	"
TEIC1160	Τομάτα	"	2009
TEIC1161	"	"	"

Πίνακας 2: Βακτηριακά στελέχη αναφοράς που χρησιμοποιήθηκαν για συγκριτικούς σκοπούς στις δοκιμές της μελέτης.

ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ	ΚΩΔΙΚΟΣ	ΞΕΝΙΣΤΗΣ	ΠΕΡΙΟΧΗ	ΗΜΕΡ/ΝΙΑ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ
<i>Pseudomonas cichorii</i>	TEIC551	Τομάτα	Κουντούρα	3/1997
	TEIC555	"	"	"
	TEIC556	"	"	"
	SF1047-01 (Type 1)	Μαρούλι	Βέλγιο	-
	SF0057-02 (Type 2)	"	"	-
	SF0119-01 (Type 3)	"	"	-
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>lachrymans</i>	TEIC7017	Αγγουριά	Άρβη	9/12/2011
<i>Pseudomonas viridiflava</i>	TEIC654	Ραδίκι	Ηράκλειο	9/3/2012
	TEIC656	"	"	"
	TEIC273	Σέλινο	Ηράκλειο	28/3/2003
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	TEIC117	Τομάτα	Ιεράπετρα	29/5/2000
<i>Pseudomonas mediterranea</i>	CFBP5447T (1)	Τομάτα	Σικελία	1994
	CFBP5447T (3)	"	"	"
<i>Pseudomonas corrugata</i>	NCPPB2445	"	Ην. Βασίλειο	1973
<i>P.s.</i> pv. <i>alisalensis</i>	CFBP6866A	Ρέβα	Η. Π. Α.	1995
<i>Clavidacter michiganensis</i> pv. <i>michiganensis</i>	TEIC4263	Τομάτα	Κόρινθος	12/9/2008

2.3 Ορολογική ταυτοποίηση

Η ορολογική ταυτοποίηση των επιλεχθέντων βακτηριακών στελεχών, πραγματοποιήθηκε με βάση τη μέθοδο του έμμεσου ανοσοφθορισμού. Η μέθοδος αυτή

αποτελεί τεχνική κατά την οποία τα ειδικά αντισώματα του προς ανίχνευση παθογόνου συνδέονται με τα εξειδικευμένα αντιγόνα του προς ανίχνευση βακτηρίου, τα οποία σε μια επόμενη διαδικασία συνδέονται με μια φθορίζουσα ουσία. Έτσι, γίνεται ορατή η ειδική αναγνώρισή τους σε οπτικό πεδίο μικροσκοπίου με επισκοπικό φθορισμό. Χρησιμοποιήθηκε ο αντιορός anti-PC14 του εργαστηρίου Φυτοπαθολογίας-Βακτηριολογίας του ΤΕΙ Κρήτης, ο οποίος παρασκευάστηκε με το στέλεχος PC14 (TEIC1095) (Βολατσάκα, 1990), σε αραιώση 1/400 ή/και 1/800 και το φθορίζον σύμπλοκο Alexa Fluor 488 goat anti rabbit IgG (Molecular Probes, USA) σε αραιώση 1/100. Η διαδικασία εκτέλεσης της μεθόδου πραγματοποιήθηκε σε αντικειμενοφόρο πλάκα ανοσοφθορισμού με 10 φατνία και σε όγκους αντιδραστηρίων των 15μl, σύμφωνα με τη μεθοδολογία του εργαστηρίου (Γκούμας, 2011).

2.4 Δοκιμές παθογένειας

Αρχικά, όλα τα στελέχη εξετάστηκαν ως προς την ικανότητα έκλυσης αντίδρασης υπερευαισθησίας (HR) σε φύλλα φυτών καπνού (cv. *Xanthi*), με τη μέθοδο της έκχυσης βακτηριακού αιωρήματος συγκέντρωσης 10^8 cfu/ml με τη βοήθεια σύριγγας. Η παρασκευή των αιωρημάτων έγινε σε αποσταγμένο και αποστειρωμένο νερό με την βοήθεια αποστειρωμένης οδοντογλυφίδας, από καλλιέργεια 48 ωρών σε θρεπτικό υπόστρωμα NA-G 1% glucose. Τα φυτά μετά την έκχυση καλύφθηκαν με διάφανες πλαστικές σακούλες για την διατήρηση της σχετικής υγρασίας σε υψηλό επίπεδο και θερμοκρασίας περίπου 25°C. Μετρήσεις για την πρόκληση αντίδρασης υπερευαισθησίας λήφθηκαν μετά από 24 ή 48 ώρες. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκαν μολύνσεις σε ροδέλες πατάτας με σκοπό την εξέταση της παραγωγής πηκτινολυτικών ενζύμων. Αφού έγινε εξωτερική απολύμανση των κονδύλων της πατάτας με οινόπνευμα και αφαίρεση του φλοιού ασηπτικά, οι κόνδυλοι τεμαχίστηκαν σε ροδέλες και τοποθετήθηκαν σε τριβλία Petri, στα οποία είχε τοποθετηθεί αποστειρωμένο διηθητικό χαρτί. Σε κάθε ροδέλα πατάτας με αποστειρωμένη οδοντογλυφίδα τοποθετήθηκε μικρή ποσότητα καλλιέργειας βακτηρίου από τα στελέχη, προκαλώντας ταυτόχρονα πληγή στο κέντρο της ροδέλας της πατάτας. Αφού προστέθηκε αποστειρωμένο και αποσταγμένο νερό στα τριβλία, κλείστηκαν και τοποθετήθηκαν σε θάλαμο επώασης στους 25°C για την εκδήλωση της μόλυνσης (σήψη), η οποία εκτιμήθηκε σε διάστημα 48 ωρών.

Τεχνητές μολύνσεις πραγματοποιήθηκαν σε φυτά τομάτας καθώς και σε

χρυσάνθεμα, στο στάδιο των 3-4 πραγματικών φύλλων. Οι μολύνσεις στα νεαρά φυτά έγιναν με βακτηριακή καλλιέργεια 24-48 ωρών σε θρεπτικό υπόστρωμα NA-G 1% glucose. Η καλλιέργεια λήφθηκε με το άκρο αποστειρωμένης οδοντογλυφίδας και τη βύθιση αυτής, με πλάγια κλίση, σε βάθος 0,5 εκατοστών στο στέλεχος των φυτών. Τα σημεία στα οποία έγινε η μόλυνση καλύφθηκαν με ειδική ταινία parafilm, στη συνέχεια τα φυτά παρέμειναν για 48 ώρες σε συνθήκες υψηλής υγρασίας (90-100%) σε θερμοκρασία εργαστηρίου (περίπου 23°C) και αργότερα μεταφέρθηκαν σε θερμοκήπιο σε συνθήκες υγρασίας 60-70% και θερμοκρασίας 15-26°C περίπου. Μετρήσεις λαμβάνονταν για 10-15 περίπου ημέρες (Εικ. 23, 24).

Τέλος, τεχνητές μολύνσεις πραγματοποιήθηκαν σε ανεπτυγμένα φυτά τομάτας ευρισκόμενα στο στάδιο του 8^{ου} με 9^{ου} πραγματικού φύλλου και τα οποία αναπτύσσονταν ανά δύο σε γλάστρες τριών λίτρων. Τα μολύσματα παρασκευάστηκαν σε αποσταγμένο και αποστειρωμένο νερό, από βακτηριακή καλλιέργεια 48 ωρών σε θρεπτικό υπόστρωμα NA-G 1% glucose. Στις μολύνσεις αυτές επιλέχθηκαν και χρησιμοποιήθηκαν τα στελέχη TEIC1117, TEIC1035, TEIC1025, TEIC1150, TEIC1033, TEIC1145, TEIC1160, TEIC1105, TEIC1112, TEIC1115, TEIC1149, TEIC1124, TEIC1161, TEIC1077 και τα στελέχη αναφοράς NCPPB2445, CFBP5447T (1), CFBP5447T (3), TEIC1095, TEIC551, TEIC555, SF1047-01/Type1, SF0057-02/Type2, SF0119-01/Type3 και TEIC273. Στη συνέχεια, στο πρώτο φυτό, η μόλυνση έγινε με έγχυση 100μl βακτηριακού αιωρήματος συγκέντρωσης 10⁸ cfu/ml με τη βοήθεια σύριγγας, στο ύψος του δεύτερου κόμβου στη θέση πρόσφυσης του μίσχου του αντίστοιχου φύλλου. Στο δεύτερο φυτό η μόλυνση πραγματοποιήθηκε με την τοποθέτηση, σε πλάγια θέση στην ίδια περιοχή του φυτού, σύριγγας που περιείχε βακτηριακό αιώρημα 0,5 ml συγκέντρωσης 10⁸ cfu/ml, η οποία προσαρμόστηκε πάνω στο φυτό, ώστε το αιώρημα να εισέρχεται στο εσωτερικό του σταδιακά (Εικ. 25- 26). Τα φυτά παρέμειναν στο θερμοκήπιο σε συνθήκες υγρασίας 60-70% και θερμοκρασίας 15-26°C περίπου, για διάστημα τριών μηνών στη διάρκεια των οποίων λαμβάνονταν παρατηρήσεις. Μετά το πέρας των τριών μηνών, τα φυτά εξετάστηκαν αναλυτικά, τμήματά τους μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο, όπου έγινε απομόνωση του παθογόνου, με σκοπό την ολοκλήρωση των αρχών του Koch.

2.4. Μοριακή ταυτοποίηση απομονώσεων του βακτηρίου *Pseudomonas corrugata*

2.4.1 Δημιουργία υγρής καλλιέργειας για απομόνωση DNA

Τα στελέχη του βακτηρίου *Pseudomonas corrugata* που επιλέχθηκαν για τη μοριακή ταυτοποίηση του παθογόνου παρουσιάζονται στον Πίνακα 1, καθώς και τα βακτηριακά στελέχη *Pseudomonas mediterranea* CFBP5447T (1) και CFBP5447T (3) και *Pseudomonas corrugata* NCPPB2445. Με την βοήθεια βακτηριακού κρίκου (λούπα) εμβολιάστηκαν σε δοκιμαστικούς σωλήνες που περιείχαν 4ml υγρό θρεπτικό καλλιέργειας Lysogeny Broth ή Luria-Bertani (10gr Bacto-tryptone, 5gr Bacto-yeast extract, 10gr NaCl, pH 7.0) με βακτηριακά κύτταρα του παθογόνου. Οι υγρές καλλιέργειες τοποθετήθηκαν σε θάλαμο επώασης, με ανάδευση και επώαστηκαν για 48h στους 27°C.

2.4.2 Απομόνωση ολικού DNA από βακτηριακά κύτταρα

Η απομόνωση DNA από υγρές καλλιέργειες των βακτηριακών στελεχών έγινε με την βοήθεια του συστήματος DNeasy Blood and Tissue Kit της εταιρείας QIAGEN. Αρχικά, 2ml από κάθε καλλιέργεια τοποθετήθηκαν σε αποστειρωμένο δοκιμαστικό σωλήνα (τύπου Falcon) και ακολούθησε φυγοκέντρωση για 10 λεπτά στις 7500 στροφές. Στην συνέχεια απορρίφθηκε το υπερκείμενο και προστέθηκαν 180μl ρυθμιστικού διαλύματος ATL και τα διαλύματα τοποθετήθηκαν σε αποστειρωμένα σωληνάρια χωρητικότητας 2ml. Προστέθηκαν 20μl πρωτεΐνωση K, αναδεύτηκαν σθεναρά και επώαστηκαν για 2 ώρες σε υδατόλουτρο στους 56°C μέχρι να ολοκληρωθεί η λύση των βακτηριακών κυττάρων (κατά την διάρκεια της επώασης γινόταν ανάδευση ανά τακτά χρονικά διαστήματα). Μετά το τέλος της επώασης τα δείγματα αναδεύτηκαν για 15 δευτερόλεπτα και προστέθηκαν 200μl ρυθμιστικό διάλυμα AL και αναδεύτηκαν. Μετά την προσθήκη 200μl αιθανόλης και εκ νέου ανάδευση, τοποθετήθηκαν σε στήλες απομόνωσης και φυγοκεντρήθηκαν για 1 λεπτό στις 8000 στροφές. Αφού απορρίφθηκε το υπερκείμενο προστέθηκαν 500μl ρυθμιστικού διαλύματος AW1 και φυγοκεντρήθηκαν για 1 λεπτό στις 8000 στροφές. Και πάλι απορρίφθηκε το υπερκείμενο και προστέθηκαν 500μl ρυθμιστικού διαλύματος AW2 και φυγοκεντρήθηκαν για 3 λεπτά στις 14.000 στροφές. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε αποστειρωμένα φιαλίδια τύπου Eppendorf. Για την απομόνωση του DNA, προστέθηκαν 200μl ρυθμιστικό διάλυμα AE και τα δείγματα επώαστηκαν σε

θερμοκρασία δωματίου για 1 λεπτό. Μετά από φυγοκέντρηση για ένα λεπτό στις 8000 στροφές το διάλυμα του DNA αποθηκεύτηκε στους -20°C.

2.4.3 Ηλεκτροφόρηση απομονωμένου DNA σε πήκτωμα αγαρόζης

Για να διαπιστωθεί η απομόνωση του DNA από τα βακτηριακά στελέχη, έγινε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης. Η συγκέντρωση της αγαρόζης που χρησιμοποιήθηκε ήταν 0.8%. Σε 50 ml ρυθμιστικού διαλύματος 0.5x TBE (TrisCl, Boric acid, EDTA), διαλύθηκαν 0.4 g αγαρόζης με θέρμανση σε φούρνο μικροκυμάτων και στην συνέχεια προστέθηκαν 2 μl χρωστικής βρωμιούχου αιθυδίου (0,5μg/ml). Το διάλυμα της αγαρόζης, αφήθηκε να πολυμεριστεί για περίπου 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου στη συσκευή ηλεκτροφόρησης, και προστέθηκε διάλυμα TBE αφού είχε τοποθετηθεί χτενάκι για να δημιουργηθούν οι θέσεις τοποθέτησης των δειγμάτων. Μετά τον πολυμερισμό, στα «πηγαδάκια» τοποθετήθηκαν 5 μl από το απομονωμένο DNA των στελεχών καθώς και 1 μl χρωστικής. Στη συνέχεια ακολούθησε η ηλεκτροφόρηση για 45 λεπτά σε 55 V. Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε λ DNA κομμένο με το περιοριστικό ένζυμο *Pst*I. Μετά την ολοκλήρωση της ηλεκτροφόρησης, το πήκτωμα τοποθετήθηκε σε τράπεζα υπερϊώδους ακτινοβολίας για παρατήρηση.

2.4.4 Φωτομέτρηση των δειγμάτων

Για την πραγματοποίηση των αντιδράσεων PCR, έπρεπε να υπολογιστούν οι συγκεντρώσεις του DNA των βακτηριακών στελεχών. Η μέτρηση αυτή πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Φυτών του Πανεπιστημίου Κρήτης με την βοήθεια νανοφωτόμετρου (Nanodrop). Στην ειδική ακίδα δειγματοληψίας, τοποθετήθηκε 1 μl του υπό ανάλυση δείγματος, και η μέτρησή του καταγράφηκε με την βοήθεια ειδικού προγράμματος σε ηλεκτρονικό υπολογιστή. Στο τέλος της κάθε μέτρησης, η ακίδα καθαρίζονταν ελαφρά με απορροφητικό χαρτί. Ακολούθησε η ίδια διαδικασία για όλα τα προς ανάλυση δείγματα. Μετά την φωτομέτρηση, τα δείγματα αραιώθηκαν, έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση όλων των δειγμάτων να είναι ίδια και ίση με 50 ng/μl.

2.5 Αλσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR)

Για την μοριακή ταυτοποίηση των στελεχών του παθογόνου εφαρμόστηκαν οι παρακάτω τεχνικές PCR μοριακού αποτυπώματος: PC1 και PC5, BOX και ERIC-PCR, *gyrB*-PCR, *rpoD*-PCR, και *rpoB*-PCR.

2.5.1 Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για τις αντιδράσεις PCR

Για την διεξαγωγή των αντιδράσεων PCR, χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές της εταιρίας VBC-Biotech. Για τις PC1 και PC5, τις BOX και ERIC αντιδράσεις PCR, χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές PC1/1, PC1/2 και PC5/1, PC5/2, BOXA1R και ERIC1R/ERIC2 αντίστοιχα. Για την ενίσχυση του γονιδίου *gyrB* χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές UP-1E/APrU με μέγεθος ενισχυόμενου τμήματος τα 840 bp. Οι εκκινητές για την ενίσχυση του γονιδίου *rpoD* ήταν οι PnRpoD1/PnRpoD2 με μέγεθος ενισχυόμενου τμήματος τα 615 bp, ενώ για το *rpoB* χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές LAPS/LAPS27 με μέγεθος ενισχυόμενου τμήματος τα 1250 bp. Στον Πίνακα 3 αναφέρονται αναλυτικά οι αλληλουχίες και τα μεγέθη των εκκινητών.

Πίνακας 3. Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για τις αντιδράσεις PCR

Εκκινητές	Κατεύθυνση	Αλληλουχία εκκινητών 5'→3'	Μέγεθος ενισχυόμενου τμήματος
PC1/1	Fw	GGATATGAGCCAGGTCTTCG	1100bp
PC1/2	Rv	CGCTCAAGCGCGACTTCAG	
PC5/1	Fw	CCACAGGACAACATGTCCAC	600bp
PC5/2	Rv	CAGGCGCTTTCTGGAACATG	
BOXA1R		CTACGGCAAGGCGACGCTGACG	
ERIC1R	Fw	ATGTAAGCTCCTGGGGATTCAC	
ERIC2	Rv	AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG	
PnRpoD1	Fw	TGGCCGAGAACCAGTTCGCGT	615bp
PnRpoD2	Rv	CGGCTTCGTCCAGCTTGTTCAG	
UP-1E	Fw	CAGGAAACAGCTATGACCAYGNSNGGNGNAARTTYRA	840bp
APrU	Rv	TGTA AACGACGCGCCAGTGCNGGRTCYTTYTCYTGRCA	
LAPS	Fw	TGGCCGAGAACCAGTTCGCGT	1250bp
LAPS27	Rv	CGGCTTCGTCCAGCTTGTTCAG	

2.6 Αντιδράσεις PCR

Για όλες τις αντιδράσεις PCR χρησιμοποιήθηκε ο θερμικός κυκλοποιητής Mastercycler Gradient της εταιρίας Eppendorf (Εικ. 3). Για τις PCR με τους εκκινητές PC1/PC5 και για τις rep-PCR χρησιμοποιήθηκαν όλα τα στελέχη που αναφέρονται αναλυτικά στον Πίνακα 1 και ως στελέχη αναφοράς τα στελέχη του *Pseudomonas mediterranea* CFBP5447T (1) και CFBP5447T (3) και του *Pseudomonas corrugata* NCPPB2445. Για την ενίσχυση των γονιδίων *gyrB*, *rpoD* και *rpoB* χρησιμοποιήθηκαν τα εξής στελέχη: *Pseudomonas mediterranea* CFBP5447T (1), *Pseudomonas corrugata*

NCPPB2445 και τα στελέχη TEIC1087, TEIC1095, TEIC1106, TEIC1112, TEIC1116 και TEIC1148.



Εικόνα 3. Θερμικός κυκλοποιητής Mastercycler Gradient της εταιρίας Eppendorf

2.6.1 PC1 και PC5-PCR

Αρχικά πραγματοποιήθηκε η PC1 και PC5 αντίδραση PCR με τους εκκινητές PC1/1, PC1/2 και PC5/1, PC5/2. Οι συνθήκες για την αντίδραση ήταν οι εξής: 5 λεπτά στους 94°C για να γίνει η αρχική αποδιάταξη του DNA. Στη συνέχεια ακολούθησαν 30 κύκλοι που ο καθένας αποτελείτο από: 30 δευτερόλεπτα στους 94°C, 1 λεπτό στους 62°C και 90 δευτερόλεπτα στους 72°C. Με το πέρας των 30 κύκλων, ακολούθησαν 5 λεπτά στους 72°C. Στον Πίνακα 4 αναφέρονται αναλυτικά τα αντιδραστήρια και οι ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν στην αντίδραση.

Πίνακας 4. Σύσταση αντιδραστηρίων PC1 και PC5-PCR σε γενωμικό DNA βακτηριακών στελεχών

Αντιδραστήριο	Ποσότητα ανά αντίδραση	Τελική συγκέντρωση
DNA template	2 μ l	100 ngr
Kapa Buffer (10x)	2,5 μ l	1 x
dNTPs (από 10 mM)	0,5 μ l	0,2 mM
PC1/1-PC1/2 (100 mM)	0,1 μ l	0,4 mM
PC5/1-PC5/2 (100 mM)	0,1 μ l	0,4 mM
Taq DNA Polymerase 5units/ μ l	0,2 μ l	1 unit
ddH ₂ O	19,6 μ l	
Τελικός όγκος	25 μ l	

2.6.2 BOX και ERIC-PCR

Έπειτα, πραγματοποιήθηκε ger-PCR με τον εκκινητή BOXA1R για την BOX-PCR και τους εκκινητές ERIC1R/ERIC2 για την ERIC-PCR. Οι συνθήκες ήταν ίδιες και για τις δύο αντιδράσεις με το εξής πρόγραμμα: 7 λεπτά στους 95°C για να γίνει η αρχική αποδιάταξη του DNA. Στη συνέχεια ακολούθησαν 30 κύκλοι που ο καθένας αποτελείται από: 1 λεπτό στους 95°C, 30 δευτερόλεπτα στους 53°C, 5 λεπτά στους 72°C. Με το πέρας των 30 κύκλων, ακολούθησαν 15 λεπτά στους 72°C. Στους Πίνακες 5 και 6 αναφέρονται αναλυτικά τα αντιδραστήρια και οι ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν για τις αντιδράσεις.

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

Αντιδραστήριο	Ποσότητα ανά αντίδραση	Τελική συγκέντρωση
DNA template	2 μ l	100 ngr
Kapa Buffer (10x)	2,5 μ l	1 x
BOXA1R (50 pMol)	0,25 μ l	0,625pMol
dNTPs (από 10 mM)	0,5 μ l	0,25mM
Taq DNA Polymerase 5units/ μ l	0,3 μ l	1,5units
ddH ₂ O	19,95 μ l	
Τελικός όγκος	25 μ l	

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

Αντιδραστήριο	Ποσότητα ανά αντίδραση	Τελική συγκέντρωση
DNA template	2 μ l	100 ngr
Kapa Buffer	2 μ l	1 x
ERIC1R (50 pMol)	0,25 μ l	0,625pMol
ERIC2 (50 pMol)	0,25 μ l	0,625pMol
dNTPs (από 10 mM)	0,5 μ l	0,25mM
Taq DNA Polymerase 5units/ μ l	0,3 μ l	1,5units
ddH ₂ O	19,7 μ l	
Τελικός όγκος	25 μ l	

2.6.3 *gyrB*-PCR

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε PCR για την ενίσχυση του γονιδίου *gyrB* με τους εκκινητές UP-1E/APrU. Οι συνθήκες της αντίδρασης ρυθμίστηκαν με το πρόγραμμα που περιγράφεται παρακάτω: 5 λεπτά στους 94°C. Στη συνέχεια ακολούθησαν 35 κύκλοι που ο καθένας αποτελείται από: 1 λεπτό στους 94°C, 1 λεπτό στους 57°C, 2 λεπτά στους 72°C. Με το πέρας των 35 κύκλων, ακολούθησαν 10 λεπτά στους 72°C. Στον Πίνακα 7 αναφέρονται αναλυτικά τα αντιδραστήρια και οι ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν για την αντίδραση.

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

Αντιδραστήριο	Ποσότητα ανά αντίδραση	Τελική συγκέντρωση
DNA template	2 μ l	100 ngr
Kapa Buffer	2 μ l	1 x
UP-1E (100 pMol)	0,25 μ l	0,625pMol
APrU (100 pMol)	0,25 μ l	0,625pMol
dNTPs (από 10 mM)	0,5 μ l	0,25mM
MgCl ₂ (από 25 mM)	0,8 μ l	1 mM
Taq DNA Polymerase 5u/ μ l	0,3 μ l	1,5units
ddH ₂ O	13, 9 μ l	
Τελικός όγκος	20 μ l	

2.6.4 *rpoD* -PCR

Έπειτα, πραγματοποιήθηκε PCR για την ενίσχυση του γονιδίου *rpoD* με τους εκκινητές PnRpoD1/PnRpoD2. Οι συνθήκες της αντίδρασης ρυθμίστηκαν με το πρόγραμμα που περιγράφεται παρακάτω: 5 λεπτά στους 94°C. Στη συνέχεια ακολούθησαν 35 κύκλοι που ο καθένας αποτελείται από: 1 λεπτό στους 94°C, 1 λεπτό στους 57°C, 2 λεπτά στους 72°C. Με το πέρας των 35 κύκλων, ακολούθησαν 10 λεπτά στους 72°C. Στον Πίνακα 8 αναφέρονται αναλυτικά τα αντιδραστήρια και οι ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν για την αντίδραση.

2.6.5 *rpoB* -PCR

Έπειτα, πραγματοποιήθηκε PCR για την ενίσχυση του γονιδίου *rpoB* με τους εκκινητές PnRpoD1/PnRpoD2. Οι συνθήκες της αντίδρασης ρυθμίστηκαν με το πρόγραμμα που περιγράφεται παρακάτω: 3 λεπτά στους 94°C για να γίνει η αρχική αποδιάταξη του DNA. Στη συνέχεια, ακολούθησαν 40 κύκλοι που ο καθένας αποτελείται από: 30 δευτερόλεπτα στους 94°C, 30 δευτερόλεπτα στους 57°C, 1 λεπτό στους 72°C. Με το πέρας των 40 κύκλων, ακολούθησαν 5 λεπτά στους 72°C. Στον Πίνακα 9 αναφέρονται αναλυτικά τα αντιδραστήρια και οι ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν για την αντίδραση.

Πίνακας 8. Σύσταση αντιδραστηρίων *rpoD*-PCR σε γενωμικό DNA βακτηριακών στελεχών

Αντιδραστήριο	Ποσότητα ανά αντίδραση	Τελική συγκέντρωση
DNA template	2 µl	100 ngr
Kapa Buffer	2 µl	1x
PnRpoD1 (100 pMol)	0,25 µl	0,625pMol
PnRpoD2 (100 pMol)	0,25µl	0,625pMol
dNTPs (από 10 mM)	0,5 µl	0,25mM
MgCl ₂ (από 25 mM)	0,8 µl	1 mM
Taq DNA Polymerase 5u/µl	0,3 µl	1,5units
ddH ₂ O	13,9 µl	
Τελικός όγκος	20 µl	

Πίνακας 9. Σύσταση αντιδραστηρίων *rpoB*-PCR σε γενωμικό DNA βακτηριακών στελεχών

Αντιδραστήριο	Ποσότητα ανά αντίδραση	Τελική συγκέντρωση
DNA template	2 µl	100 ngr
Kapa Buffer	2 µl	1x
LAPS (100 pMol)	0,08 µl	0,4 pMol
LAPS27 (100 pMol)	0,08 µl	0,4 pMol
dNTPs (από 10 mM)	0,4 µl	0,2 mM
MgCl ₂ (από 25 mM)	1,2 µl	1,5 mM
Taq DNA Polymerase 5u/µl	0,2 µl	1 unit
ddH ₂ O	14, 04 µl	
Τελικός όγκος	20 µl	

2.6.6 Επιβεβαίωση των προϊόντων της PCR με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1, 3% w/v

Για την ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε πήκτωμα αγαρόζης, συγκέντρωσης 1.3% w/v. Σε 100 ml ρυθμιστικού διαλύματος 0,5x TBE, διαλύθηκαν 1,3 g αγαρόζης με θέρμανση σε φούρνο μικροκυμάτων και στην συνέχεια προστέθηκαν 5 ml χρωστικής βρωμιούχο αιθίδιο. Το διάλυμα της αγαρόζης, αφέθηκε να πολυμεριστεί για περίπου 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου στη συσκευή ηλεκτροφόρησης και προστέθηκε διάλυμα TBE αφού είχε τοποθετηθεί χτενάκι για να δημιουργηθούν οι θέσεις τοποθέτησης των δειγμάτων. Μετά τον πολυμερισμό, τα δείγματα τοποθετήθηκαν στα «πηγαδάκια» και ακολούθησε η ηλεκτροφόρηση για 90 λεπτά σε 100 V. Η ποσότητα των δειγμάτων που φορτώθηκε ήταν 5 μl και ως μάρτυρας για την εκτίμηση του μεγέθους των ζωνών χρησιμοποιήθηκε DNA του φάγου λ κομμένο με το περιοριστικό ένζυμο *Pst*I. Μετά την ολοκλήρωση της ηλεκτροφόρησης, το πήκτωμα τοποθετήθηκε στην τράπεζα 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). Αναλυτικά η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η εξής: Το πήκτωμα της αγαρόζης που περιείχε τις επιθυμητές ζώνες του DNA, τοποθετήθηκε σε τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας και με νυστέρι αφαιρέθηκαν τα τμήματα που έφεραν τις επιθυμητές ζώνες. Στη συνέχεια, τα κομμάτια του πηκτώματος τοποθετήθηκαν σε σωλίνες τύπου Eppendorf και αφού ζυγίστηκαν, προστέθηκε ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος NT (Binding Buffer) ίση με δύο φορές το βάρος του πηκτώματος σε μl. Ακολούθησε επώαση των δειγμάτων στο υδατόλουτρο για 10 λεπτά στους 50°C, έτσι ώστε το κομμάτι της αγαρόζης να διαλυθεί τελείως. Κάθε 2-3 λεπτά, γινόταν ανάδευση των δειγμάτων.

Μετά το τέλος της επώασης, τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε στήλες διαχωρισμού οι οποίες τοποθετήθηκαν μέσα σε σωλίνες συλλογής των 2 ml και φυγοκεντρήθηκαν για ένα λεπτό στις 11.000 στροφές/λεπτό. Στη συνέχεια, οι σωλίνες

συλλογής, αφαιρέθηκαν μαζί με το υπερκείμενο και οι στήλες διαχωρισμού τοποθετήθηκαν σε νέους σωλήνες συλλογής των 2 ml. Στη συνέχεια προστέθηκαν 700 μl ρυθμιστικού διαλύματος NT3 (Wash Buffer). 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. Οι στήλες διαχωρισμού τοποθετήθηκαν προσεκτικά σε αποστειρωμένους σωλήνες τύπου Eppendorf των 2 ml και προστέθηκε ποσότητα νερού που κυμαινόταν ανάλογα με το βάρος των δειγμάτων (180-260 μl), και επώαστηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για περίπου ένα λεπτό για να αυξηθεί η ποσότητα του εκλούμενου DNA. Στη συνέχεια, τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν, για ένα λεπτό στις 11.000 στροφές/λεπτό και αποθηκεύτηκαν στους -20 °C μέχρι να γίνει η αλληλούχισή τους.

3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Βιοχημική ταυτοποίηση

Τα στελέχη που επανακαλλιεργήθηκαν από τη συλλογή του εργαστηρίου Βακτηριολογίας του ΤΕΙ Κρήτης εμφάνισαν σε θρεπτικό υπόστρωμα NA-G 1% glucose, μορφολογικό φαινότυπο όμοιο με εκείνο των ταυτοποιημένων στελεχών αναφοράς του *Pseudomonas corrugata* TEIC1095 και NCPPB2445 και του *Pseudomonas mediterranea* CFBP5447T. Οι αποικίες των βακτηριακών στελεχών ήταν στρογγυλές, ελαφρώς ρυτιδωμένες περιφερειακά, βλεννώδους υφής και κιτρινωπές, ενώ συχνά παράγουν μια διαχεόμενη κιτρινοπράσινη χρωστική χωρίς φθορισμό (Εικ. 29). Η ρυτίδωση ήταν πιο εμφανής στην κάτω επιφάνεια της αποικίας. Ορισμένες αποικίες από το στέλεχος CFBP5447T του *Pseudomonas mediterranea* εμφανίζουν φαινότυπο αποικίας χωρίς ρυτίδωση και χωρίς έντονη κιτρινοπράσινη διαχεόμενη χρωστική (Εικ. 30). Όμως, η διαφορά αυτή δε διαφοροποίησε τα στελέχη σε βιοχημικό, ορολογικό σε μοριακό επίπεδο και παθογένειας, όπως προκύπτει στη συνέχεια της εργασίας. Στο θρεπτικό υλικό King's B, δεν ανιχνεύτηκε παραγωγή φθορίζουσας χρωστικής ουσίας, μετά από εξέταση των καλλιεργειών σε υπεριώδη ακτινοβολία (366nm). Όλα τα στελέχη είναι αερόβιοι μικροοργανισμοί σύμφωνα με τη δοκιμή αναερόβιωσης σε θρεπτικό υπόστρωμα των Hugh et Leifson's. Στις δοκιμές L.O.P.A.T., όλα τα στελέχη της συλλογής και τα στελέχη αναφοράς βρέθηκαν να είναι αρνητικά στην παραγωγή levan και στη σήψη κονδύλων πατάτας, ενώ θετικά βρέθηκαν στη παραγωγή οξειδάσης, ενώ ποικίλουν ως προς την στην αναερόβια διάσπαση της αργινίνης και τέλος, προκάλεσαν την έκλυση τυπικής αντίδρασης υπερευαισθησίας σε φύλλα καπνού σε 24-48 ώρες.

Στον Πίνακα 10 παρουσιάζονται τα αναλυτικά αποτελέσματα των μορφολογικών, βιοχημικών και φυσιολογικών δοκιμών, για την ταυτοποίηση των επιλεχθέντων βακτηριακών στελεχών. Επιπλέον, εμφανίζονται και τα αποτελέσματα με τα στελέχη αναφοράς των *Pseudomonas mediterranea* CFBP5447T (1) και CFBP5447T (3), *Pseudomonas corrugata* TEIC1095 και NCPPB2445, *Pseudomonas viridiflava* TEIC273, *Pseudomonas cichorii* (TEIC555, TEIC556, SF1047-01/Type1 και SF0057-02/Type2), *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (TEIC117) και *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* (TEIC7017) που χρησιμοποιήθηκαν συγκριτικά. Όπως προκύπτει από τα αποτελέσματα τα βακτηριακά στελέχη που εξετάστηκαν εμφάνισαν μορφολογικό, βιοχημικό και φυσιολογικό φαινοτυπικό προφίλ παρόμοιο με εκείνο που

αναφέρεται σε άλλες μελέτες για το βακτήριο *Pseudomonas corrugata* και *Pseudomonas mediterranea*. Από τα 36 συνολικά βακτήρια από φυτά με συμπτώματα νέκρωσης της εντεριώνης που εξετάστηκαν, 28 στελέχη διαφοροποιούνται ως προς τη χρησιμοποίηση της ισταμίνης, του 2-κετογλουκονικού νατρίου και του μεσο-τρυγικού νατρίου και μεταξύ αυτών ομαδοποιούνται και τα δύο στελέχη CFBP5447T (1) και CFBP5447T (3) του *Pseudomonas mediterranea*. Τα υπόλοιπα οκτώ ομαδοποιούνται σε μια δεύτερη ομάδα μεταξύ των οποίων είναι τα στελέχη αναφοράς TEIC1095 και NCPPB2445 του *Pseudomonas corrugata*. Τα υπόλοιπα στελέχη αναφοράς που εξετάστηκαν και ανήκαν σε άλλα είδη στο γένος *Pseudomonas*, εμφάνισαν τον αναμενόμενο μορφολογικό, βιοχημικό και φυσιολογικό φαινότυπο του είδους που ανήκουν.

Επιπλέον, τα βακτηριακά στελέχη *Pseudomonas mediterranea* CFBP5447T (1), CFBP5447T (3), TEIC1024, TEIC1105, TEIC1106, *Pseudomonas corrugata* NCPPB2445, TEIC1095, TEIC1111, TEIC1112 και τα στελέχη αναφοράς *Pseudomonas viridiflava* TEIC273, TEIC656 και *Pseudomonas cichorii* TEIC551, TEIC555, TEIC556, SF1047-01/Type 1, SF0057-02/Type 2, SF0119-01/Type 3, εξετάστηκαν ως προς τις βιοχημικές αντιδράσεις τους στις δοκιμές API 20NE και τα αποτελέσματα αναφέρονται στον Πίνακα 11 (Εικ. 31). Διαπιστώθηκε ότι οι δοκιμές αυτές δεν είναι ικανές να διαφοροποιήσουν τα στελέχη του *Pseudomonas mediterranea* με εκείνα του *Pseudomonas corrugata*. Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα, τα στελέχη των δύο ομάδων εμφανίζουν 36 όμοια αποτελέσματα σε σύνολο 39 δοκιμών, δηλαδή ποσοστό ομοιότητας 92%. Το ποσοστό όμοιων δοκιμών μειώνεται στο 46% σε σχέση με τα στελέχη *Pseudomonas viridiflava* και του *Pseudomonas cichorii* (18 όμοιες δοκιμές στις 39) και στο 48% με τα στελέχη του *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* ή pv. *lachrymans*.

3.2 Ορολογική ταυτοποίηση βακτηριακών στελεχών

Από τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στον Πίνακα 12, στη δοκιμή του ανοσοφθορισμού, προκύπτει ότι 28 από τα 36 στελέχη δεν αντέδρασαν με τον αντιγόνο anti-PC 14, ο οποίος παρασκευάστηκε με το στέλεχος PC14 (TEIC1095) του *Pseudomonas corrugata*, ενώ αντίθετα οκτώ αντέδρασαν θετικά δίνοντας τον τυπικό φθορισμό (Εικ. 32). Η ομαδοποίηση που προκύπτει με βάση το αποτέλεσμα στην αντίδραση ανοσοφθορισμού, είναι όμοια με εκείνη των φαινοτυπικών

χαρακτηριστικών, αφού τα ίδια στελέχη ομαδοποιούνται στις ίδιες ομάδες. Κανένα από τα στελέχη αναφοράς τα οποία χρησιμοποιήθηκαν συγκριτικά δεν αντέδρασαν ορολογικά.

3.3 Δοκιμές παθογένειας

Προκαταρκτικά, όλα τα βακτηριακά στελέχη, εξετάστηκαν ως προς την ικανότητα έκλυσης αντίδρασης υπερευαισθησίας (HR) και έδωσαν την τυπική αντίδραση υπερευαισθησίας, σε φύλλα φυτών καπνού (cv. *Xanthi*) σε διάστημα 24 μέχρι 48 ώρες. Επιπλέον πραγματοποιήθηκαν μολύνσεις σε ροδέλες πατάτας με σκοπό την εξέταση της παραγωγής πηκτινολυτικών ενζύμων. Κανένα από τα στελέχη δεν προκάλεσε σήψη στις ροδέλες των κονδύλων πατάτας, εκτός από τα στελέχη αναφοράς του *Pseudomonas viridiflava* (TEIC273, TEIC656).

Σπορόφυτα τομάτας στο στάδιο των 3-4 πραγματικών φύλλων, μολύνθηκαν τεχνητά με εναπόθεση βακτηριακής καλλιέργειας στο στέλεχος των φυτών στη θέση πρόσφυσης του φύλλου με τη χρήση αποστειρωμένης οδοντογλυφίδας. Σε διάστημα 10 ημερών, τα σπορόφυτα τομάτας εκδήλωσαν συμπτώματα νέκρωσης της εντεριώνης, μεταχρωματισμού των αγγείων, μαρανση και σήψη στελέχους, δηλαδή τα τυπικά συμπτώματα της ασθένειας βακτηριακή σήψη της τομάτας (Εικ. 33). Παρόμοια συμπτωματολογία, χωρίς σημαντικές διαφοροποιήσεις, παρατηρήθηκε και στα φυτά που μολύνθηκαν με τα στελέχη του *Pseudomonas mediterranea*. Σε όλες τις μολύνσεις η νέκρωση της εντεριώνης επεκτείνεται 1,5-3 εκατοστά εκατέρωθεν του σημείου-θέσης της αρχικής μόλυνσης. Η εμφάνιση/έκπτυξη επίκτητων ριζών δεν ήταν σταθερή (Εικ. 34). Οι μολύνσεις σε φυτά χρυσάνθεμου εμφάνισαν παρόμοια συμπτωματολογική εικόνα, με κύριο σύμπτωμα τη νέκρωση της εντεριώνης, με τη μόλυνση να εκτείνεται 0,5-2 εκατοστά εκατέρωθεν από το σημείο της προσβολής (Εικ. 35). Κανένα από τα φυτά μάρτυρες στα οποία έγιναν τεχνητές μολύνσεις με αποστειρωμένη οδοντογλυφίδα δε μολύνθηκε. Αντίθετα, συμπτώματα της ασθένειας νέκρωσης της εντεριώνης εκδηλώθηκαν σε φυτά που μολύνθηκαν με στελέχη του *Pseudomonas viridiflava* (TEIC273, TEIC656), *Pseudomonas cichorii* (TEIC555, TEIC556, SF1047-01/Type1, SF0057-02/Type2, SF0119-01/Type3), ενώ δεν παρατηρήθηκε, όπως αναμενόταν, μόλυνση με τα *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (TEIC117) ή *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* (TEIC7017).

Από τις τεχνητές μολύνσεις, σε ανεπτυγμένα φυτά τομάτας με ανάπτυξη στο

στάδιο του 8^{ου} με 9^{ου} φύλλου, με έγχυση βακτηριακού αιωρήματος με τη βοήθεια σύριγγας και/ή την εναπόθεσή της πάνω στο φυτό, προέκυψαν τα παρακάτω αποτελέσματα. Παρατηρήθηκε ανάπτυξη των τυπικών συμπτωμάτων της νέκρωσης εντεριώνης, δηλαδή, υδαρής, καστανός μεταχρωματισμός της εντεριώνης σε απόσταση τουλάχιστον τριών έως πέντε εκατοστών εκατέρωθεν από το σημείο της μόλυνσης (Εικ. 37, 38, 39). Στα περισσότερα φυτά παρατηρήθηκε ανάπτυξη επίκτητων εναέριων ριζών (Εικ. 36), επέκταση της μόλυνσης σε απόσταση μεγαλύτερη των 5 εκατοστών από το σημείο μόλυνσης, καθώς επίσης και σταδιακά η πλήρης νέκρωση του φυτού, σε διάστημα ενός έως τριών μηνών (Εικ. 40, 41). Παρόμοια εκδήλωση και διαδοχή συμπτωμάτων παρατηρήθηκε με τα στελέχη αναφοράς του *Pseudomonas corrugata* (TEIC1095, NCPPB2445), *Pseudomonas mediterranea* (CFBP5447T [1], CFBP5447T [3]), *Pseudomonas cichorii* (TEIC551, TEIC555, TEIC556, SF1047-01/Type1, SF0057-02/Type2, SF0119-01/Type3) και *Pseudomonas viridiflava* (TEIC273). Αντίθετα, φυτά μάρτυρες στα οποία αντί μολύσματος χρησιμοποιήθηκε αποσταγμένο και αποστειρωμένο νερό, παρέμειναν υγιή.

ΠΙΝΑΚΑΣ 10. Ταυτοποίηση βακτηριακών στελεχών του *Pseudomonas corrugata* με βάση τις δοκιμές LOPAT

ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ <i>P. mediterranea</i> : CFBP5447T (1), CFBP5447T (3), TEIC1022, TEIC1024, TEIC1025, TEIC1033, TEIC1035, TEIC1065, TEIC1066, TEIC1069, TEIC1074, TEIC1077, TEIC1079, TEIC1087, TEIC1105, TEIC1106, TEIC1109, TEIC1114, TEIC1115, TEIC1116, TEIC1117, TEIC1128, TEIC1137, TEIC1138, TEIC1145, TEIC1146, TEIC1160, TEIC1161. <i>P. corrugata</i> : NCPPB 2445, TEIC1095 (PC14), TEIC1111, TEIC1112, TEIC1148, TEIC1149, TEIC1150, TEIC1151. <i>P. syringae pv. tomato</i> : TEIC117 <i>P. viridiflava</i> : TEIC273 <i>P. cichorii</i> : TEIC555, TEIC556, , SF1047- 01/Type1, SF0057- 02/Type2, SF0119- 01/Type3 <i>P. syringae pv.</i> <i>lachrymans</i> : TEIC7017 *: Σύμφωνα με Schaad <i>et al.</i> , 2001, Ξανθάκη 2004 (Πτυχιακή εργασία)	ΔΟΚΙΜΕΣ	ΑΠΟΜΟΝΩΣΕΙΣ ΤΟΜΑΤΑΣ		<i>Pseudomonas</i>				
				<i>corrugata</i> *	<i>viridiflava</i>	<i>cichorii</i>	<i>syringae pv. tomato</i>	<i>syringae pv. lachrymans</i>
Αριθμός στελεχών	28	8	Pc2431& Pc14	1	4	1	1	
Φθορισμός σε AF	-	-	-	+	+	+	+	
Παραγωγή Levan	-	-	-	-	-	+	+	
Οξειδάση	+	+	+	-	+	-	-	
Διάσπαση αργινίνης	+	+	+	-	-	-	-	
Πηκτινόλυση	-	-	-	+	-	-	-	
Αντίδραση υπερευαισθησίας	+	+	+	+	+	+	+	
Ανάπτυξη στους 37 °C	+	+	+	-	-	-	-	
Αναγωγή νιτρικών σε N ₂	+	+	+	-	-	-	-	
Lecithinase	-	-	+	+	-	ND	ND	
Poly β-hydrobutyrate	+	+	+	-	-	-	-	
Υδρόλυση ζελατίνης	+	+	+	+	+	+	+	
Μανιτόλη	+	+	+	-	-	-	-	
Κελλοβιόζη	-	-	-	+	-	+	+	
Σορβιτόλη	+	+	+	-	-	-	-	
Τρεαλόζη	+	+	+	-	-(SF0057-02/Type2+)	-	-	
Σακχαρόζη	-(TEIC1024+)	(NCPB2445, TEIC1111, TEIC1112-)+	+	+	+	+	+	
D(-) τρυγικό οξύ	+	+	+	-	-(SF0057-02/Type2+)	-	-	
D- αραβινόζη	+	+	-	-	-	-	-	
L(+) ραμνόζη	+	+	ND (+)	-	-	-	-	
L(-) ραμνόζη	-(TEIC1079+)	-	ND (-)	-	+	-	-	
L(+) τρυγικό οξύ	+	-	ND (-)	-	+	-	+	
2-κετογλουκονικό Na	+	-	ND (-)	+	+	+	+	
Μεσο- τρυγικό οξύ	+	-	ND (-)	+	+	+	+	
Ισταμίνη	+	-	-	ND	ND	ND	ND	

Πίνακας 11. Αποτελέσματα βιοχημικών δοκιμών API 20NE

ΔΟΚΙΜΕΣ API 20 NE	<i>Pseudomonas</i>			
	<i>corrugata</i> *	<i>mediterranea</i> **	<i>cichorii</i> ***	<i>viridiflava</i> , <i>syringae</i> pv. <i>tomato</i> ****
Αριθμός στελεχών	4	5	6	3
Αναγωγή νιτρικών	+	+	-	-
Παραγωγή ινδόλης	-	-	-	-
Γλυκόζη	-	-	-	-
Υδρόλυση αργινίνης	+	+	-	-
Παραγωγή ουρεάσης	-	-	+(- SF1047-01/Type 1, SF0119-01/Type3, TEIC551)	-
Υδρόλυση εσκουλίνης	-	-	+	+
Υδρόλυση ζελατίνης	+	+(-TEIC1115, TEIC1106)	-	+
β-γαλακτοζιδάση	-	-	-	-
Χρησιμοποίηση:				
Γλυκόζης	+	+	+	+
Αραβινόζης	+	+	+	+
Μαννόζης	+	+	+	+
Μανιτόλης	+	+	+	+
N-ακετυλ- γλυκοζαμίνης	+	+	-	-
Μαλτόζης	-	-	-	-
Glucuronate	+	+	+	+
Captrate	+	+	+	+
Adipate	-	-	-	-
Malate	+	+	+	+
Κιτρικό νάτριο	+	+	+	+
Φαινυλ-ακετατ	-	-	-	-
Δραστηριότητα οξειδάσης	+	+	+	-

*: NCPPB2445, TEIC1095, TEIC1111, TEIC1112

** : CFBP5447T (1), CFBP5447T(3), TEIC1024, TEIC1106, TEIC1105

***: TEIC551, TEIC555, TEIC556, SF1047-01 (Type 1), SF0057-02 (Type 2), SF0119-01 (Type 3)

****: PV273, TEIC656, TEIC117

Πίνακας 12. Ορολογική αντίδραση βακτηριακών στελεχών

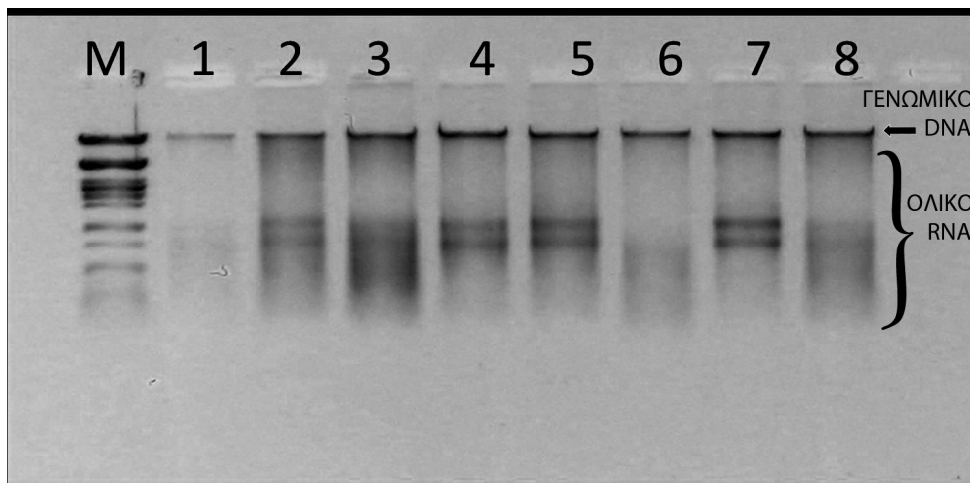
Βακτηριακά στελέχη	Αριθμός στελεχών	Ανοσοφθορισμός	
		+	-
<i>Pseudomonas corrugata</i>	36	8	0
<i>Pseudomonas mediterranea</i>		0	28
<i>Pseudomonas viridiflava</i>	2	0	2
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>alisalensis</i>	1	0	1
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	1	0	1

- Χρησιμοποιήθηκε ο αντιορός anti-PC14, σε αραιώση 1/400 ή/και 1/800 και το φθορίζον σύμπλοκο Alexa Fluor 488 goat anti rabbit IgG (Molecular Probes, USA) σε αραιώση 1/100.

3.4 Μοριακή ταυτοποίηση

3.4.1 Ανίχνευση απομονωμένων DNA σε πήκτωμα αγαρόζης

Μετά την ολική απομόνωση του DNA έγινε έλεγχος για να αξιολογηθεί η ποιότητα της κάθε μιας απομόνωσης από τα βακτηριακά κύτταρα. Στην Εικ. 4 παρουσιάζεται ένα πήκτωμα αγαρόζης (0.8% w/v) στο οποίο φορτώθηκαν απομονώσεις ολικού DNA από τα βακτηριακά στελέχη TEIC1025, TEIC1033, TEIC1065, TEIC1095, TEIC1105, TEIC1111, TEIC1150, TEIC1160.



Εικόνα 4. Πήκτωμα αγαρόζης ανάλυσης DNA με μοριακό δείκτη τον $\lambda/PstI$ και DNA των βακτηριακών στελεχών: 1) TEIC1025, 2) TEIC1033, 3) TEIC1065, 4) TEIC1095, 5) TEIC1105, 6) TEIC1111, 7) TEIC1150, 8) TEIC1160

3.4.2 Υπολογισμός συγκεντρώσεων απομονωμένων DNA

Μετά την αξιολόγηση της ποιότητας κάθε μιας απομόνωσης, έγινε φωτομέτρηση των δειγμάτων 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.

3.4.3 Αποτελέσματα της PC1 & PC5 PCR

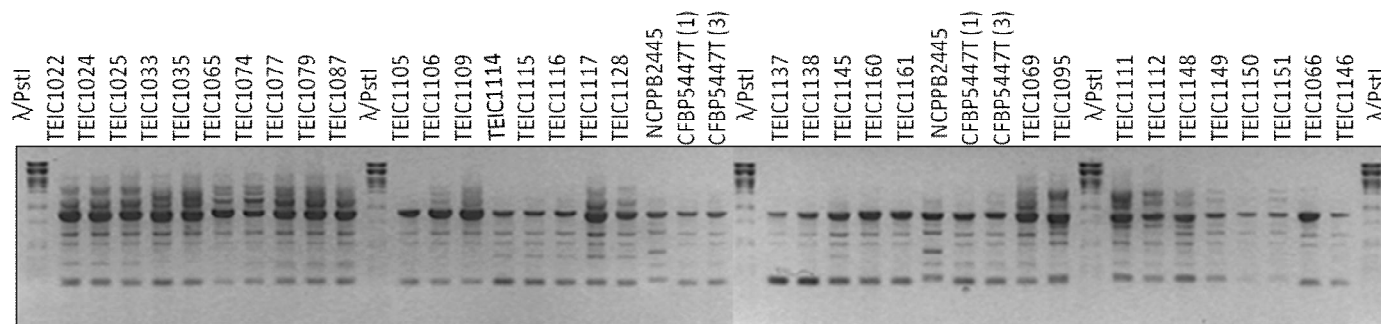
Για τη διεξαγωγή της PC1 και PC5-PCR χρησιμοποιήθηκαν οι ειδικοί εκκινητές PC1/1, PC1/2 και PC5/1, PC5/2, όπου οι PC1 εκκινητές ανιχνεύουν τα βακτηριακά στελέχη του *Pseudomonas mediterranea*, ενώ οι PC5 εκκινητές τα βακτηριακά στελέχη του *Pseudomonas corrugata*. Στην Εικ. 5 παρουσιάζονται τα πρότυπα των ζωνών τα οποία έδωσαν οι PC1 και PC5 εκκινητές.

3.4.4 Αποτελέσματα της rep-PCR

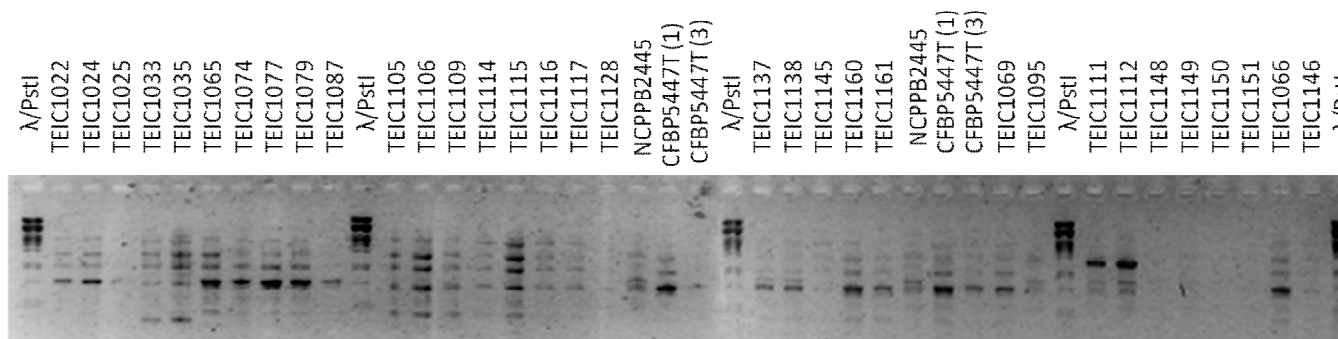
Τα αποτελέσματα της BOX και ERIC-PCR έδειξαν πως υπάρχει μικρή γενετική παραλλακτικότητα μεταξύ των βακτηριακών στελεχών του *Pseudomonas corrugata* και του *Pseudomonas mediterranea*, τόσο στα αποτυπώματα των μοριακών δεικτών (Εικ. 6 και 7), όσο και στο φυλογενετικό δέντρο (Εικ. 8). Σε αυτό μπορούμε να παρατηρήσουμε δύο διακριτές ομάδες με τα στελέχη των *Pseudomonas corrugata* και των *Pseudomonas mediterranea* αντίστοιχα.



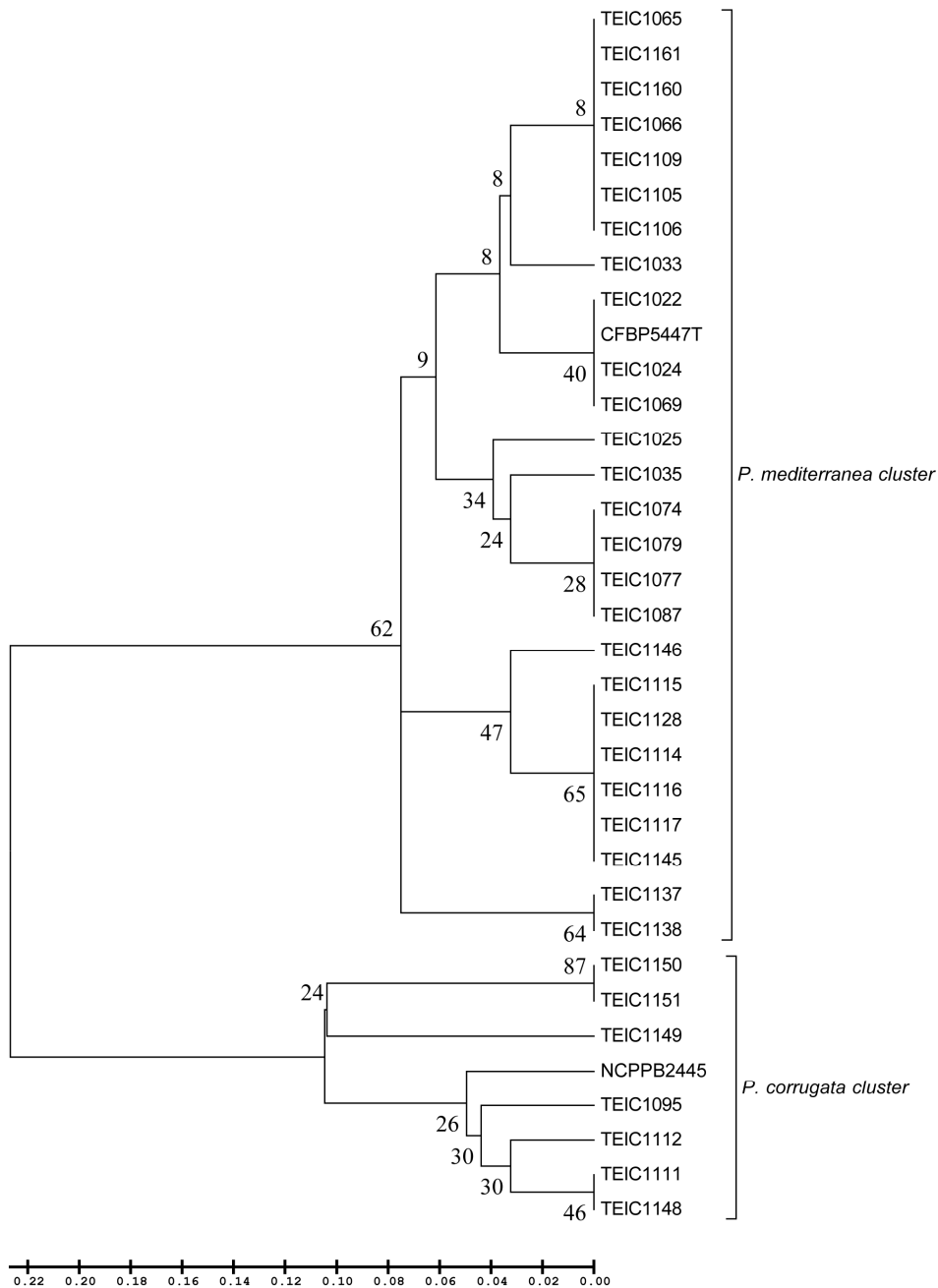
Εικόνα 5. Προϊόντα αντίδρασης PCR με τους ειδικούς εκκινητές **PC1** (*Pseudomonas mediterranea*) και **PC5** (*Pseudomonas corrugata*)



Εικόνα 6. Αποτύπωμα μοριακών δεικτών **BOX-PCR** με τα βακτηριακά στελέχη του *Pseudomonas corrugata* και του *Pseudomonas mediterranea*



Εικόνα 7. Αποτύπωμα μοριακών δεικτών **ERIC-PCR** με τα βακτηριακά στελέχη του *Pseudomonas corrugata* και του *Pseudomonas mediterranea*

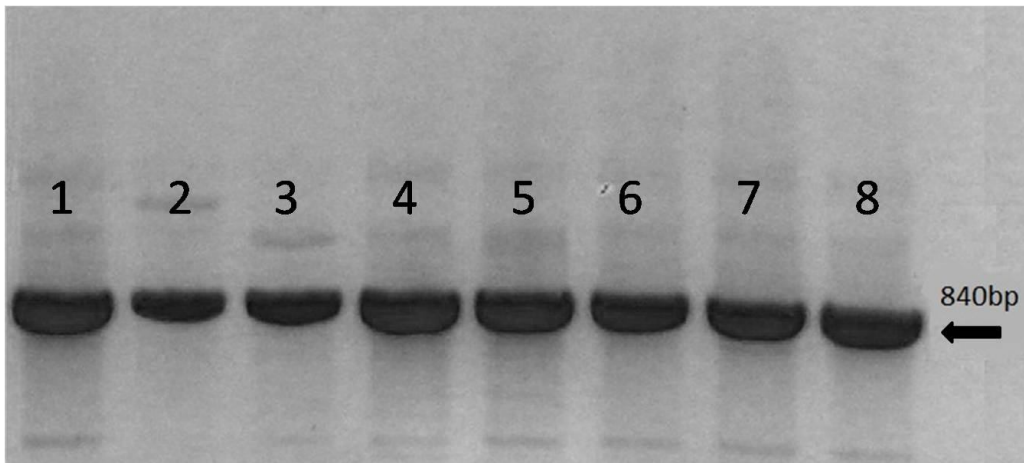


Εικόνα 8. Δενδρόγραμμα με βάση τα αποτελέσματα των BOX και ERIC-PCR. Οι τιμές στα γόνατα του δένδρου αναφέρονται στο βαθμό αξιοπιστίας του κλάδου [bootstrap] για 1500 επαναλήψεις

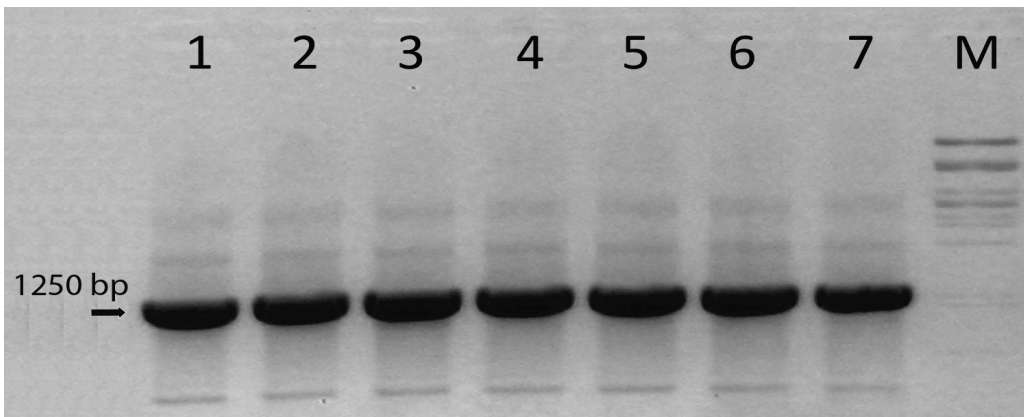
3.4.5 Αποτελέσματα *gyrB*-PCR, *rpoB*-PCR και *rpoD*-PCR

Τα προϊόντα από τις *gyrB*, *rpoB* και *rpoD*-PCRs παρουσιάζονται σε πηκτώματα αγαρόζης συγκέντρωσης 1,3% w/v στις Εικόνες 9, 10 και 11 αντίστοιχα. Παρατηρούμε ότι στο κάθε πήκτωμα εμφανίζεται μια ζώνη για όλα τα στελέχη στα 840 bp για την *gyrB*-PCR, στα 1250 bp για την *rpoB* -PCR και στα 615 bp για την *rpoD* -PCR. Οι

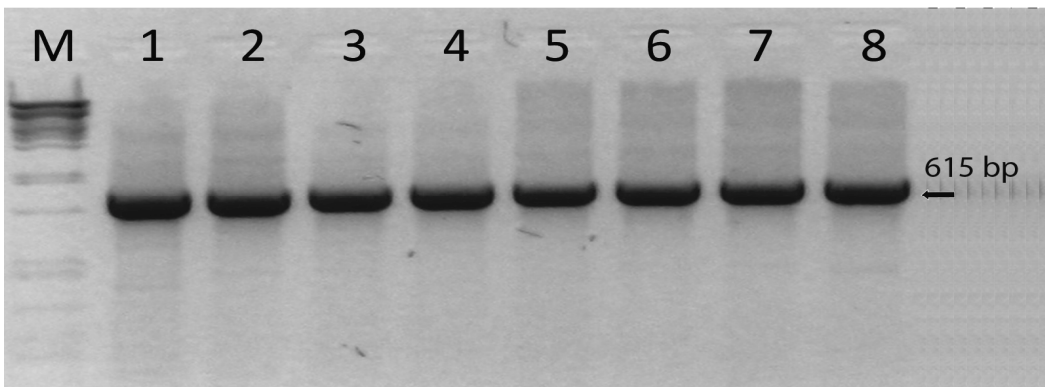
ζώνες, απομονώθηκαν από το πήκτωμα αγαρόζης και στη συνέχεια αλληλουχίστηκαν.



Εικόνα 9. Πήκτωμα αγαρόζης με τα προϊόντα *gyrB*-PCR μοριακό δείκτη τον λ /*Pst*I και DNA των βακτηριακών στελεχών: 1) NCPPB2445, 2) CFBP5447T [1], 3) TEIC1087, 4) TEIC1095, 5) TEIC1106, 6) TEIC1112, 7) TEIC1116, 8) TEIC1148



Εικόνα 10. Πήκτωμα αγαρόζης με τα προϊόντα *rpoB*-PCR μοριακό δείκτη τον λ /*Pst*I και DNA των βακτηριακών στελεχών: 1) NCPPB2445, 2) CFBP5447T [1], 3) TEIC1087, 4) TEIC1095, 5) TEIC1106, 6) TEIC1112, 7) TEIC1116, 8) TEIC1148

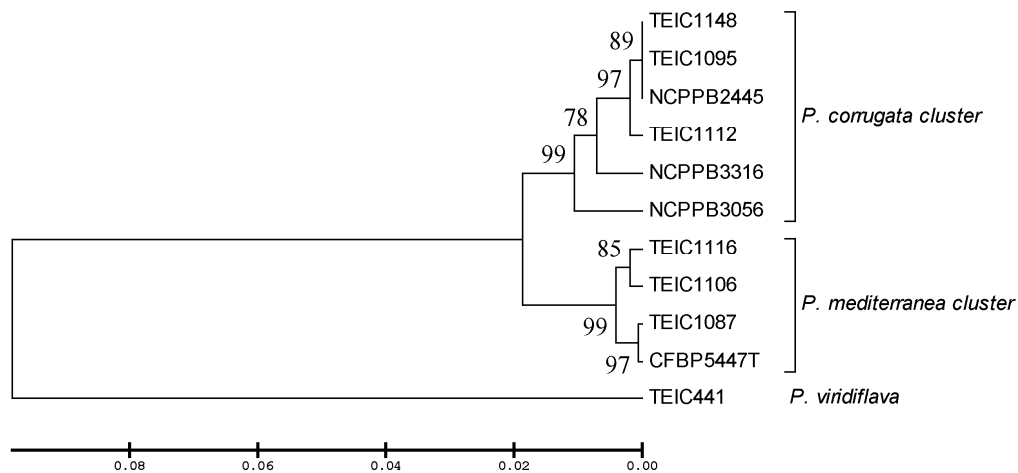


Εικόνα 11. Πήκτωμα αγαρόζης με τα προϊόντα *rpoD*-PCR μοριακό δείκτη τον λ /*Eco*RI-*Hind* III και DNA των βακτηριακών στελεχών: 1) NCPPB2445, 2) CFBP5447T [1], 3) TEIC1087, 4) TEIC1095, 5) TEIC1106, 6) TEIC1112, 7) TEIC1116, 8) TEIC1148

3.4.6 Αποτελέσματα αλληλούχησης των γονιδίων *gyrB*, *rpoB*, *rpoD*

Η σύγκριση των αλληλουχιών των γονιδίων *gyrB*, *rpoB* και *rpoD* με άλλες κατατεθειμένες στην GenBank έδειξε ότι τα στελέχη NCPPB2445, TEIC1095, TEIC1148 και TEIC1112, κατατάσσονται ως *Pseudomonas corrugata* και τα TEIC1116, TEIC1106 TEIC1087 και CFBP5447T κατατάσσονται ως *Pseudomonas mediterranea*, τα οποία ομαδοποιούνται με τα ήδη κατατεθειμένα στελέχη στη GenBank (NCPPB3316, NCPPB3056, LMG2172T, LMG1276, LMG5036, LMG2173 και CIP107708T).

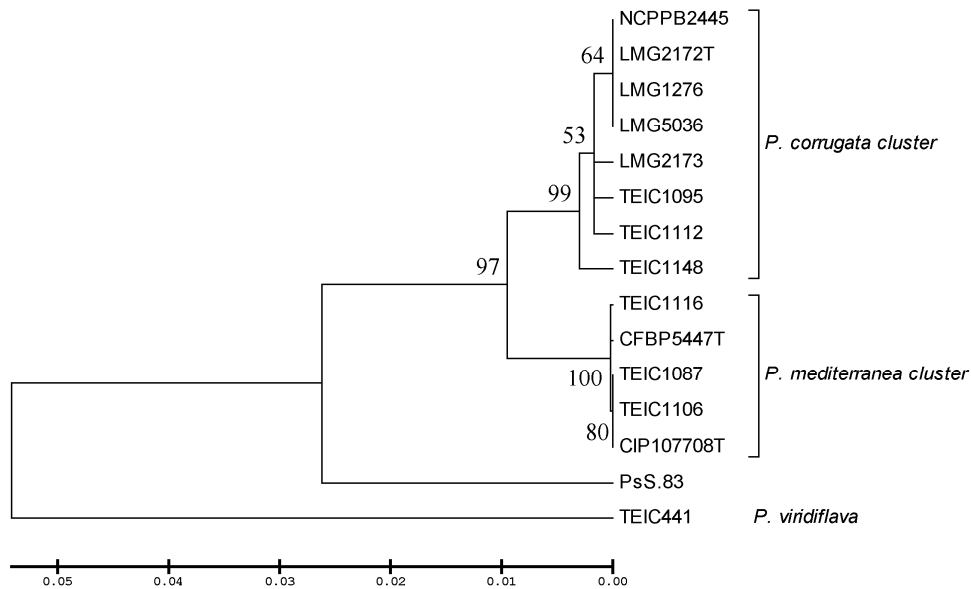
Στην αλληλούχηση του γονιδίου *gyrB*, τα στελέχη παρουσίασαν ομολογία 96-100% με τα στελέχη αναφοράς της βάσης δεδομένων. Συγκεκριμένα, το στέλεχος TEIC1116 έχει 96% ομολογία με το στέλεχος αναφοράς NCPPB3056. Στο δενδρόγραμμα παρατηρούνται δύο ομάδες που ξεχωρίζουν τα στελέχη του *Pseudomonas mediterranea* και του *Pseudomonas corrugata* καθώς τα τελευταία ομαδοποιούνται με εκείνα της βάσης δεδομένων (NCPPB3316, NCPPB3056) (Εικ. 12).



Εικόνα 12. Δενδρόγραμμα που κατασκευάστηκε χρησιμοποιώντας *gyrB* αλληλουχίες στελεχών αυτού του έργου και άλλων κατατεθειμένων στη βάση δεδομένων GenBank. Οι τιμές στα γόνατα του δένδρου αναφέρονται στο βαθμό αξιοπιστίας του κλάδου [bootstrap] για 1500 επαναλήψεις

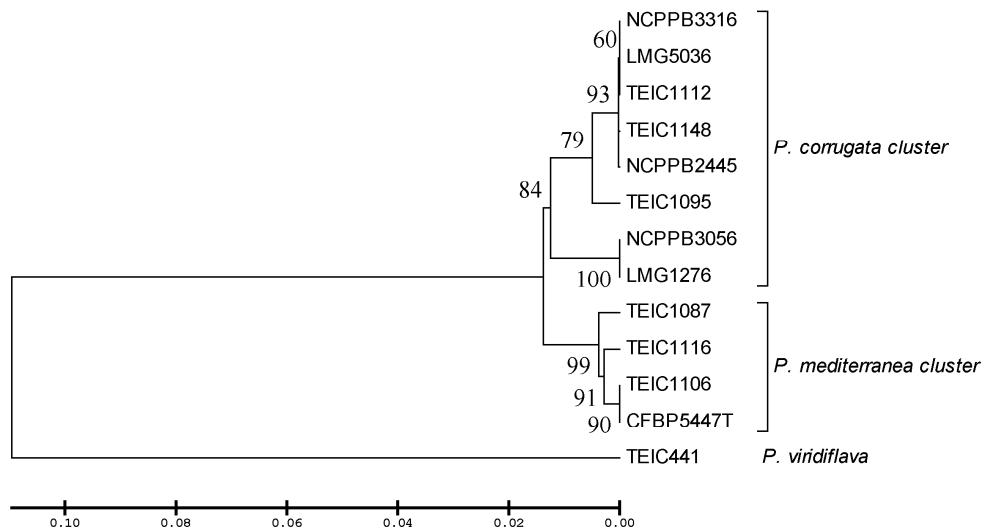
Στην περίπτωση του δενδρογράμματος του γονιδίου *rpoB*, όλα τα στελέχη έχουν ομολογία 99% με τα στελέχη αναφοράς που είναι κατατεθειμένα στη βάση δεδομένων. Το δενδρόγραμμα κατατάσσει και πάλι σε δύο ομάδες τα στελέχη της μελέτης σε *Pseudomonas mediterranea* και σε *Pseudomonas corrugata*, τα οποία ομαδοποιούνται με τα στελέχη αναφοράς της βάσης δεδομένων (LMG2172T, LMG1276, LMG5036,

LMG2173 για *Pseudomonas corrugata* και CIP107708T για *Pseudomonas mediterranea*) (Εικ. 13).



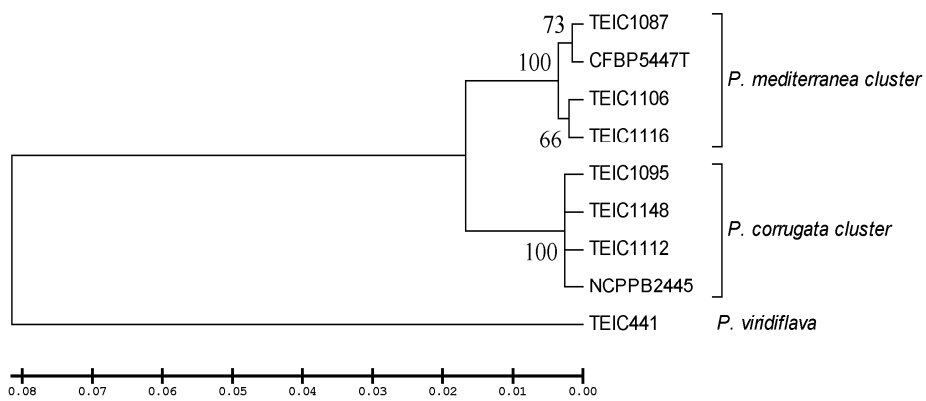
Εικόνα 13. Δενδρόγραμμα που κατασκευάστηκε χρησιμοποιώντας *groB* αλληλουχίες στελεχών από την ασθένεια νέκρωση της εντεριώνης και άλλων κατατεθειμένων στη βάση δεδομένων GenBank. Οι τιμές στα γόνατα του δένδρου αναφέρονται στο βαθμό αξιοπιστίας του κλάδου [bootstrap] για 1500 επαναλήψεις

Τέλος, η αλληλούχιση του *groD* γονιδίου έδωσε ομολογία με τα στελέχη της μελέτης 99-100%. Ενδεικτικά, το βακτηριακό στέλεχος TEIC1087 εμφάνισε ομολογία 100% με το στέλεχος αναφοράς CFBP5447T, ενώ το στέλεχος TEIC1095 είχε ομολογία 99% με το στέλεχος αναφοράς LMG5036. Επίσης, φαίνονται δύο ομαδοποιήσεις στελεχών με τα στελέχη αναφοράς LMG5036, NCPPB3056 και LMG1276 τα οποία κατατάσσουν τα *Pseudomonas corrugata* στην ίδια ομάδα (Εικ. 14).



Εικόνα 14. Δενδρόγραμμα που κατασκευάστηκε χρησιμοποιώντας *proD* αλληλουχίες στελεχών αυτού του έργου και άλλων κατατεθειμένων στη βάση δεδομένων GenBank. Οι τιμές στα γόνατα του δένδρου αναφέρονται στο βαθμό αξιοπιστίας του κλάδου [bootstrap] για 1500 επαναλήψεις

Στην εικόνα 15 παρουσιάζεται το δενδρόγραμμα που κατασκευάστηκε χρησιμοποιώντας τις αλληλουχίες όλων των γονιδίων σε όλα τα βακτηριακά στελέχη που επιλέχθηκαν. Το στέλεχος αναφοράς TEIC441 του *Pseudomonas viridiflava*, χρησιμοποιήθηκε για συγκριτικούς σκοπούς προκειμένου να ελεγχθεί η συγγένεια που μπορεί να υπάρχει μεταξύ των στελεχών της μελέτης.



Εικόνα 15. Δενδρόγραμμα που κατασκευάστηκε χρησιμοποιώντας τις αλληλουχίες όλων των γονιδίων σε όλα τα βακτηριακά στελέχη που επιλέχθηκαν. Οι τιμές στα γόνατα του δένδρου αναφέρονται στο βαθμό αξιοπιστίας του κλάδου [bootstrap] για 1500 επαναλήψεις

4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην εργασία αυτή, αναλύθηκαν βιοχημικά, ορολογικά και μοριακά, βακτηριακά στελέχη από τη συλλογή του εργαστηρίου Φυτοπαθολογίας-Βακτηριολογίας. Τα δείγματα αυτά είχαν απομονωθεί από συμπτωματικά φυτά τομάτας και πιπεριάς, με τυπικά συμπτώματα νέκρωσης της εντεριώνης, από το έτος 1991 έως το 2009. Από ένα σύνολο 39 δοκιμών βρέθηκε ότι από τα 36 βακτηριακά στελέχη, οκτώ διαφοροποιούνται ως προς την ικανότητα χρησιμοποίησης των τριών σακχάρων, δηλαδή, της ισταμίνης, του 2-κετογλουκονικού νατρίου και του μεσο-τρυγικού νατρίου και ταξινομούνται ως *Pseudomonas corrugata* ενώ τα υπόλοιπα 28 ως *Pseudomonas mediterranea*. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώνονται από τα αντίστοιχα όμοια αποτελέσματα που έδωσαν τα στελέχη αναφοράς που εξετάστηκαν ταυτόχρονα και συμφωνούν με εκείνα της εργασίας των Catara *et al.* (2002), στην οποία αναφέρεται ότι οι τρεις αυτές δοκιμές διαφοροποιούν το βακτήριο *Pseudomonas corrugata* από το είδος *Pseudomonas mediterranea*, το οποίο απομονώνεται από ασθενή φυτά με το σύνδρομο της νέκρωσης της εντεριώνης της τομάτας από παραμεσόγειες χώρες. Αντίστοιχα αποτελέσματα είχαν προκύψει σε μελέτη του εργαστηρίου το 2004 (Ξανθάκη, 2004) κατά την οποία σε 16 στελέχη που δοκιμάστηκαν τα 14 ταυτοποιήθηκαν ως *Pseudomonas mediterranea* και τα υπόλοιπα δύο ως *Pseudomonas corrugata*.

Σε παρόμοια αποτελέσματα καταλήγουν τα δεδομένα της μελέτης των 36 στελεχών όταν αναλύθηκαν με την ορολογική μέθοδο του ανοσοφθορισμού. Οκτώ στελέχη μεταξύ των οποίων και τα στελέχη αναφοράς του *Pseudomonas corrugata* (TEIC1095 και NCPPB2445) αντέδρασαν με τον αντιγόνο anti-PC 14 και ομαδοποιούνται στο είδος *Pseudomonas corrugata*, ενώ τα υπόλοιπα 28, μεταξύ των οποίων και τα δυο στελέχη αναφοράς, δεν αντέδρασαν με τον αντιγόνο anti-PC 14 και ομαδοποιούνται στο είδος *Pseudomonas mediterranea*. Τα αποτελέσματά μας επιβεβαιώνουν προγενέστερες μελέτες του εργαστηρίου Φυτοπαθολογίας-Βακτηριολογίας, σύμφωνα με τις οποίες από τις 56 απομονώσεις από φυτά τομάτας με συμπτώματα βακτηριακής νέκρωσης της εντεριώνης, οι 52 ταυτοποιήθηκαν ως *Pseudomonas mediterranea*, και μόνο τέσσερις χαρακτηρίστηκαν ορολογικά ως *Pseudomonas corrugata* (Ξανθάκη, 2004). Αντίθετα, σε αποτελέσματα της Catara, 2007 αναφέρεται η ορολογική ετερογένεια των στελεχών του βακτηρίου. Τα αποτελέσματα της μελέτης μπορεί να οφείλονται στην εξειδίκευση του αντιορού anti-

PC14, η οποία όμως θα πρέπει να διερευνηθεί σε μεγαλύτερο αριθμό βακτηριακών στελεχών που να προέρχονται από περισσότερες περιοχές και χώρες.

Για επιβεβαίωση της ταυτοποίησης με τα μορφολογικά χαρακτηριστικά και τις βιοχημικές δοκιμές, και εκτίμηση των γενετικών σχέσεων μεταξύ των απομονωμένων στελεχών, απομονώθηκε DNA και ποσότητα αυτού χρησιμοποιήθηκε σε PCR με τους εξειδικευμένους εκκινητές PC1 και PC5. Οι εκκινητές αυτοί επιλέγουν τα είδη *Pseudomonas mediterranea* και *Pseudomonas corrugata* αντίστοιχα. Επιπρόσθετα, έγινε μοριακή ανάλυση με *ger*-PCR αλλά και MLST. Τα αποτελέσματα των PC1- και PC5-PCR, έδειξαν ξεκάθαρα ποια στελέχη κατατάσσονται στα *Pseudomonas corrugata* και ποια στα *Pseudomonas mediterranea*. Συγκεκριμένα, από τα 36 βακτηριακά στελέχη, τα 28 ήταν *Pseudomonas mediterranea*, ενώ μόλις οκτώ ήταν *Pseudomonas corrugata*. Με τη χρήση της BOX και ERIC-PCR είναι επίσης εμφανής η μικρή διαφοροποίηση των στελεχών μεταξύ τους, όπως φαίνεται από τα αποτυπώματα των μοριακών δεικτών και του φυλογενετικού δενδρογράμματος. Στο τελευταίο, είναι φανερό ότι τα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν, χωρίζονται σε δύο ευδιάκριτες ομάδες. Το γεγονός αυτό, καταδεικνύει ότι οι BOX και ERIC-PCR μοριακοί δείκτες, είναι σε θέση να ταυτοποιήσουν τα βακτηριακά στελέχη της εργασίας μας.

Είναι γνωστό ότι η ανάλυση χρησιμοποιώντας την αλληλουχία του 16S rRNA των βακτηριακών στελεχών δεν είναι αρκετή για την διάκριση των σχέσεων σε επίπεδο είδους, λόγω του εξαιρετικά αργού ρυθμού εξέλιξης του 16S rRNA (Yamamoto *et al.*, 2000). Για τον λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκε η μεθοδολογία MLST με την ανάλυση της αλληλουχίας των γονιδίων *gyrB*, *rpoB* και *rpoD*. Αρχικά, από την σύγκριση των αλληλουχιών αυτών των γονιδίων από όλα τα στελέχη, με στελέχη που είναι καταχωρημένα στη βάση δεδομένων GenBank, επιβεβαιώθηκε το αποτέλεσμα των βιοχημικών δοκιμών, δηλαδή ότι όλα τα εξετασμένα στελέχη ανήκουν στα είδη *Pseudomonas corrugata* και *Pseudomonas mediterranea*.

Στα δενδρογράμματα για τα γονίδια *gyrB*, *rpoB* και *rpoD* (Εικ. 12, 13, 14), τα οκτώ στελέχη χωρίζονται σε δύο ομάδες. Στην πρώτη ομάδα κατατάσσονται στα στελέχη του *Pseudomonas corrugata* (TEIC1148, TEIC1095, TEIC1112 και το στέλεχος αναφοράς NCPPB2445). Στη δεύτερη ομάδα συναντάμε τα στελέχη του *Pseudomonas mediterranea* (TEIC1116, TEIC1106, TEIC1087 και το στέλεχος αναφοράς CFBP5447T). Το στέλεχος TEIC441 του *Pseudomonas viridiflava*

χρησιμοποιήθηκε ως συγγενικό είδος προκειμένου να ελέγξουμε την ομολογία τους. Τα στελέχη αναφοράς του *Pseudomonas corrugata* και *Pseudomonas mediterranea* είναι στενά συνδεδεμένα με τα βακτηριακά στελέχη που μελετάμε.

Συμπερασματικά προκύπτει ότι από τις βιοχημικές, τις δοκιμές παθογένειας, τις ορολογικές και τις μοριακές μεθοδολογίες που ακολουθήθηκαν, τα στελέχη από την ασθένεια νέκρωση της εντεριώνης, που μελετήθηκαν, ταξινομούνται κατά πλειονότητα ως μέλη του είδους *Pseudomonas mediterranea*, ενώ μερικά εξ αυτών ως μέλη του *Pseudomonas corrugata*. Η παραλλακτικότητα που εντοπίστηκε με τις μοριακές μεθοδολογίες ανάμεσα στα στελέχη του ίδιου είδους δεν ήταν σημαντική ώστε να επηρεάσει τα αποτελέσματα της μελέτης.

5 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Αλιβιζάτος, Α. Σ. (1988).** Η νέκρωση της εντεριώνης της τομάτας. Αγροτικός συνεργατισμός Τεύχος Νο 2, 12-14.
- Βολατσάκα, Ε., (1990),** Ανίχνευση του *Pseudomonas corrugata*, παθογόνου αιτίου της βακτηριακής νέκρωσης της εντεριώνης της τομάτας, με τις τεχνικές του ανοσοφθορισμού και της E.L.I.S.A. Πτυχιακή εργασία ΤΕΙ Κρήτης, Ηράκλειο 1990, Σελ. 7
- Γκούμας, Δ. Ε. (2006).** Επιλεγμένα Θέματα Ειδικής Φυτοβακτηριολογίας. Έκδοση: ΤΕΙ Κρήτης, Ηράκλειο 2006. Σελ. 9, 13, 15, 36.
- Λουλακάκης, Κ. Α., (2006).** Βιοτεχνολογία Φυτών, Σημειώσεις. ΤΕΙ Κρήτης, Ηράκλειο 2006. Σελ. 150.
- Ξανθάκη, Ε., (2004),** Μελέτη βακτηριακών στελεχών από την ασθένεια Νέκρωση της εντεριώνης της τομάτας. Πτυχιακή εργασία ΤΕΙ Κρήτης. Σελ 10.
- Παναγόπουλος, Χ. Γ. (2000).** Ασθένειες κηπευτικών καλλιεργειών. Αθήνα 2000. Σελ. 119
- Ταμπακάκη Α., Βερβερίδης Φ., (2003).** Εργαστηριακές Ασκήσεις Βιοτεχνολογίας Φυτών. ΤΕΙ Κρήτης, Ηράκλειο 2003. Σελ. 109.

ΞΕΝΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abdalla, M. E. (2000).** Detection and identification of seed-borne pathogenic bacteria of imported tomato seeds in Egypt. Bull. EPPO, **30**, 327–331.
- Achouak, W., Thiery, M., Roubaud, P. & Heulin, T. (2000).** Impact of crop management on intraspecific diversity of *Pseudomonas corrugata* in bulk soil. *FEMS Microbiol Ecol* **31**, 11-19.
- Ait Tayeb L, Ageron E, Grimont F, Grimont PA., (2005).** Molecular phylogeny of the genus *Pseudomonas* based on *rpoB* sequences and application for the identification of isolates. *Res Microbiol* **156**: 763-773
- Alibizatos, A. S. (1984).** Aetiology of tomato pith necrosis in Greece. Benaki Phytopathological Institute, pp 55-57.
- Alippi, A. M. & Lopez, A. C., (2010).** First report of *Pseudomonas mediterranea*

- causing tomato pith necrosis in Argentina. *Plant Pathology* **59**, 1163.
- Alice, M. Quezado-Duval, Carielli M. N. Guimaraes & Olinda M. Martins (2007).** Occurrence of *Pseudomonas corrugata* causing pith necrosis on tomato plants in Goias, Brazil. *Fitopatol. Bras.* **32** (6)
- Anzai, Y., Kim, H., Park, J. Y., Wakabayashi, H. and Oyaizu, H. (2000).** Phylogenetic affiliation of the pseudomonads based on 16S rRNA sequence. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **50**, 1563–1589.
- Bella, P., Greco, S., Polizzi, G., Cirvilleri, G. and Catara, V. (2003).** Soil fitness and thermal sensitivity of *Pseudomonas corrugata* strains. *Acta Hort. (ISHS)*, **614**, 831–836.
- Buonaurio R., Karofilakis A., Scortichini M., (1993).** Occurrence of *Pseudomonas corrugata* Roberts et Scarlett on tomato plants in Crete. *Phytopathologia Mediterranea* **32**, 245-246.
- Carroll, N. B., Echandi, E. and Shoemaker, P. B. (1992).** Pith necrosis of tomato in western North Carolina: etiology and influence of cultural practices on its incidence and severity. Technical Bulletin—North Carolina Agricultural Research Service, no. 300.
- Cirvilleri, G., Bella, P. and Catara, V. (2000)** Luciferase genes as a marker for *Pseudomonas corrugata*. *J. Plant Pathol.* **82**, 237–241.
- Catara Vittoria (2007).** *Pseudomonas corrugata*: plant pathogen and/or biological resource? *Molecular Plant Pathology* (2007) **8** (3), 233–244
- Catara V., Sutra L., Morineau A., Achouak W., Christen R., Gaardan L. (2002).** Phenotypic and genomic evidence for the revision of *Pseudomonas corrugata* and proposal of *Pseudomonas mediterranea* sp. nov. *Internasional Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* (2002), **52**, 1749-1758.
- Fiori, M., (1992).** A new bacterial disease of chrysanthemum: a stem rot by *Pseudomonas corrugata* Roberts et Scarlett. *Phytopathologia Mediterranea* **31**, 110-114.
- George, M. L. C., Nelson, R. J., Zeigler, R. S., Leung, H., (1998).** Rapid Population Analysis of *Magnaporthe grisea* by Using rep-PCR and Endogenous Repetitive DNA Sequences. *Phytopathology*, **88** (3), 223-229.
- Janse J. D., (2005).** *Phylobacteriology. Principle and Practice.* CABI Publishing.

- Jones, J. B., Jones, J. P., Stall, R. E. & Miller, J. W. (1983).** Occurrence of stem necrosis on field-grown tomatoes incited by *Pseudomonas corrugata* in Florida, *Plant Disease*/Vol. 67 No. 4: 426
- Lai, M., D. C. Opgenorth, and J. B. White, (1983):** Occurrence of *Pseudomonas corrugata* on tomato in California. *Plant Dis.* **67**, 299—300.
- Lopez, M. M., Rodriguez, F. R., Montojo, A. M., Salcedo, R. J. and Marti, E. R. J. (1988).** Pepper, a new host of *Pseudomonas corrugata*. In: Abstracts book, 5th International Congress of Plant Pathology, Kyoto, Japan: ISPP, **98**.
- Lopez M. M., Siverio F., Albiah R., Garcia F., & Rodriguez F. R. (1994).** Characterization of Spanish isolations of *Pseudomonas corrugata* from tomato and pepper. *Plant Pathol* **43**, 80-90.
- 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.
- Lukezic, P. L., (1979):** *Pseudomonas corrugata*, a pathogen of tomato isolated from symptomless alfalfa roots. *Phytopathology* **69**, 27—31.
- Magyarosy, A. C. Buchanan, B. B. (1995).** First report of *Pseudomonas corrugata* causing pith necrosis on geraniums. *Phytopathology* **85**, 1040.
- Malathrakis, N. E. & Goumas, D. E. (1987).** Bacterial soft rot of tomato in plastic greenhouses in Crete. *Ann. Appl. Biol.* **111**, 115-123.
- Molan, Y. Y., Ibrahim, Y. E. & Al-Masrahi, A. A., (2010).** Identification in Saudi Arabia of *Pseudomonas corrugata*, the tomato pith necrosis pathogen, and assessment of cultivar resistance and seed treatment. *Journal of Plant Pathology* **92** (1), 213-218.
- Moura, M. L., Jacques, M. A., Brito, L. M., Mourão, I. M. and Duclos, J. (2005).** Tomato pith necrosis (TPN) caused by *Pseudomonas corrugata* and *Pseudomonas mediterranea*: severity of damages and crop loss assessment. *Acta Hort. (ISHS)*, **695**, 365–372.
- Naumann, K., Griesbach, E. and Lattauschke, E. (1989).** Occurrence and importance of bacterial stem pith necrosis of tomato in the GDR. In: Proceedings of the 7th International Conference of Plant Pathogenic Bacteria (Klement, Z., ed.), pp. 473–478. Budapest: Akadémiai Kiadó

- Sadowska-Rybak, M., Pein, B. and Büttner, C. (1997).** Transmission of *Pseudomonas corrugata* by watering and by nutrient solutions of low tide-high tide-irrigation-systems. *Gesunde Pflanzen*, **49**, 226–229.
- Sahin, F., Aysan, Y. and Saygili, H. (2005).** First observation of pith necrosis on tomato caused by some *Pseudomonas* species in Turkey. *Acta Hort.* **695**, 93–96.
- Scarlett, C. M., Fletcher, J. T., Roberts, P. & Leliott, R. A. (1978).** Tomato pith necrosis caused by *Pseudomonas corrugata* n. sp. *Annals of applied Biology*, **88** (1), 105-115.
- Schaad NW., (2001).** Initial identification of common genera. In: Schaad ND (ed) *Laboratory Guide for Identification of PlantPathogenic Bacteria* (pp 1–11). The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, USA
- Scortichini, M. and Rossi, M. P. (1993).** Response of some wild species of *Lycopersicon* and tomato cultivars to *Pseudomonas corrugata* Roberts et Scarlett. *Phytopathol. Med.* **32**, 223-227.
- Siverio, F., Cambra, M., Gorris, M. T., Corzo, J. & Lopez, M. M. (1993).** Lipopolysaccharides as determinants of serologicalvariability in *Pseudomomas corrugata*. *Appl Environ Microbiol* **59**, 1805-1812.
- Sutra L., Siverio F., Lopez M. M., Hunault G., Bollet C. & Gardan L., (1997).** Taxonomy of *Preudomonas* strains isolated from tomato pith necrosis: emended description of *Preudomonas corrugata* and proposal of three unnamed genomosppecies. *Int J Syst Bacteriol* **47**, 1020-1033.
- Yamamoto S, Kasai H, Arnold DL, Jackson RW, Vivian A, et al., (2000).** Phylogeny of the genus *Pseudomonas*: intrageneric structure reconstructed from the nucleotide sequences of *gyrB* and *rpoD* genes. *Microbiology-Uk* **146**: 2385-2394.
- Zutra, D. (1989).** Tomato pith necrosis in Israel. *Hassadeh*, **69**, 612–613.

6 ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΑ-ΝΕΚΡΩΣΗ ΤΗΣ ΕΝΤΕΡΙΩΝΗΣ



Εικόνα 16, 17. Μάρανση, γλώρωση και νέκρωση φυτών τομάτας
(http://www.longislandhort.cornell.edu/vegpath/photos/pithnecrosis_tomato.htm)



Εικόνα 18. Επίκτητες ρίζες στο στέλεχος φυτού τομάτας
(http://www.longislandhort.cornell.edu/vegpath/photos/pithnecrosis_tomato.htm)



Εικόνα 19. Επίκτητες ρίζες στο στέλεχος φυτού τομάτας και νέκρωση της εντεριώνης



Εικόνα 20. Καστανόχρωμος μεταχρωματισμός στο φλοιό φυτού τομάτας



Εικόνα 21. Έλκη σε μίσχο φυτού τομάτας



Εικόνα 22 α, β, γ. Συμπτώματα νέκρωσης της εντεριόνης σε φυτό τομάτας

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΤΕΧΝΗΤΩΝ ΜΟΛΥΝΣΕΩΝ

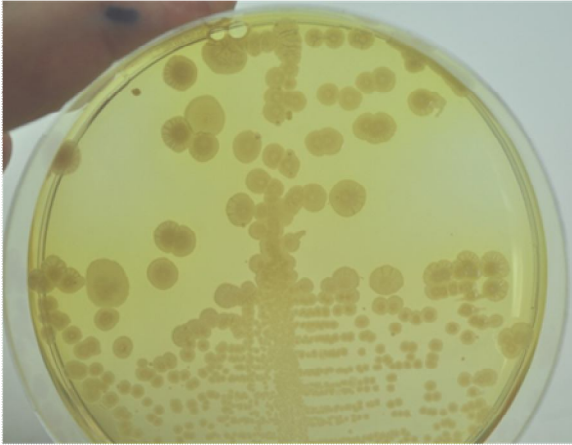


Εικόνα 23, 24. Τεχνητές μολύνσεις με τη μέθοδο της οδοντογλυφίδας σε νεαρά φυτά τομάτας



Εικόνα 25, 26. Τεχνητές μολύνσεις με σύριγγα σε ανεπτυγμένα φυτά τομάτας

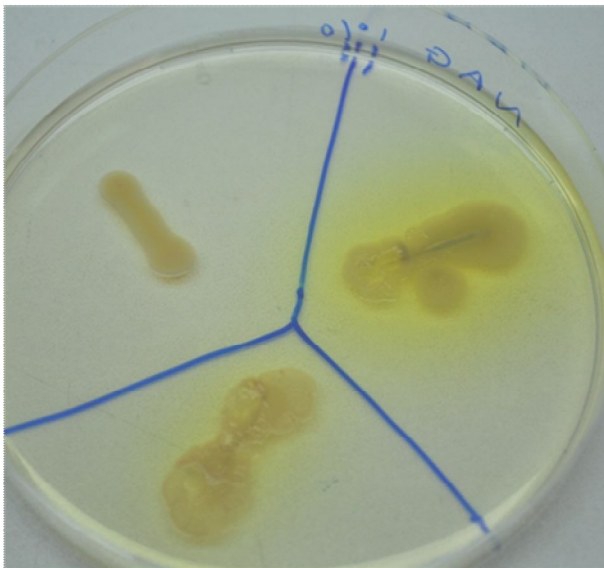
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΑΠΟΙΚΙΕΣ ΚΑΙ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ



Εικόνα 27. Αποικίες του *Pseudomonas mediterranea* σε θρεπτικό υπόστρωμα NA-G 1% glucose



Εικόνα 28. Αποικίες του *Pseudomonas corrugata* σε θρεπτικό υπόστρωμα NA-G 1% glucose (Προσφορά Vittoria Catara)



Εικόνα 29. Καλλιέργεια βακτηριακών στελεχών σε θρεπτικό υπόστρωμα NA-G 1% glucose, διαχέομενη χρωστική

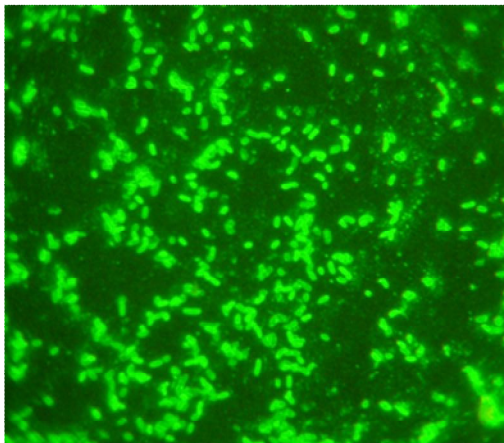


Εικόνα 30. Φαινότυπος των στελεχών αναφοράς *Pseudomonas mediterranea* CFBP5447T (1) και *Pseudomonas mediterranea* CFBP5447T (3), σε θρεπτικό υπόστρωμα NA-G

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΤΕΧΝΗΤΕΣ ΜΟΛΥΝΣΕΙΣ



Εικόνα 31. Ταυτοποίηση βακτηριακών στελεχών με δοκιμές API 20NE (*Pseudomonas mediterranea* CFBP5447T (3) (PM2), *Pseudomonas viridiflava* TEIC273 και *Pseudomonas cichorii* SF0057-02/Type 2)



Εικόνα 32. Ανίχνευση του βακτηρίου *Pseudomonas corrugata* με τη μέθοδο του ανοσοφθορισμού



Εικόνα 33. Νέκρωση της εντεριώνης σε φυτό τομάτας μετά από τεχνητή μόλυνση με οδοντογλυφίδα



Εικόνα 34. Επίκτητες ρίζες σε νεαρό φυτό τομάτας μετά από τεχνητή μόλυνση με οδοντογλυφίδα



Εικόνα 35. Νέκρωση της εντεριώνης σε χρυσάνθεμο μετά από τεχνητή μόλυνση με οδοντογλυφίδα



Εικόνα 36. Επίκτητες ρίζες σε ανεπτυγμένο φυτό τομάτας μετά από τεχνητή μόλυνση με σόρυγγα (μετά 2 μήνες)



Εικόνα 37. Νέκρωση της εντεριώνης σε ανεπτυγμένο φυτό τομάτας μετά από τεχνητή μόλυνση με σόρυγγα (μετά 3 μήνες)



Εικόνα 38, 39. Νέκρωση της εντεριώνης σε ανεπτυγμένο φυτό τομάτας μετά από τεχνητή μόλυνση με σφύγγα (μετά 3 μήνες)



Εικόνα 40, 41. Συμπτώματα νέκρωσης της εντεριώνης σε ανεπτυγμένα φυτά τομάτας μετά από τεχνητή μόλυνση με σφύγγα.