



Τ.Ε.Ι. ΚΡΗΤΗΣ

ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΜΟΡΙΑΚΗ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΑΠΟΜΟΝΩΣΕΩΝ

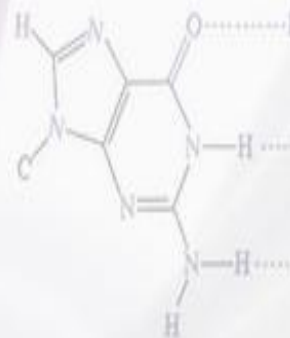
ΤΟΥ ΒΑΚΤΗΡΙΟΥ *Pseudomonas viridiflava*

ΑΠΟ ΔΙΑΦΟΡΟΥΣ ΞΕΝΙΣΤΕΣ

ΜΠΑΛΑΝΤΙΝΑΚΗ ΕΥΑΓΓΕΛΙΑ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: Δρ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ ΓΚΟΥΜΑΣ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2012



Τ.Ε.Ι ΚΡΗΤΗΣ

ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΜΟΡΙΑΚΗ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΑΠΟΜΟΝΩΣΕΩΝ

ΤΟΥ ΒΑΚΤΗΡΙΟΥ *Pseudomonas viridiflava*

ΑΠΟ ΔΙΑΦΟΡΟΥΣ ΞΕΝΙΣΤΕΣ

ΜΠΑΛΑΝΤΙΝΑΚΗ ΕΥΑΓΓΕΛΙΑ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: Δρ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ ΓΚΟΥΜΑΣ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2012

*Αφιερωμένο στους Μάνο,
Μαρία και Γιώργο...*

Ευχαριστίες

Φτάνοντας στο τέλος της παρούσας εργασίας θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου σε όλους αυτούς, που ο καθένας με τον τρόπο του βοήθησε να πραγματοποιηθεί η πτυχιακή μου εργασία με επιτυχία.

Κατ' αρχήν, ευχαριστώ από καρδιάς τον επιβλέπων καθηγητή μου, Δρ. Δημήτριο Γκούμα, όχι μόνο για την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με το συγκεκριμένο αντικείμενο, αλλά και για τη βοήθεια που μου προσέφερε κατά τη διάρκεια του πειραματικού και θεωρητικού μέρους της πτυχιακής μου. Δίπλα του απέκτησα πολύτιμες γνώσεις και αγάπησα τον κόσμο του εργαστηρίου. Είμαι ευγνώμων που γνώρισα έναν εξαιρετικό επιστήμονα, μα πάνω απ' όλα ένα θαυμάσιο άνθρωπο.

Επίσης, θέλω να ευχαριστήσω τους Μάνο Τράντα και Παναγιώτη Σαρρή για τη βοήθεια της πραγματοποίησης του μοριακού μέρους της εργασίας, για τις πολύτιμες συμβουλές κατά τη διάρκεια της συγγραφής και για την άψογη συνεργασία που είχα μαζί τους.

Ευχαριστώ θερμά τον Ηλία Καλαμουδάκο για τη συμπαράσταση και την κατανόησή του, για τη βοήθεια που μου προσέφερε αλλά και για την υπομονή του. Η αγάπη που μου δείχνει όλα αυτά τα χρόνια μου δίνει δύναμη και είναι ανεκτίμητη.

Δεν θα μπορέσω, βεβαίως, να παραλείψω να ευχαριστήσω θερμά όλους τους φίλους μου, οι οποίοι στέκονται δίπλα μου όλα αυτά τα χρόνια και για τα όμορφα φοιτητικά χρόνια που περάσαμε παρέα. Επίσης, οφείλω ένα ευχαριστώ στα κορίτσια του εργαστηρίου για την άψογη συνεργασία, τη βοήθεια και τις όμορφες στιγμές που έχω να θυμάμαι κατά τη διάρκεια της παραμονής μου στο εργαστήριο Φυτοπαθολογίας-Βακτηριολογίας. Νιώθω πως έχω αποκτήσει μια καινούργια παρέα, μα πάνω απ' όλα καινούργιες φίλες.

Όμως, το μεγαλύτερο ευχαριστώ το χρωστάω στην οικογένεια μου, συγκεκριμένα στους γονείς μου, Μάνο και Μαρία και στον αδελφό μου Γιώργο, για τη στήριξη, την κατανόηση, την αγάπη τους, την ηθική και οικονομική βοήθεια, αλλά και για τη συνεχή τους παρουσία όλα αυτά τα χρόνια. Ευχαριστώ θερμά από τα βάθη της καρδιάς μου.

Με εκτίμηση,
Μπαλαντινάκη Ευαγγελία.

Περίληψη

Το βακτήριο *Pseudomonas viridiflava* θεωρείται ότι είναι ένα κοσμοπολίτικο, ευκαιριακό παθογόνο με μεγάλο εύρος ξενιστών. Ανήκει στα φθορίζοντα πηκτινολυτικά βακτήρια και στην ομάδα II των δοκιμών LOPAT, με φαινότυπο (- - + - +). Στην Ελλάδα, το βακτήριο έχει αναφερθεί ως το παθογόνο αίτιο της νέκρωσης της εντεριώνης της τομάτας, της βακτηριακής σήψης της τομάτας, της μελιτζάνας, της πιπεριάς και του χρυσάνθεμου, της βακτηριακής κηλίδωσης της τομάτας, βλήτου, μελιτζάνας, πεπονιάς, αγγουριάς, αγκινάρας, σέλινου, άκανθου και συγκόνιου. Επιπλέον, το βακτήριο έχει αναφερθεί ως ένα πραγματικό ή ευκαιριακό παθογόνο στο ακτινίδιο, στο ραπανάκι, στη φασολιά, στο κρεμμύδι, στη μηδική, στο δαύκο, στην ποισέντια, στην τομάτα και σε πληθώρα άλλων φυτών. Σκοπός της εργασίας αυτής είναι να επιβεβαιωθεί βιοχημικά και μοριακά ο προκαταρκτικός προσδιορισμός των βακτηριακών στελεχών ως *Pseudomonas viridiflava* που υπήρχαν στη συλλογή του εργαστηρίου Βακτηριολογίας του ΤΕΙ Κρήτης. Από 64 απομονώσεις του βακτηρίου, επιλέχθηκαν 26 από διάφορους ξενιστές και αφού επιβεβαιώθηκε η φαινοτυπική ταυτοποίησή τους και ελέγχθηκε η παθογένειά τους, προχωρήσαμε στη μοριακή ταυτοποίηση των 18 εξ αυτών. Από τα αποτελέσματα που προέκυψαν με βάση το μορφολογικό, φυσιολογικό, βιοχημικό φαινοτυπικό προφίλ αλλά και τις δοκιμές παθογένειας, επιβεβαιώθηκε ότι όλα τα βακτηριακά στελέχη ανήκουν στο βακτήριο *Pseudomonas viridiflava*. Στο ίδιο συμπέρασμα καταλήξαμε χρησιμοποιώντας τη μεθοδολογία αποτύπωσης μέσω της αλληλούχισης πολλαπλών γενωμικών περιοχών (Multilocus Sequence Typing, MLST) με τη χρήση των γονιδίων *gyrB*, *groD* και *groB*. Οι αλληλουχίσεις των τριών γονιδίων έδειξαν πολύ υψηλή ομολογία με τα στελέχη αναφοράς του *Pseudomonas viridiflava* που είναι καταχωρημένα στη βάση δεδομένων National Center for Biotechnology Information (NCBI).

Περιεχόμενα

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΡΩΤΟ ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.1 Γενικά για το παθογόνο βακτήριο <i>Pseudomonas viridiflava</i>	2
1.2 Εμφάνιση του βακτηρίου <i>Pseudomonas viridiflava</i> στον Ελλαδικό χώρο.....	2
1.2.1 Ασθένειες που προκαλούνται από το βακτήριο <i>Pseudomonas viridiflava</i>	3
1.2.2 Άλλοι ξενιστές του <i>Pseudomonas viridiflava</i>	7
1.3 Ταυτοποίηση του παθογόνου	9
1.4 Βιοχημική ταυτοποίηση του παθογόνου.....	9
1.5 Μοριακή ταυτοποίηση του παθογόνου.....	9
1.5.1 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)	10
1.5.2 rep-PCR	12
1.5.3 MLST (MultiLocus Sequence Typing)	13
1.5.4 Επιλογή γονιδίων προς αλληλούχιση.....	14
1.6 Αλληλούχιση DNA (DNA sequencing).....	14
1.7 Σκοπός της εργασίας.....	15
ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΔΕΥΤΕΡΟ ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	16
2.1 Εξαγωγή βακτηριακών στελεχών από τη συλλογή	17
2.2 Βιοχημική ταυτοποίηση των απομονώσεων	17
2.3 Δοκιμές παθογένειας.....	19
2.4. Μοριακή ταυτοποίηση απομονώσεων του βακτηρίου <i>Pseudomonas viridiflava</i> 20	
2.4.1 Δημιουργία υγρής καλλιέργειας για απομόνωση DNA	20
2.4.2 Απομόνωση ολικού DNA από βακτηριακά κύτταρα.....	20
2.4.3 Ηλεκτροφόρηση απομονωμένου DNA σε πήκτωμα αγαρόζης.....	21
2.4.4 Φωτομέτρηση των δειγμάτων.....	21
2.5 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR)	22

2.5.1 Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για τις αντιδράσεις PCR.....	22
2.6 Αντιδράσεις PCR.....	23
2.6.1 BOX και ERIC-PCR	24
2.6.2 <i>gyrB</i> -PCR.....	25
2.6.3 <i>rpoD</i> -PCR.....	25
2.6.4 <i>rpoB</i> -PCR	26
2.6.5 Επιβεβαίωση των προϊόντων της PCR με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1,3% w/v.....	27
2.7 Απομόνωση επιθυμητού τμήματος DNA από πήκτωμα αγαρόζης.....	27
ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΡΙΤΟ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	29
3.1 Βιοχημική ταυτοποίηση.....	30
3.2 Δοκιμές παθογένειας.....	31
3.3 Μοριακή ταυτοποίηση.....	32
3.3.1 Ανίχνευση απομονωμένων DNA σε πήκτωμα αγαρόζης.....	32
3.3.2 Υπολογισμός συγκεντρώσεων απομονωμένων DNA.....	33
3.3.3 Αποτελέσματα της <i>rep</i> -PCR	33
3.3.4 Αποτελέσματα <i>gyrB</i> -PCR, <i>rpoD</i> -PCR και <i>rpoB</i> -PCR.....	35
3.3.5 Αποτελέσματα αλληλούχισης των γονιδίων <i>gyrB</i> , <i>rpoD</i> , <i>rpoB</i>	35
ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΕΤΑΡΤΟ ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	42
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	46
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	50
A.1 Φωτογραφικό υλικό.....	51
A.2 Εργασίας προς δημοσίευση.....	57

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΡΩΤΟ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Γενικά για το παθογόνο βακτήριο *Pseudomonas viridiflava*.

Τα φυτοπαθογόνα βακτήρια του γένους *Pseudomonas* έχουν ραβδόμορφα ή ελαφρώς κυρτωμένα κύτταρα, είναι αρνητικά κατά Gram (Εικ. 38), αυστηρά αερόβια, κινούμενα με πολικά μαστίγια. Τα περισσότερα από αυτά χαρακτηρίζονται ως φθορίζοντα, λόγω της ικανότητας τους να εκλύουν φθορίζουσα μπλε-πράσινη χρωστική όταν αναπτύσσονται σε θρεπτικό υπόστρωμα King B. Το γένος *Pseudomonas* είναι ένα από τα πλέον ποικιλόμορφα είδη και η ταξινόμηση του έχει υποστεί πολλές αλλαγές τα τελευταία χρόνια. Τα μέλη του γένους *Pseudomonas* (*sensu stricto*) υπάγονται στην ομάδα I RNA του Pelleroni, στην υποκλάση των γ-προτεοβακτηρίων (γ-proteobacteria). Ο αριθμός των ειδών στο γένος *Pseudomonas* αυξάνει κάθε χρόνο, το 2007 ήταν 102, το 2008 ήταν 109, το 2009 αυξήθηκε σε 114 και το 2010 ήταν 118. Η διαγνωστική ομάδα δοκιμών L.O.P.A.T. (L-παραγωγή Levan, O-παραγωγή οξειδάσης, P-πηκτινόλυση κονδύλων πατάτας, A-διάσπαση αργινίνης, T-υπερευαισθησία καπνού) χρησιμοποιείται ευρέως για την προκαταρκτική διαφοροποίηση και ομαδοποίηση των φθορίζουσών ψευδομονάδων σε διάφορες υποομάδες. Οι απομονώσεις του *Pseudomonas viridiflava* κατατάσσονται στην υποομάδα II κατά Lelliott *et al.* (1966).

1.2 Εμφάνιση του βακτηρίου *Pseudomonas viridiflava* στον Ελλαδικό χώρο

Στην Ελλάδα το *Pseudomonas viridiflava* προκαλεί σημαντικά προβλήματα σε καλλιέργειες τομάτας (νέκρωση της εντεριώνης) και αγγουριάς (βακτηριακή κηλίδωση) σε θερμοκηπιακές και υπαίθριες καλλιέργειες (Goumas *et al.*, 1999). Το εν λόγω βακτήριο έχει αναφερθεί ως το παθογόνο αίτιο της νέκρωσης της εντεριώνης της τομάτας (Alivizatos, 1986), της βακτηριακής σήψης της τομάτας, της μελιτζάνας (Εικ. 20, 21), της πιπεριάς και του χρυσάνθεμου (Malathrakis & Goumas, 1985 & 1987) (Goumas & Chatzaki, 1998), της βακτηριακής κηλίδωσης σε: τομάτα, βλήτο, μελιτζάνα (Εικ. 20, 21), πεπονιά (Goumas & Chatzaki, 1998), αγγουριά (Malathrakis & Goumas, 1985), αγκινάρα (Goumas *et al.*, 2008), σέλινο (Goumas *et al.*, 2006), άκανθο (Goumas *et al.*, 2008) και συγκόνιο (Goumas *et al.*, 2009). Στην Ελλάδα ανάλογα με την καλλιέργεια, μπορεί να προκαλέσει απώλεια μέχρι και 50% του φυλλώματος στην περίπτωση των βακτηριακών κηλιδώσεων ή την απώλεια του 20% των φυτών σε εντατικές καλλιέργειες χρυσάνθεμου, ενώ στο φυτώριο η καταστροφή μπορεί να είναι

ολοκληρωτική. Σε καλλιέργειες τομάτας έχουν σημειωθεί απώλειες που κυμαίνονται στο 15-40% των φυτών σε θερμοκηπιακές καλλιέργειες ή του 60% της παραγωγής σε υπαίθριες καλλιέργειες.

Το βακτήριο *Pseudomonas viridiflava* στην Κρήτη, θεωρείται ότι είναι ένα καλά εγκατεστημένο παθογόνο σε διάφορες κηπευτικές και ανθοκομικές καλλιέργειες. Το γεγονός ότι στην Κρήτη οι προηγούμενες αναφερθείσες καλλιέργειες εναλλάσσονται ή διαδέχονται ή/και συνυπάρχουν στην ίδια περιοχή σε διαφορετικές καλλιεργητικές περιόδους, έχει ως αποτέλεσμα τη διατήρηση και τη μεταφορά του μολύσματος από τη μία καλλιέργεια στην άλλη (υπαίθρια ή θερμοκηπιακή). Από το 1985, η σταθερή εμφάνιση ή/και η έξαρση των ασθενειών αυτών συνδέονται με κλιματολογικές συνθήκες που ευνοούν την ανάπτυξη του παθογόνου, ενώ ταυτόχρονα φαίνεται να υποβοηθούν τη μόλυνση των φυτών από το παθογόνο.

Οι ψυχρές και υγρές συνθήκες στο θερμοκήπιο κατά τη διάρκεια του χειμώνα, όπου τα φυτά είναι εύχυμα και ζωηρά λόγω των υψηλών αζωτούχων λιπάνσεων, η παρατεταμένη διύγρανση τους, οι χαμηλές θερμοκρασίες νύχτας (<15°C), ο μειωμένος φωτισμός συνδυαζόμενα συχνά με την απουσία επεμβάσεων με χαλκούχα σκευάσματα ή/και με την πιθανή ανθεκτικότητα του παθογόνου στο χαλκό, αποτελούν τις ιδανικές συνθήκες για την έναρξη της μόλυνσης από το παθογόνο. Από την άλλη μεριά, η επιφυτική επιβίωση του βακτηρίου είναι απόλυτα τεκμηριωμένη. Η εμφάνιση της ασθένειας σε πολλούς και διαφορετικούς ξενιστές καθώς και η επανεμφάνιση της στα ίδια θερμοκήπια ευνοϊκές συνθήκες που προδιαθέτουν τα φυτά για τη μόλυνση κατά τη διάρκεια του χειμώνα στην Κρήτη, ενισχύουν την άποψη της πλειονότητας των ερευνητών, που αναφέρονται και θεωρούν το βακτήριο *Pseudomonas viridiflava* ως ένα ευκαιριακό παθογόνο (Goumas & Chatzaki, 1998).

1.2.1 Ασθένειες που προκαλούνται από το βακτήριο *Pseudomonas viridiflava*

Οι σημαντικότερες βακτηριολογικές ασθένειες που προκαλούνται από το βακτήριο *Pseudomonas viridiflava* είναι οι εξής:

- **Βακτηριακή κηλίδωση κολοκυνθοειδών (αγγουριά, πεπονιά) (Εικ. 14, 15, 16).** Οι πρώτες κηλίδες εμφανίζονται στα κατώτερα φύλλα αναπτυγμένων φυτών νωρίς το χειμώνα και στη συνέχεια επεκτείνονται προς τα ανώτερα φύλλα. Οι προσβολές

αρχίζουν από τις θέσεις του φύλλου που διατηρούνται βρεγμένες για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα, όπως η περιφέρεια και οι πτυχές του φύλλου.

Για την αντιμετώπιση της ασθένειας ο καλός αερισμός του θερμοκηπίου είναι σημαντικός για το περιορισμό της υγρασίας των φυτών. Μόλις διαπιστωθούν οι πρώτες προσβολές συστήνονται εφαρμογές ψεκασμών καλύψεως με χαλκούχα σκευάσματα σε μικρότερες συγκεντρώσεις. Σε περίπτωση έντονης προσβολής, είναι απαραίτητη η αφαίρεση και το κάψιμο των προσβεβλημένων κατώτερων φύλλων (Γκούμας, 2006).

- **Βακτηριακή κηλίδωση των καρπών τομάτας (Εικ. 18, 19).** Η ασθένεια διαπιστώνεται κυρίως στις υπαίθριες καλλιέργειες τομάτας της Κρήτης, προκαλώντας συχνά τη σημαντική ποιοτική υποβάθμιση των καρπών. Αρχικά σε άωρους καρπούς παρατηρούνται υδαρείς ανοιχτού καστανού χρώματος κηλίδες. Το μέγεθος των κηλίδων αυξάνεται καθώς οι καρποί μεγαλώνουν και ωριμάζουν. Το κέντρο των κηλίδων σταδιακά ξεραίνεται παίρνοντας διαδοχικά χρώμα γκρι, καστανό ή και μαύρο ενώ περιβάλλεται από στενό μαύρο περιθώριο. Τα συμπτώματα της ασθένειας είναι χαρακτηριστικά και διαφοροποιούνται εύκολα από εκείνα άλλων κηλιδώσεων των καρπών της τομάτας (βακτηριακή στιγμάτωση ή βακτηριακή κηλίδωση). Το παθογόνο έχει μεγάλο εύρος ξενιστών, επιβιώνει επιφυτικά σε πολλά καλλιεργούμενα φυτά και ζιζάνια και προκαλεί μολύνσεις τις βροχερές περιόδους που συνοδεύονται από αέρα. Η αντιμετώπιση της ασθένειας θεωρείται δύσκολη και επιτυγχάνεται μόνο με προληπτικούς ψεκασμούς με χαλκούχα σκευάσματα κατά τις περιόδους των μολύνσεων (Γκούμας, 2006).

- **Βακτηριακή σήψη τομάτας (Εικ. 17).** Η ασθένεια αποτελεί σημαντικό πρόβλημα στις καλλιέργειες θερμοκηπίου. Σε πρώιμο στάδιο παρατηρείται περιφερειακό και μεσονεύριο κιτρίνισμα στα κατώτερα φύλλα που σταδιακά επεκτείνεται σε όλο το φύλλωμα του φυτού. Στο φλοιό συνήθως παρατηρούνται εκτενείς επιμήκεις κηλιδώσεις, που συνήθως ξεκινούν από θέσεις τομών και οι οποίες καταλήγουν σε έλκη με σταδιακή διάρρηξη και αποσύνθεση των προσβεβλημένων ιστών. Παρόμοιος μεταχρωματισμός και έλκη δημιουργούνται σε μίσχους και ποδίσκους. Τα αγγεία και η εντεριώνη του στελέχους εμφανίζουν έντονο κίτρινο-καστανό μεταχρωματισμό ο οποίος επεκτείνεται προς τους μίσχους, τους ποδίσκους και τις ρίζες του φυτού. Η εντεριώνη αρχικά εμφανίζεται υδαρής με έντονο πράσινο

χρωματισμό και στη συνέχεια αποσυντίθεται, σήπεται και συρρικνώνεται αφήνοντας τη θέση της κενή. Σπανιότερα, παρατηρείται υγρή σήψη σε καρπούς που φέρονται σε προσβεβλημένα φυτά, μπορεί όμως να εκδηλωθεί κατά τη διάρκεια της διακίνησης και αποθήκευσης. Η μόλυνση ξεκινά από ένα ή περισσότερα σημεία και γρήγορα μετατρέπει το καρπό σε μια μαλακή υδαρή άμορφη μάζα. Η αρχική μόλυνση γίνεται από πληγές που προκαλούνται από τις τομές του κλαδέματος, από τις ρίζες και από το σπόρο. Τα παθογόνα επιβιώνουν επιφυτικά σε φυτά τομάτας αλλά και σε πολλούς άλλους ξενιστές και ζιζάνια, στο έδαφος, στις επιφάνειες του θερμοκηπίου και στο νερό. Για την αντιμετώπιση της ασθένειας πρέπει να ληφθούν προληπτικά μέτρα όπως η βελτίωση του αερισμού του θερμοκηπίου και η ισορροπημένη λίπανση. Τα εργαλεία πρέπει να απολυμαίνονται με εμβάπτιση σε οινόπνευμα και μετά από κάθε καθαρισμό και κλάδεμα των φυτών συστήνονται επεμβάσεις με χαλκούχα. Κατά τη συλλογή, οι καρποί πρέπει να μην είναι υγροί και να αποφεύγεται ο τραυματισμός τους και η έκθεσή τους στον ήλιο. Σε περίπτωση εντοπισμού ασθενών φυτών είναι απαραίτητη η εκρίζωση και το κάψιμο αυτών (Γκούμας, 2006). Στην ίδια ασθένεια εμπλέκονται και άλλα βακτήρια (*Pseudomonas corrugata*, *Pseudomonas cichorii*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pectobacterium carotovorum* και *Pectobacterium atrosepticum*) που η προσβολή τους εκδηλώνεται με παρόμοια συμπτωματολογία.

- **Κηλίδωση βρακτίων φύλλων αγκινάρας (*Cynara scolymus* L) (Εικ. 22, 23).**

Πρόκειται για μια νέα ασθένεια της αγκινάρας που σημειώθηκε στην Κρήτη. Η προσβολή εκδηλώθηκε σε ποσοστό 70% του συνόλου των κεφαλών της καλλιέργειας.

Τα συμπτώματα της προσβολής εντοπίζονται στις κεφαλές (άωρες ταξιανθίες) του φυτού. Η προσβολή εκδηλώνεται μόνο στα βράκτια φύλλα της ταξιανθίας, αρχικά με την εμφάνιση υδαρών κηλίδων με έντονο πράσινο χρωματισμό. Ανάλογα με το στάδιο ανάπτυξης της ταξιανθίας και των βρακτίων φύλλων (εσωτερικά ή εξωτερικά) αλλά και το στάδιο εξέλιξης της προσβολής οι παρατηρούμενες κηλίδες μπορεί να είναι βυθισμένες, λιγότερο ή περισσότερο επιμήκεις, με υδαρή ή νεκρωτική όψη, μεμονωμένες ή να συνενώνονται και να σχηματίζουν μεγαλύτερα τμήματα με νεκρωτική ή και υδαρή εμφάνιση. Το κέντρο των κηλίδων συνήθως αποκτά χρωματισμούς που κυμαίνονται από έντονο πράσινο μέχρι καστανό και μαύρο χρώμα. Συχνά η κηλίδα οριοθετείται από ένα λεπτό υδατώδες περιθώριο. Τέλος οι κηλίδες ή τα

προσβεβλημένα νεκρωτικά τμήματα συνήθως περιβάλλονται από ένα ευρύ περιθώριο καστανοκόκκινου – ιώδους χρωματισμού. Η ασθένεια μειώνει δραστικά την εμπορευσιμότητα των κεφαλών (Γκούμας, 2006).

- **Βακτηριακή κηλίδωση ακάνθου (Εικ. 24, 25).** Η ασθένεια εντοπίστηκε την άνοιξη του 2006, σε συστάδες φυτών που αναπτύσσονταν στο βοτανικό κήπο του Τεχνολογικού Εκπαιδευτικού Ιδρύματος Κρήτης στο Ηράκλειο. Παρατηρήθηκε έντονη κηλίδωση των φύλλων που σταδιακά προκαλούσε την καταστροφή του φυλλώματος. Η εκδήλωση της ασθένειας αρχίζει με την εμφάνιση τεφρών μέχρι έντονα καστανών κηλίδων. Συχνά οι νεκρωτικές κηλίδες εμφανίζονται με την μορφή ομόκεντρων κύκλων και συνήθως περιβάλλονται από χλωρωτική άλω. Η αποκοπή και πτώση των νεκρωμένων ιστών προσδίδει στο φύλλωμα κουρελιασμένη όψη. Σε συνθήκες υψηλής υγρασίας και σκίασης παρατηρείται γρήγορη καταστροφή του φυλλώματος και μείωση της ανάπτυξης του φυτού. Τα προσβεβλημένα φυτά σπάνια καταστρέφονται, όμως η αισθητική τους υποβάθμιση είναι σημαντική. Σπανιότερα παρατηρήθηκε κηλίδωση των βρακτίων φύλλων στο στάχυ της ανθοταξίας.

- **Βακτηριακή κηλίδωση συγκόνιου (Εικ. 26, 27).** Η εκδήλωση της ασθένειας αρχίζει με την εμφάνιση υδαρών κηλίδων, που συνήθως οριοθετούνται από τις δευτερεύουσες νευρώσεις του ελάσματος του φύλλου. Σταδιακά οι κηλίδες νεκρώνονται και αποκτούν χρώμα καστανό μέχρι σκούρο μαύρο. Συχνά η έναρξη της προσβολής γίνεται από την περιφέρεια του φύλλου και σταδιακά επεκτείνεται προς το εσωτερικό του ελάσματος. Τέλος η συνένωση των κηλίδων οδηγεί συνήθως στη νέκρωση μεγάλου τμήματος του ελάσματος του φύλλου. Σε συνθήκες υψηλής υγρασίας και σκίασης παρατηρείται γρήγορη καταστροφή του φυλλώματος και μείωση της ανάπτυξης του φυτού. Τα προσβεβλημένα φυτά σπάνια καταστρέφονται, όμως η αισθητική τους υποβάθμιση είναι σημαντική (Χαλακατεβάκη, 2008)

- **Βακτηριακή κηλίδωση σέλινου (Εικ. 28, 29).** Αρχικά παρατηρούνται κηλίδες υδαρείς που σταδιακά εξελίσσονται σε νεκρωτικές με ή χωρίς χλωρωτικό περιθώριο. Συνήθως οι κηλίδες περιορίζονται μεταξύ των νευρώσεων του φύλλου και έχουν χρώμα καστανό. Συχνά τα συμπτώματα συγχέονται με εκείνα που προκαλούνται από το *Pseudomonas syringae* pv. *arpii*. Η διαφορά που παρατηρείται μεταξύ των προσβολών από τα δύο βακτηρία εκδηλώνεται με την πιο γρήγορη εξέλιξη της ασθένειας στην

περίπτωση του *Pseudomonas viridiflava* και με τις κηλίδες να είναι συνήθως μεγαλύτερες και συχνά χωρίς χλωρωτική περιθώριο (Λαλλά, 2003.)

1.2.2 Άλλοι ξενιστές του *Pseudomonas viridiflava*

Το βακτήριο *Pseudomonas viridiflava* θεωρείται ότι είναι ένα κοσμοπολίτικο, ευκαιριακό παθογόνο (Billing, 1970, Burkholder, 1930, Wilkie *et al.*, 1973) με μεγάλο εύρος ξενιστών που εκτείνεται τουλάχιστον σε 31 διαφορετικά είδη, που ανήκουν σε 14 διαφορετικές οικογένειες (Bradbury, 1986). Το *Pseudomonas viridiflava* θεωρείται ευκαιριακό παθογόνο επειδή ζει επιφυτικά στην επιφάνεια των φυτών και προκαλεί ασθένειες σε διάφορα φυτά όταν οι περιβαλλοντολογικές συνθήκες είναι ευνοϊκές. Η ικανότητα να προκαλεί σήψεις στους φυτικούς ιστούς, οφείλεται κατά βάση στην παραγωγή διαφόρων ενζύμων που είναι απαραίτητα για τη διάσπαση των κυτταρικών τοιχωμάτων των φυτών. Η επιδημική μορφή εμφάνισής του σε αρκετές καλλιέργειες υποδεικνύει ότι το βακτήριο θα μπορούσε να αποτελέσει ένα επικίνδυνο παθογόνο το οποίο απαιτεί ιδιαίτερη παρακολούθηση σε συνθήκες θερμοκηπίου.

Γενικότερα, το βακτήριο έχει αναφερθεί ως ένα πραγματικό ή ευκαιριακό παθογόνο στο ακτινίδιο, στο ραπανάκι, στη φασολιά, στο κρεμμύδι, στη μηδική, στο δαύκο, στην ποισέντια, στην τομάτα και σε πληθώρα άλλων φυτών (CABI, 2012). Στον Πίνακα 1 παρουσιάζονται αναλυτικά οι ξενιστές καθώς και τα συμπτώματα που προκαλεί το παθογόνο. Η συμπτωματολογία που προκαλεί το *Pseudomonas viridiflava* δεν διαφοροποιείται από εκείνη που προκαλείται από άλλα βακτήρια του ίδιου είδους. Συνήθως, προκαλεί μαλακές σήψεις και νεκρωτικές κηλιδώσεις σε στελέχη, φύλλα, οφθαλμούς ή/και καρπούς των φυτών. Συχνά, οι κηλίδες εξελίσσονται σε νεκρωτικές με ή χωρίς χλωρωτικό περιθώριο, προκαλώντας την εκτεταμένη νέκρωση των φυτικών ιστών (blight). Μερικές φορές, το βακτήριο απομονώνεται μαζί με άλλες παθογόνες ψευδομονάδες, όπως το *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* κ.ά. και συχνά στην περίπτωση αυτή θεωρείται ως ένα ασθενές, δευτερογενές παθογόνο (CABI, 2012).

Πίνακας 1. Ξενιστές του *Pseudomonas viridiflava* (προσαρμογή από CABI, 2012)

ΛΑΤΙΝΙΚΗ ΟΝΟΜΑΣΙΑ	ΑΓΓΛΙΚΗ ΟΝΟΜΑΣΙΑ	ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΟΝΟΜΑΣΙΑ	ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΑ
<i>Actinidia chinensis</i>	Chinese gooseberry	Ακτινίδιο	Καρποί: κηλίδωση, εσχάρωση, σήψη, έλκη
<i>Actinidia deliciosa</i>	Kiwifruit	Ακτινίδιο	
<i>Allium cepa</i>	Onion	Κρεμμύδι	
<i>Allium fistulosum</i>	Welsh onion	Κρεμμύδι Ουαλίας	
<i>Allium sativum</i>	Garlic	Σκόρδο	
<i>Anethum graveolens</i>	Dill	Άνηθος	
<i>Apium graveolens</i>	Celery	Σέλινο	
<i>Brassica napus var. napus</i>	Rape	Γογγύλι	
<i>Brassica oleracea var. botrytis</i>	Cauliflower	Κουνουπίδι	
<i>Brassica oleracea var. capitata</i>	Cabbage	Λάχανο	
<i>Brassica oleracea var. gemmifera</i>	Brussels sprouts	Λαχανάκι Βρυξελλών	
<i>Calendula officinalis</i>	Pot marigold	Καλέντουλα	
<i>Capsicum sp.</i>	Peppers	Πιπεριά	Στέλεχος: μεταχρωματισμός αγγείων, νέκρωση εντερίωνης, έλκη, σήψη, μάρανση
<i>Capsicum annuum</i>	Bell pepper	Πιπεριά φλάσκα	
<i>Capsicum frutescens</i>	Chilli	Πιπεριά τσίλι	
<i>Carthamus tinctorius</i>	Safflower	Κάρδαμο	
<i>Chrysanthemum indicum</i>	Chrysanthemum	Χρυσάνθεμο	
<i>Cichorium endivia</i>	Endives	Αντίδι	Άνθη: νέκρωση
<i>Citrullus lanatus</i>	Watermelon	Καρπουζιά	
<i>Citrus aurantium</i>	Sour orange	Νεραντζιά	
<i>Citrus macrophylla</i>	Alemow	Εσπεριδοειδές (Υποκ.)	
<i>Citrus sinensis</i>	Navel orange	Πορτοκάλια	
<i>Coriandrum sativum</i>	Coriander	Κόλιανδρος	Οφθαλμοί: νέκρωση
<i>Cryptotaenia canadensis</i>	Honewort	Σέλινο	
<i>Cucumis melo</i>	Melon	Πεπονιά	
<i>Cucumis sativus</i>	Cucumber	Αγγούρια	
<i>Cucurbita maxima</i>	Giant pumpkin	Κολοκύθα	
<i>Cyclamen persicum</i>	Cyclamens	Κυκλάμινο	Ρίζες: σήψη
<i>Eschscholzia californica</i>	California poppy	Εσχολτσία	
<i>Euphorbia pulcherrima</i>	Poinsettia	Αλεξάνδρινό	
<i>Eutrema wasabi</i>	Wasabi	Ραπάνι (Γαπωνικό)	
<i>Forsythia suspensa</i>	Forsythia	Φορσύθια	
<i>Glycine max</i>	Soy bean	Σόγια	Λαμός: σήψη
<i>Hebe sp.</i>	Hellebore	Ελλέβορος	
<i>Hydrangea sp.</i>	Hydrangeas	Ορτανσία	
<i>Lablab purpureus</i>	Hyacinth bean	Ζουμπούλι	
<i>Lotus corniculatus</i>	Bird's-foot trefoil	Τριφύλλι	
<i>Lupinus angustifolius</i>	Lupin	Λούπινο	
<i>Medicago sativa</i>	Lucerne	Μηδική	
<i>Nicotiana rustica</i>	Wild tobacco	Καπνός	
<i>Ocimum basilicum</i>	Basil	Βασιλικός	
<i>Papaver sp.</i>	Poppies	Παπαρούνα	
<i>Papaver nudicaule</i>	Iceland poppy	Ισλανδική παπαρούνα	
<i>Passiflora edulis</i>	Passionfruit	Φρούτα του δάσους	
<i>Pastinaca sativa</i>	Parsnip	Δαύκος	
<i>Petroselinum crispum</i>	Parsley	Μαϊντανός	
<i>Petunia hybrida</i>	Petunia	Πετούνια	
<i>Phaseolus coccineus</i>	Runner bean	Φασολιά	
<i>Phaseolus lunatus</i>	Lima bean	Φασολιά	
<i>Phaseolus vulgaris</i>	Common bean	Φασολιά	
<i>Pisum sativum</i>	Pea	Αρακάς	
<i>Prunus armeniaca</i>	Apricot	Βερικοκιά	
<i>Prunus avium</i>	Sweet cherry	Κεράσια	
<i>Pyrus communis</i>	European pear	Αχλαδιά	
<i>Ranunculus asiaticus</i>	Garden crowfoot	Νεραγκούλα	
<i>Raphanus sativus</i>	Radish	Ραπανάκι	
<i>Rosa sp.</i>	Roses	Τριανταφυλλιά	
<i>Solanum lycopersicum</i>	Tomato	Τομάτα	
<i>Sorghum bicolor</i>	Sorghum	Σόργο	

<i>Sorghum sudanense</i>	Sudan grass	Σόργο του Σουδάν	
<i>Tanacetum coccineum</i>	Common pyrethrum	Πύρεθρο	
<i>Trifolium pratense</i>	Purple clover	Τριφύλλι	
<i>Tropaeolum majus</i>	Common nasturtium		
<i>Vaccinium corymbosum</i>	Blueberry	Μύρτιλο	
<i>Vicia faba</i>	Broad bean	Κουκιά	
<i>Vigna angularis</i>	Adzuki bean	Κόκκινο φασόλι	
<i>Vigna unguiculata</i>	Cowpea	Φασόλι μαυρομάτικο	
<i>Viola sp.</i>	Violet	Βιολέτα	
<i>Vitis vinifera</i>	Grapevine	Αμπέλι	
<i>Zea mays</i>	Maize	Καλαμπόκι	
<i>Zinnia elegans</i>	Zinnia	Ζίννια	

1.3 Ταυτοποίηση του παθογόνου

Η ταυτοποίηση έχει σαν στόχο την κατάταξη ενός οργανισμού σε συγκεκριμένο γένος και είδος με τη χρήση δοκιμών που στηρίζονται σε μορφολογικά χαρακτηριστικά, σε μεταβολικές ιδιότητες καθώς και στην ανίχνευση χαρακτηριστικών αλληλουχιών βάσεων στο γενετικό υλικό (DNA) των οργανισμών.

1.4 Βιοχημική ταυτοποίηση του παθογόνου

Πρωταρχικό ρόλο στην ταυτοποίηση παίζει η βιοχημική ταυτοποίηση του παθογόνου στην οποία εκμεταλλευόμαστε τις μεταβολικές ιδιότητες του βακτηρίου (διάσπαση υποστρωμάτων, παραγωγή ενζύμων, αξιοποίηση πηγών C και N κ.α. Οι βιοχημικές δοκιμές ποικίλουν ανάλογα με το προς ταυτοποίηση παθογόνο (Schaad, 2001). Στην περίπτωση των βακτηρίων του γένους *Pseudomonas*, η διαγνωστική ομάδα των δοκιμών L.O.P.A.T. (L: παραγωγή Levan, O: παραγωγή οξειδάσης, P: πηκτινόλυση κονδύλων πατάτας, A: διάσπαση αργινίνης, T: υπερευαισθησία καπνού) είναι μια από αυτές που χρησιμοποιείται ευρέως για τη διαφοροποίηση και ομαδοποίηση σε επίπεδο είδους των βακτηρίων του γένους *Pseudomonas* (Conzalez *et al*, 2003). Επιπλέον, εκτός των κλασικών μεθόδων, τα τελευταία χρόνια στα εργαστήρια της φυτοπαθολογίας, χρησιμοποιούνται τυποποιημένες δοκιμές, ανάλογα με το παθογόνο αίτιο, όπως οι δοκιμές api (bioMerieux sa, Marcy l'Etoile - France) και Biolog (www.biolog.com).

1.5 Μοριακή ταυτοποίηση του παθογόνου

Για την ταυτοποίηση των βακτηρίων χρησιμοποιούνται όλο και πιο συχνά μέθοδοι που βασίζονται στο γενετικό τους υλικό (DNA), οι οποίες εμφανίζονται ως πιο αξιόπιστες, πιο απλές και πιο γρήγορες σε σχέση με τις βιοχημικές δοκιμές. Η ταξινόμηση κατά γένη και είδη, παραδοσιακά βασίζονταν σε μεθόδους DNA-DNA

υβριδισμού ενώ η μοντέρνα φυλογενετική ανάλυση βασίζεται όλο και περισσότερο σε μοριακές τεχνικές αποτύπωσης (fingerprinting) όπως αυτές που στηρίζονται στην ανάλυση αλληλουχιών επιλεγμένων γονιδίων (MLST), στην ανάλυση 16S ριβοσωμικών αλληλουχιών, στην BOX και ERIC ανάλυση, στα RFLPs και στα RAPDs.

1.5.1 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

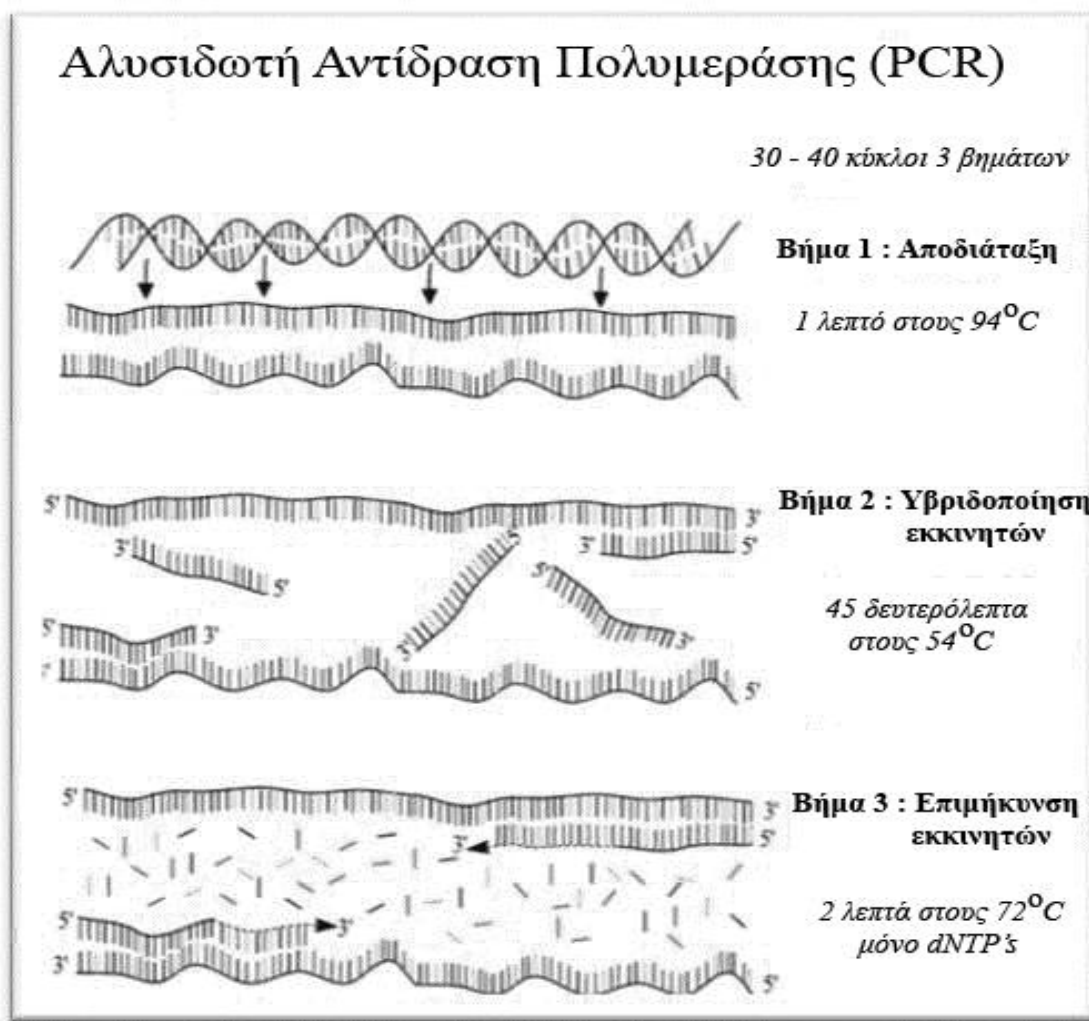
Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) είναι μια μέθοδος που επιτρέπει τον επιλεκτικό πολλαπλασιασμό προεπιλεγμένης αλληλουχίας DNA σε πάρα πολλά αντίγραφα σε σύντομο χρόνο. Η PCR αποτελεί μια νέα τεχνική της μοριακής βιολογίας που εφαρμόζεται εκτενώς τόσο στο χώρο της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

Η μέθοδος χρησιμοποιεί το ένζυμο DNA πολυμεράση και ειδικούς εκκινητές οι οποίοι κατασκευάζονται με βάση την αλληλουχία των άκρων του προς αντιγραφή τμήματος DNA. Η πολυμεράση, χρησιμοποιώντας σαν υπόστρωμα την μία αλυσίδα του DNA, καταλύει την αντίδραση προσθήκης νουκλεοτιδίων στο 3' άκρο της νεοσυντιθέμενης αλληλουχίας, έτσι ώστε να συντεθεί η συμπληρωματική αλυσίδα, αρκεί στο 3' άκρο τους να υπάρχει μια μικρή δίκλωνη περιοχή (Εικ. 1). Οι δίκλωνες αυτές περιοχές μπορούν να δημιουργηθούν με την χρήση εκκινητών, δηλαδή μικρά συνθετικά τμήματα μονόκλωνου DNA, μεγέθους 15-30 νουκλεοτιδίων και έχουν αλληλουχία συμπληρωματική με το 3' της αλυσίδας που θέλουμε να πολλαπλασιάσουμε. Για τον πολλαπλασιασμό μιας δίκλωνης περιοχής DNA απαιτούνται δύο εκκινητές, ένας για το 3' άκρο της κάθε αλυσίδας (Λουλακάκης, 2006).

Η PCR πραγματοποιείται σε τρία κύρια βήματα τα οποία επαναλαμβάνονται 30-40 φορές και εκτελείται σε αυτοματοποιημένο θερμικό κυκλοποιητή, ο οποίος μπορεί

να θερμαίνει και να ψύχει τα δοκιμαστικά δοχεία στα οποία γίνεται η αντίδραση με ακρίβεια και πολύ γρήγορα. Τα στάδια που αποτελούν τον επαναλαμβανόμενο κύκλο είναι τα εξής:

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



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

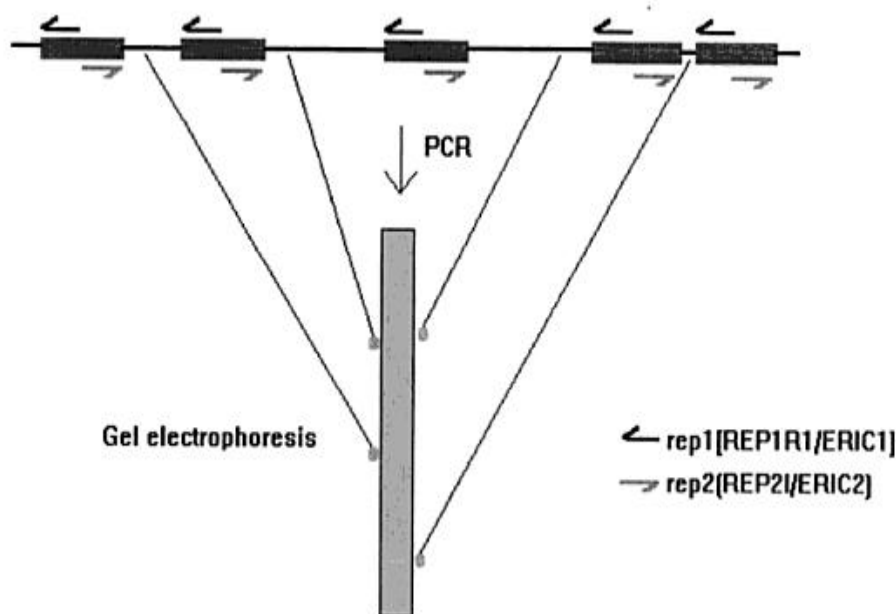
Κατά την διάρκεια του πρώτου σταδίου το τμήμα DNA που μας ενδιαφέρει υποβάλλεται σε θερμοκρασία 94°C προκειμένου να επιτευχθεί ο διαχωρισμός των αλυσίδων του δίκλωνου αυτού DNA (αποδιάταξη / denaturation). Στο δεύτερο στάδιο η

θερμοκρασία μειώνεται στους 50-65°C και έτσι επιτυγχάνεται η ένωση των εκκινητών με τις συμπληρωτικές αλληλουχίες του DNA σε κάθε αλυσίδα (υβριδοποίηση εκκινητών/primer annealing). Στο τρίτο και τελευταίο στάδιο η θερμοκρασία αυξάνεται στους 72°C και με την βοήθεια της DNA πολυμεράσης, που προσθέτει τα νουκλεοτίδια (dNTP's) στο 3' άκρο των εκκινητών, επιτυγχάνεται η σύνθεση των νέων συμπληρωματικών αλυσίδων DNA. Η σύνθεση των αντιγράφων γίνεται από την DNA πολυμεράση πάντα με κατεύθυνση 5' προς 3'.

1.5.2 rep-PCR

Η μέθοδος που αναφέρεται ως rep-PCR αναπτύχθηκε στηριζόμενη στην παρατήρηση της παρουσίας συντηρημένων επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών διασπαρμένων σε ολόκληρο το γονιδίωμα των κατά Gram αρνητικών και θετικών βακτηρίων (Louws *et al.*, 1999) αλλά και μυκήτων (George *et al.*, 1998). Έτσι αναπτύχθηκαν αντίστοιχα οι REP-PCR, ERIC-PCR και BOX-PCR μεθοδολογίες για την ενίσχυση των τμημάτων μεταξύ των παραπάνω επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών (Εικ. 2). Παρόλα αυτά ο όρος rep-PCR χρησιμοποιείται για να περιλάβει όλες τις παραπάνω μεθοδολογίες (Louws *et al.*, 1999). Η μεθοδολογία αποδειχθεί ότι είναι ιδιαίτερα αξιόπιστη, γρήγορη και αναπαραγώγιμη.

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



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

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 (Παγουλάτου, 2011).

1.5.3 MLST (MultiLocus Sequence Typing)

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.

1.5.4 Επιλογή γονιδίων προς αλληλούχιση

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 γονιδίου συμπληρωματικά της μεθόδου DNA-DNA υβριδισμού. Ωστόσο, ο βαθμός ανάλυσης που λαμβάνεται με την ανάλυση της ακολουθίας του 16S rRNA δεν είναι αρκετός να επιτρέψει διακρίσεις ανάλυσης των διαγενετικών σχέσεων, λόγω του εξαιρετικά αργού ρυθμού εξέλιξης του 16S rRNA (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 viridiflava* χρησιμοποιώντας την μεθοδολογία MLST με συνδυασμό των αλληλουχιών των γονιδίων *gyrB*, *rpoD* και *rpoB*.

Το *gyrB* γονίδιο κωδικοποιεί την Β υπομονάδα της 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. Είναι ένα γονίδιο που κωδικοποιεί ένα μέρος του ενζύμου που συνθέτει RNA. Είναι ένα καλά συντηρημένο γονίδιο βασικού μεταβολισμού (housekeeping) και ένα αντίγραφο του είναι παρόν σε όλα τα βακτήρια λόγω του βασικού του ρόλου στο μεταβολισμό των κυττάρων (Tayeb, 2005).

1.6 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 διδεοξυ-νουκλεοτίδια. 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 εκκινήτης 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

Σκοπός της εργασίας αυτής είναι να επιβεβαιωθεί βιοχημικά και μοριακά ο προκαταρκτικός προσδιορισμός των βακτηριακών στελεχών ως *Pseudomonas viridiflava* που υπήρχαν στη συλλογή του εργαστηρίου Βακτηριολογίας του ΤΕΙ Κρήτης. Από ένα σύνολο 64 απομονώσεων του βακτηρίου, επιλέχθηκαν 26 από διάφορους ξενιστές και αφού επιβεβαιώθηκε η φαινοτυπική και βιοχημική ταυτοποίησή τους, ελέγχθηκε η παθογένειά τους και προχωρήσαμε στη μοριακή ταυτοποίηση 18 εξ αυτών.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΔΕΥΤΕΡΟ

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Εξαγωγή βακτηριακών στελεχών από τη συλλογή

Τα βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία προέρχονται από τη συλλογή του εργαστηρίου Βακτηριολογίας του Τ.Ε.Ι. Κρήτης. Με τη βοήθεια αποστειρωμένης οδοντογλυφίδας μεταφυτεύτηκαν από τους σωλήνες διατήρησης και καλλιεργήθηκαν σε τριβλία που περιείχαν θρεπτικό υπόστρωμα King's B και σε όλη τη διάρκεια της εργασίας αναπτύσσονταν σε τριβλία με ίδιο θρεπτικό υπόστρωμα. Τα βακτηριακά στελέχη, καθώς και τα στελέχη αναφοράς που χρησιμοποιήθηκαν στη διάρκεια της μελέτης παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.

2.2 Βιοχημική ταυτοποίηση των απομονώσεων

Αρχικά έγινε έλεγχος φθορισμού σε θρεπτικό υπόστρωμα King's B για να ελεγχθεί αν ανήκουν στις φθορίζουσες ψευδομονάδες. Οι καλλιέργειες των βακτηρίων ήταν αδιαφανείς, κιτρινωπές, κυρτές, γυαλιστερές, βλεννώδεις και παρήγαγαν διαχεόμενη κυανή φθορίζουσα χρωστική. Στη συνέχεια εξετάστηκαν αρχικά ως προς τις δοκιμές L.O.P.A.T. (παραγωγή Levan, δραστηριότητα οξειδάσης, πηκτινόλυση στην πατάτα, αναερόβια διάσπαση αργινίνης, αντίδραση υπερευαισθησίας στον καπνό). Επιπλέον τα βακτηριακά στελέχη PV272, PV3006 και PV442, μαζί με τα στελέχη αναφοράς R1-3 του βακτηρίου *Pseudomonas syringae* pv. *alisalensis* και το στέλεχος *Pseudomonas cichorii* 551 εξετάστηκαν με τις τυποποιημένες βιοχημικές δοκιμές api 20NE.

Πίνακας 2. Στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν από τη συλλογή του εργαστηρίου

Βακτηριακά στελέχη	Κωδικός συλλογής	Ξενιστής	Προέλευση	Χρονολογία απομόνωσης
<i>Pseudomonas viridiflava</i>	261	Σέλινο	Ηράκλειο	28-3-2003
	PV271	Σέλινο	Ηράκλειο	28-3-2003
	272α, PV272, PV272α	Σέλινο	Ηράκλειο	28-3-2003
	PV273, PV273α	Σέλινο	Ηράκλειο	28-3-2003
	PV274	Σέλινο	Ηράκλειο	11-4-2003
	PV276, 276α	Σέλινο	Ηράκλειο	11-4-2003
	PV612	Πεπόνι	Τυμπάκι	
	PV527	Βλήτο	Αγ.Πελαγία	11-2-1997
	PV3005	Μελιτζάνα	Ιεράπετρα	16-5-2000
	PV3006	Μελιτζάνα	Ιεράπετρα	16-5-2000
	PV570	Άκανθος	Ηράκλειο	16-5-2000
	571	Άκανθος	Ηράκλειο	16-5-2000
	573α	Άκανθος	Ηράκλειο	16-5-2000
	574α, PV574α	Άκανθος	Ηράκλειο	16-5-2000
	575α, TKK615	Τομάτα	Αντισκάρι	10-2-2003
	PV441	Τομάτα	Τυμπάκι	21-4-2003
	PV442	Τομάτα	Τυμπάκι	21-4-2003
	1522β ₁	Ρόκα-φύλλα	Μαραθώνας	25-3-2010
	PV608, PV609	Αγκινάρα	Ηράκλειο	2008
	Στελέχη αναφοράς που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία			
<i>Pseudomonas syringae</i>	R1-3	Ρόκα	Μέγαρο	
pv. <i>alisensis</i>	R6	Ρόκα	Ηράκλειο	
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>maculicola</i>	CFBP 1657	Κουνουπίδι	Νέα Ζηλανδία	
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	DC3000	Τομάτα	USA	
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>apii</i>	255α	Σέλινο	Ηράκλειο	
<i>Ascidoovorax avenae</i> pv. <i>cutruli</i>	W ₁	Καρπουζιά	Ισραήλ	
<i>Pseudomonas cichorii</i>	551, 555, 556	Τομάτα-αγγεία	Χανιά (Κουντούρα)	
	SF1047-01 (type 1)		Βέλγιο	
	SF0057-02 (type 2)		Βέλγιο	
	SF0119-01 (type 3)		Βέλγιο	

2.3 Δοκιμές παθογένειας

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

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

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

Επιπλέον, έγιναν μολύνσεις σε νεαρά φυτά τομάτας καθώς και σε φύλλα μαρουλιού, με τα στελέχη του *Pseudomonas cichorii* και του *Pseudomonas viridiflava*.

Οι μολύνσεις στα νεαρά φυτά τομάτας έγιναν με παραλαβή βακτηριακής καλλιέργειας σε θρεπτικό υπόστρωμα King's B με το άκρο της οδοντογλυφίδας και βύθιση αυτού, με πλάγια κλίση, σε βάθος 0.5 εκατοστών στο στέλεχος των φυτών. Τα σημεία στα οποία έγινε η μόλυνση καλύφθηκαν με ειδική ταινία (parafilm) και στη συνέχεια τα φυτά παρέμειναν στο θερμοκήπιο σε συνθήκες υγρασίας 60-70% και θερμοκρασίας 15-26°C περίπου, μέχρι την τελική μέτρηση, δηλαδή περίπου 10 ημέρες. Οι τεχνητές μολύνσεις στα φύλλα μαρουλιού έγιναν με τον ίδιο τρόπο όπως με τις μολύνσεις στους λοβούς φασολιών αλλά και με την εναπόθεση 10μl βακτηριακού αιωρήματος συγκέντρωσης 10^7 cfu/ml στην κύρια νεύρωση του φύλλου που προηγούμενα είχε δημιουργηθεί πληγή.

2.4. Μοριακή ταυτοποίηση απομονώσεων του βακτηρίου *Pseudomonas viridiflava*

2.4.1 Δημιουργία υγρής καλλιέργειας για απομόνωση DNA

Τα στελέχη του βακτηρίου *Pseudomonas viridiflava* που αναγράφονται στον Πίνακα 2 με έντονη γραφή, επιλέχθηκαν για τη μοριακή ταυτοποίηση του παθογόνου. 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 φυγοκέντρηση 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 πρωτεϊνάση 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 φυγοκέντρωση 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 (Tris borate EDTA), διαλύθηκαν 0.4 g αγαρόζης με θέρμανση σε φούρνο μικροκυμάτων και στην συνέχεια προστέθηκαν 2 μl χρωστικής βρωμιούχου αιθυδίου. Το διάλυμα της αγαρόζης, αφέθηκε να πολυμεριστεί για περίπου 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου στη συσκευή ηλεκτροφόρησης, και προστέθηκε διάλυμα TBE αφού είχε τοποθετηθεί χτενάκι για να δημιουργηθούν οι θέσεις τοποθέτησης των δειγμάτων. Μετά τον πολυμερισμό, στα «πηγαδάκια» τοποθετήθηκαν 5 μl από το απομονωμένο DNA των στελεχών καθώς και 1 μl χρωστικής. Στη συνέχεια ακολούθησε η ηλεκτροφόρηση για 45 λεπτά σε 55 V. Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε λ DNA κομμένο με το περιοριστικό ένζυμο PstI. Μετά την ολοκλήρωση της ηλεκτροφόρησης, το πήκτωμα τοποθετήθηκε σε τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας για παρατήρηση.

2.4.4 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 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR)

Για την μοριακή ταυτοποίηση των στελεχών του παθογόνου εφαρμόστηκαν οι παρακάτω τεχνικές PCR μοριακού αποτυπώματος: 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 BOX- και ERIC-PCRs, χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές 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 των εκκινητών.

Πίνακας 3. Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για τις αντιδράσεις PCR

Εκκινητές	Φορά	Αλληλουχία εκκινητών 5'→3'	Μέγεθος ενισχυόμενου τμήματος
BOXA1R		CTACGGCAAGGCGACGCTGACG	
ERIC1R	Fw	ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC	
ERIC2	Rv	AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG	
PvRpoD1	Fw	TGGCCGAGAACCAGTTCCGCGT	615bp
PvRpoD2	Rv	CGGCTTCGTCCAGCTTGTTTCAG	
UP-1E	Fw	CAGGAAACAGCTATGACCAYGSNGGNGGNAARTTYRA	840bp
APrU	Rv	TGTA AAAACGACGGCCAGTGCNGGRTCYTTYTCYTGRCA	
LAPS	Fw	TGGCCGAGAACCAGTTCCGCGT	1250bp
LAPS27	Rv	CGGCTTCGTCCAGCTTGTTTCAG	

2.6 Αντιδράσεις PCR

Για όλες τις αντιδράσεις PCR χρησιμοποιήθηκε ο θερμικός κυκλοποιητής Mastercycler Gradient της εταιρίας Eppendorf (Εικ. 3). Για τις rep-PCR χρησιμοποιήθηκαν όλα τα στελέχη που αναφέρονται αναλυτικά στον Πίνακα 2 ενώ για την ενίσχυση των γονιδίων *gyrB*, *rpoD* και *rpoB* χρησιμοποιήθηκαν τα 18 στελέχη του *Pseudomonas viridiflava* που αναφέρονται στον ίδιο πίνακα με έντονη γραφή.

**Εικόνα 3.** Θερμικός κυκλοποιητής Mastercycler Gradient της εταιρίας Eppendorf

2.6.1 BOX και ERIC-PCR

Αρχικά πραγματοποιήθηκε *rep*-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 4 και 5 αναφέρονται αναλυτικά τα αντιδραστήρια και οι ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν για τις αντιδράσεις.

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

Αντιδραστήριο	Ποσότητα ανά αντίδραση	Τελική συγκέντρωση
DNA template	2.5 µl	100ngr
Kapa Buffer (10x)	2 µl	1x
BOXA1R (50 pMol)	0.25 µl	0.625pMol
dNTPs (από 10 mM)	0.5 µl	0.25mM
MgCl ₂ (από 25 mM)	0.8 µl	1 mM
Taq DNA Polymerase 5units/µl	0.35 µl	1.75units/µl
ddH ₂ O	13.35 µl	
Τελικός όγκος	20 µl	

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

Αντιδραστήριο	Ποσότητα ανά αντίδραση	Τελική συγκέντρωση
DNA template	2.5 µl	100ng
Kapa Buffer	2 µl	1x
ERIC1R (50 pMol)	0.25 µl	0.625pMol
ERIC2 (50 pMol)	0.25 µl	0.625pMol
dNTPs (από 10 mM)	0.5 µl	0.25mM
MgCl ₂ (από 25 mM)	0.8 µl	1 mM
Taq DNA Polymerase 5units/µl	0.35 µl	1.75units
ddH ₂ O	13.35 µl	
Τελικός όγκος	20 µl	

2.6.2 *gyrB*-PCR

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε PCR για την ενίσχυση του γονιδίου *gyrB* με τους εκκινητές UP-1E/APrU. Οι συνθήκες της αντίδρασης ρυθμίστηκαν με το πρόγραμμα που περιγράφεται παρακάτω: 5 λεπτά στους 94°C. Στη συνέχεια ακολούθησαν 35 κύκλοι που ο καθένας αποτελείτο 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 6 αναφέρονται αναλυτικά τα αντιδραστήρια και οι ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν για την αντίδραση.

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

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

2.6.3 *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 αποτελείτο 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.

2.6.4 *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 8 αναφέρονται αναλυτικά τα αντιδραστήρια και οι ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν για την αντίδραση.

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

Αντιδραστήριο	Ποσότητα ανά αντίδραση	Τελική συγκέντρωση
DNA template	2.5 µl	100ngr
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 5units/µl	0.35 µl	1.75units
ddH ₂ O	13.35 µl	
Τελικός όγκος	20 µl	

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

Αντιδραστήριο	Ποσότητα ανά αντίδραση	Τελική συγκέντρωση
DNA template	5 µl	100ngr
Kapa Buffer	2 µl	1x
LAPS (100 pMol)	0.08 µl	0.625pMol
LAPS27 (100 pMol)	0.08µl	0.625pMol
dNTPs (από 10 mM)	0.4 µl	0.25mM
MgCl ₂ (από 25 mM)	1.2 µl	1 mM
Taq DNA Polymerase 5units/µl	0.2 µl	1.75units
ddH ₂ O	11.04 µl	
Τελικός όγκος	20 µl	

2.6.5 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 µl χρωστικής βρωμιούχο αιθύδιο. Το διάλυμα της αγαρόζης, αφέθηκε να πολυμεριστεί για περίπου 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου στη συσκευή ηλεκτροφόρησης και προστέθηκε διάλυμα TBE αφού είχε τοποθετηθεί χτενάκι για να δημιουργηθούν οι θέσεις τοποθέτησης των δειγμάτων. Μετά τον πολυμερισμό, τα δείγματα τοποθετήθηκαν στα «πηγαδάκια» και ακολούθησε η ηλεκτροφόρηση για 90 λεπτά σε 100 V. Η ποσότητα των δειγμάτων που φορτώθηκε ήταν 5 µl και ως μάρτυρας για την εκτίμηση του μεγέθους των ζωνών χρησιμοποιήθηκε DNA του φάγου λ κομμένο με το περιοριστικό ένζυμο PstI. Μετά την ολοκλήρωση της ηλεκτροφόρησης, το πήκτωμα τοποθετήθηκε στην τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας για παρατήρηση.

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

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 σωλήνες 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 σωλήνες συλλογής των 2 ml και φυγοκεντρήθηκαν για ένα λεπτό στις 11.000 στροφές/λεπτό. Στη συνέχεια, οι σωλήνες 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 (rpm/min) και αποθηκεύτηκαν στους -20 °C μέχρι να γίνει η αλληλούχισή τους.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΡΙΤΟ

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Βιοχημική ταυτοποίηση

Σε θρεπτικό υπόστρωμα King B οι καλλιέργειες των βακτηρίων ήταν αδιαφανείς, κιτρινωπές, κυρτές, γυαλιστερές, βλεννώδεις (Εικ. 36) και παρήγαγαν διαχεόμενη κυανή φθορίζουσα χρωστική (Εικ. 39). Αρχικά όλα τα στελέχη εξετάστηκαν ως προς τις δοκιμές L.O.P.A.T. και τα αποτελέσματα αναφέρονται στον Πίνακα 9. Επιπλέον τα βακτηριακά στελέχη PV272, PV442 και PV3006, μαζί με το στέλεχος αναφοράς R1-3 του βακτηρίου *Pseudomonas syringae* pv. *alisalensis* και το στέλεχος *Pseudomonas cichorii* με κωδικό 551 εξετάστηκαν ως προς τις βιοχημικές αντιδράσεις τους στις δοκιμές api 20NE (Εικ. 35) και τα αποτελέσματα αναφέρονται στον Πίνακα 10.

Πίνακας 9. Ταυτοποίηση βακτηριακών στελεχών με βάση τις δοκιμές LOPAT

Βακτηριακά στελέχη *	Levan	Oxidase	Potato	Arginine	Tobacco
<i>Pseudomonas viridiflava</i>	-	-	+	-	+
<i>Pseudomonas cichorii</i>	-	+	-	-	+
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>alisalensis</i>	+	-	-	-	+
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>maculicola</i>	+	-	-	-	+
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	+	-	-	-	+
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>apii</i>	+	-	-	-	+

*Στελέχη του *Pseudomonas viridiflava* : 261, PV271, 272α, PV272, PV272a, PV273, PV273α, PV274, PV276, 276a, PV612, PV527, PV3005, PV3006, PV570, 571, 573a, 574a, PV574a, 575α, TKK615, PV441, PV442, 1522β1, PV608, PV609.

Στελέχη του *Pseudomonas cichorii*: 551, 555, 556, SF1047-01 (type 1), SF0057-02 (type 2), SF0119-01 (type 3)

Στελέχη του *Pseudomonas syringae* pv. *alisalensis*: R1-3, R6

Στελέχη του *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola*: CFBP 1657

Στελέχη του *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*: DC3000

Στελέχη του *Pseudomonas syringae* pv. *apii*

Πίνακας 10. Αποτελέσματα δοκιμών api 20NE με διάφορα βακτηριακά στελέχη

Ουσίες δοκιμών	Βακτηριακά Στελέχη				
	<i>Pseudomonas viridiflava</i>			<i>Pseudomonas cichorii</i>	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>alisalensis</i>
	PV272	PV442	PV3006	551	R ₁₋₃
NO ₃	-	-	-	-	-
Tryptophan	-	-	-	-	-
Glucose	-	-	-	-	-
Arginine	-	-	-	-	-
Urease	-	-	-	-	-
Aesculin	+	+	+	+	-
Gelatine	-	-	-	-	-
β-Galactosidase	-	-	-	-	-
Glucose	+	+	+	+	+
Arabinose	+	+	+	+	+
Mannose	+	+	+	+	+
Mannit	+	+	+	+	+
N-Acetylglucosamin	-	-	-	-	-
Maltose	-	-	-	-	-
Gluconat	+	+	+	+	+
Caprat	-	+	+	+	-
Adipat	-	-	-	-	-
Malat	-	+	+	+	+
Citrat	+	+	+	+	+
Phenylacetat	-	-	-	-	-

3.2 Δοκιμές παθογένειας

Όλα τα βακτηριακά στελέχη, εξετάστηκαν ως προς την ικανότητα έκλυσης αντίδρασης υπερευαισθησίας (HR) και όλα έδωσαν τυπική αντίδραση υπερευαισθησίας, σε φύλλα φυτών καπνού (cv. Xanthi) σε διάστημα 24-48 ωρών (Εικ. 37). Επιπλέον πραγματοποιήθηκαν μολύνσεις σε ροδέλες πατάτας με σκοπό την εξέταση της παραγωγής πηκτινολυτικών ενζύμων. Όλα τα στελέχη προκάλεσαν μαλακή σήψη στις ροδέλες πατάτας (τυπικό σύμπτωμα) σε διάστημα 24-48 ωρών (Εικ. 31).

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 φυτά εκδήλωσαν συμπτώματα σήψης στελέχους, νέκρωσης της εντεριώνης,

μεταχρωματισμού των αγγείων και μάρανση δηλαδή τα τυπικά συμπτώματα της ασθένειας βακτηριακή σήψη της τομάτας (Εικ. 33, 34). Παρόμοια συμπτωματολογία παρατηρήθηκε και στα φυτά που μολύνθηκαν με τα στελέχη του *Pseudomonas cichorii*. Στην περίπτωση αυτή, η νέκρωση της εντεριώνης περιορίστηκε μερικά εκατοστά πέρα από το σημείο της μόλυνσης.

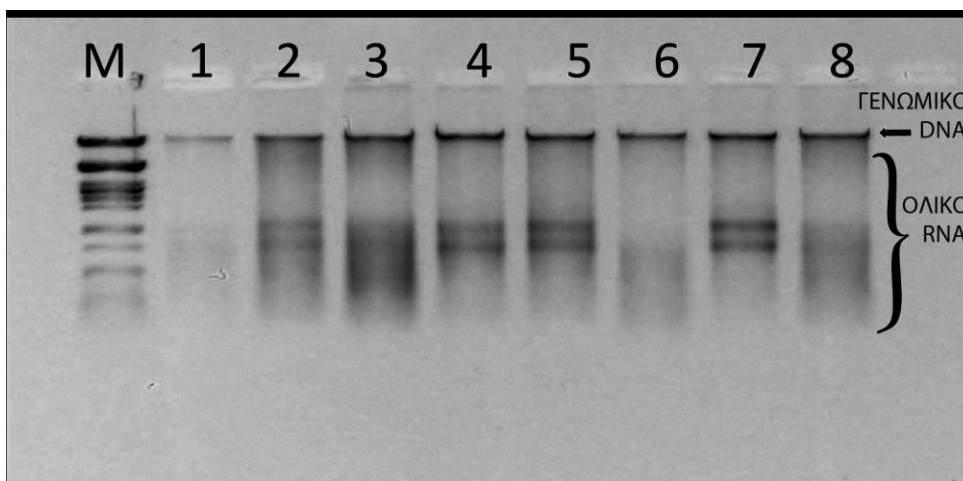
Επίσης, τα στελέχη του *P. viridiflava* χρησιμοποιήθηκαν για να γίνουν τεχνητές μολύνσεις σε λοβούς φασιολιού, όπου σε διάστημα 72 ωρών παρατηρήθηκαν τα τυπικά συμπτώματα που αναπτύσσουν τα βακτήρια του είδους όταν μολύνουν τους λοβούς της φασιολιάς, δηλαδή ερυθρό-πορτοκαλόχροες βυθισμένες κηλίδες (Εικ. 32). Στην περίπτωση των τεχνητών μολύνσεων σε φύλλα μαρουλιού, τα στελέχη του *Pseudomonas cichorii* 551, 555 και 556 παρουσίασαν σκούρα-καστανή νέκρωση-σήψη των κεντρικών νευρώσεων του φύλλου πέρα από τα σημεία μόλυνσης. Από την άλλη, τα στελέχη του *Pseudomonas viridiflava* προκάλεσαν μεταχρωματισμό και μαλακή σήψη των μολυσμένων ιστών (Εικ. 30).

Σε όλες τις περιπτώσεις τα βακτήρια που χρησιμοποιήθηκαν έδωσαν τα αναμενόμενα αποτελέσματα όσο αφορά τα συμπτώματα που προκάλεσαν, ενώ όπου χρησιμοποιήθηκε ως αρνητικός μάρτυρας αποστειρωμένο και αποσταγμένο νερό, δεν παρατηρήθηκε καμία μόλυνση.

3.3 Μοριακή ταυτοποίηση

3.3.1 Ανίχνευση απομονωμένων DNA σε πήκτωμα αγαρόζης

Μετά την ολική απομόνωση του DNA έγινε έλεγχος για να αξιολογηθεί η ποιότητα της κάθε μιας απομόνωσης από τα βακτηριακά κύτταρα. Στην Εικ. 3 παρουσιάζεται ένα πήκτωμα αγαρόζης (0.8% w/v) στο οποίο φορτώθηκαν απομονώσεις ολικού DNA από τα βακτηριακά στελέχη PV271, PV272, PV272α, PV273α, PV273, PV274, PV276, PV618.



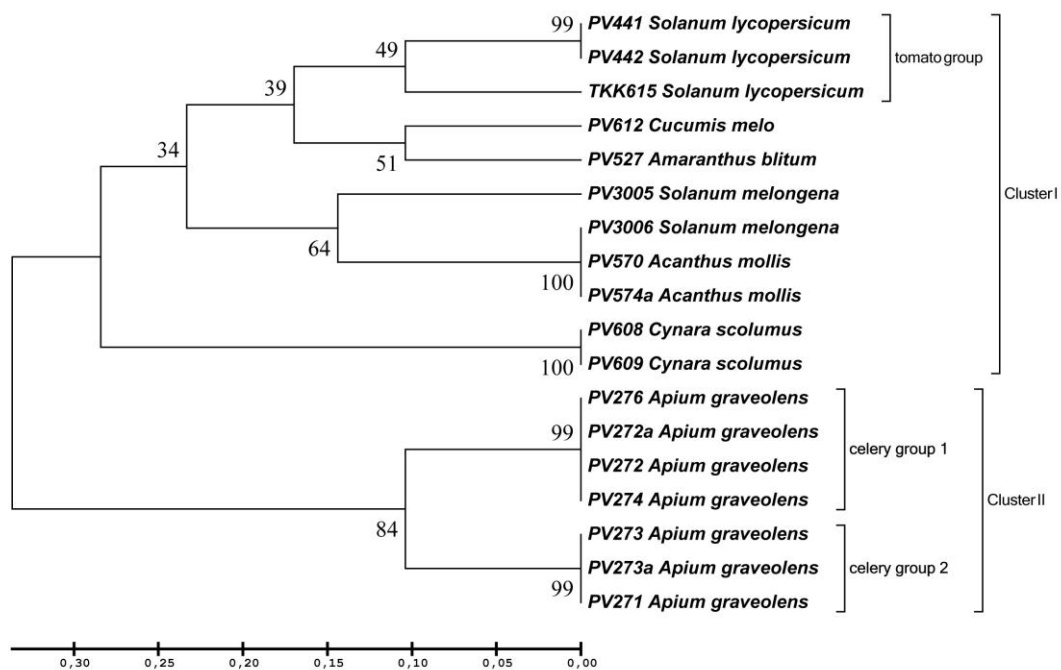
Εικόνα 4. Πήκτωμα αγαρόζης ανάλυσης DNA με μοριακό δείκτη τον λ /PstI και DNA των βακτηριακών στελεχών: 1) PV271, 2) PV272, 3) PV272a, 4) PV273, 5) PV273α, 6) PV274, 7) PV276, 8) PV612

3.3.2 Υπολογισμός συγκεντρώσεων απομονωμένων DNA

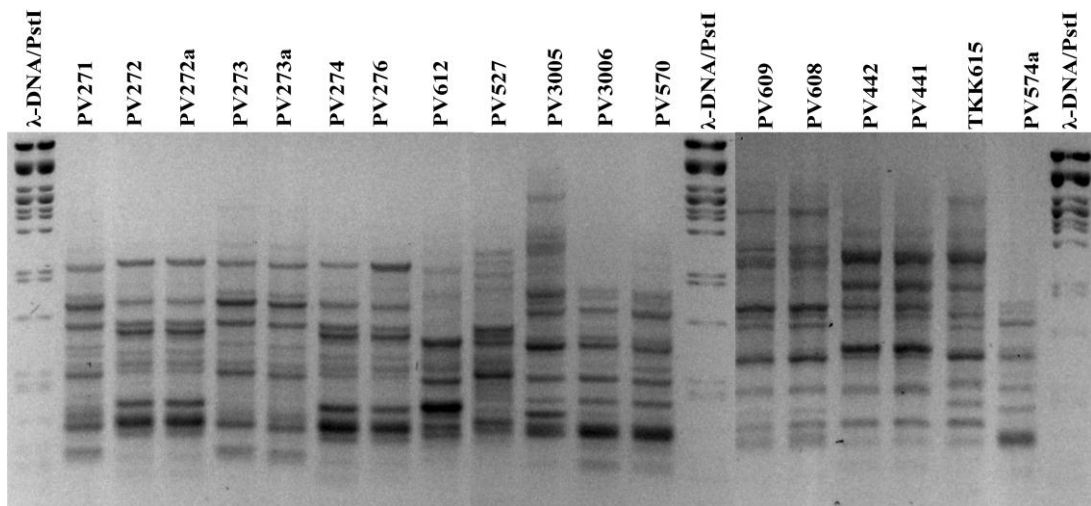
Μετά την αξιολόγηση της ποιότητας κάθε μιας απομόνωσης, έγινε φωτομέτρηση των δειγμάτων προκειμένου να καθοριστεί η συγκέντρωση των απομονωμένων DNA από τα βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν για την ταυτοποίηση. Με βάση τις αρχικές συγκεντρώσεις των απομονωθέντων DNA τα δείγματα αραιώθηκαν μέχρι τα 50 ng/μl.

3.3.3 Αποτελέσματα της *rep*-PCR

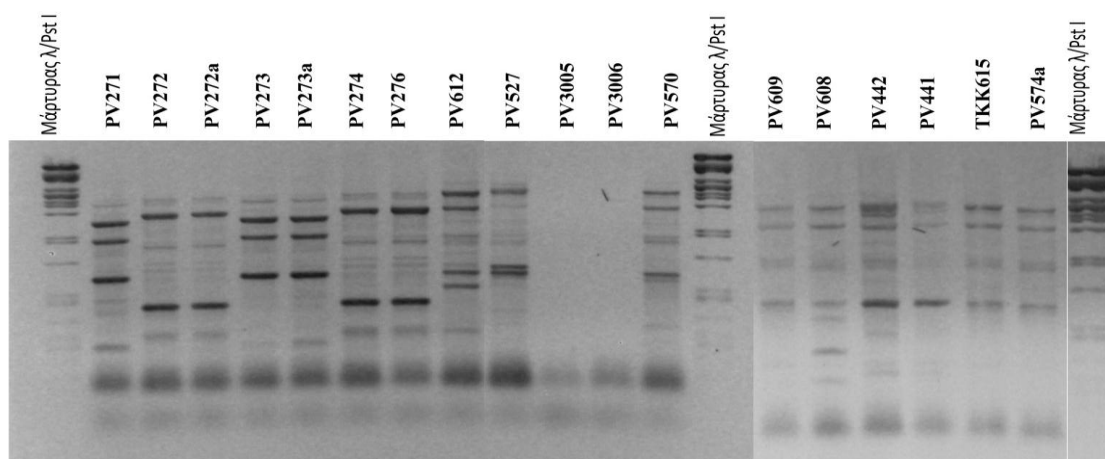
Τα αποτελέσματα που πάρθηκαν κατά την εφαρμογή των μοριακών δεικτών BOX και ERIC-PCR, έδειξαν μεγάλες διαφορές μεταξύ των αποτυπωμάτων των μοριακών δεικτών, γεγονός που δεν μας επέτρεψε να προχωρήσουμε στην ταυτοποίηση των βακτηριακών στελεχών. Φάνηκε πως υπάρχει σημαντική γενετική παραλλακτικότητα μεταξύ των στελεχών του *Pseudomonas viridiflava*, τόσο ανάμεσα σε διαφορετικούς ξενιστές, όσο και μεταξύ των στελεχών του ίδιου ξενιστή. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται αναλυτικά στο δενδρόγραμμα της Εικ. 5 ενώ στις Εικόνες 6 και 7 παρουσιάζονται τα πρότυπα ζωνών που έδωσαν οι BOX και ERIC-PCRs, αντίστοιχα. Κατ' τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για να υπολογιστεί το δενδρόγραμμα της Εικ. 5.



Εικόνα 5. Δενδρόγραμμα με βάση τα αποτελέσματα των BOX και ERIC-PCR



Εικόνα 6. Αποτύπωμα μοριακών δεικτών της BOX-PCR



Εικόνα 7. Αποτύπωμα μοριακών δεικτών της ERIC-PCR

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

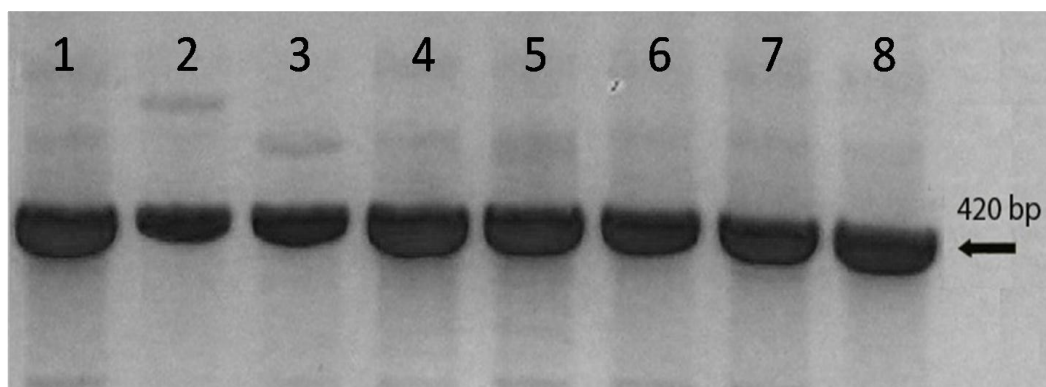
Τα προϊόντα από τις *gyrB*-, *rpoD*- και *rpoB*-PCRs παρουσιάζονται σε πηκτώματα αγαρόζης συγκέντρωσης 1.3% w/v στις Εικόνες 8, 9 και 10 αντίστοιχα. Παρατηρούμε ότι στο κάθε πηκτώμα εμφανίζεται μια ζώνη για όλα τα στελέχη στα 420 bp για την *gyrB*-PCR, στα 535 bp για την *rpoD*-PCR και στα 1247 bp για την *rpoB*-PCR. Οι ζώνες, απομονώθηκαν από το πηκτώμα αγαρόζης και στη συνέχεια αλληλουχίστηκαν.

3.3.5 Αποτελέσματα αλληλούχισης των γονιδίων *gyrB*, *rpoD*, *rpoB*

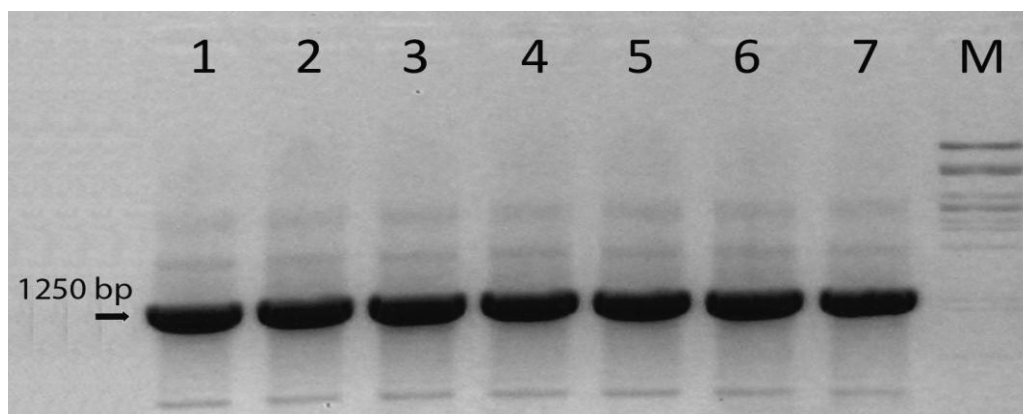
Τα αποτελέσματα των αλληλουχιών κατατέθηκαν στη βάση δεδομένων GeneBank του National Center for Biotechnology Information (NCBI). Η σύγκριση των αλληλουχιών των γονιδίων *gyrB*, *rpoD* και *rpoB* αυτών με άλλες κατατεθειμένες στην GeneBank έδειξε πως και τα 18 στελέχη ανήκουν στην είδος του *Pseudomonas viridiflava*. Όσον αφορά την αλληλούχιση του γονιδίου *gyrB*, τα στελέχη έχουν ομολογία 97-100% με τα στελέχη αναφοράς που είναι κατατεθειμένα στη βάση δεδομένων. Ενδεικτικά, το βακτηριακό στέλεχος PV274 απομονωμένο από σέλινο έχει 97% ομολογία με το στέλεχος αναφοράς SP3.1a, απομονωμένο από *Arabidopsis thaliana*, και το στέλεχος PV527 απομονωμένο από βλήτο έχει 100% ομολογία με το στέλεχος αναφοράς SL250.1b, απομονωμένο και αυτό από *Arabidopsis thaliana* (Goss *et al.*, 2005). Στην περίπτωση του γονιδίου *rpoD*, η αλληλούχιση παρουσίασε ομολογία 96-99% των στελεχών *Pseudomonas viridiflava* σε σχέση με τα ήδη κατατεθειμένα στη

βάση δεδομένων στελέχη αναφοράς. Ενδεικτικά, το βακτηριακό στέλεχος PV274 απομονωμένο από σέλινο έχει 96% ομολογία με το στέλεχος αναφοράς BC2497, απομονωμένο από γογγύλι, και το στέλεχος PV612 απομονωμένο από πεπόνι έχει 99% ομολογία με το στέλεχος αναφοράς CFBP2107, απομονωμένο και αυτό από γογγύλι (Myung *et al.*, 2010). Τέλος, η αλληλούχιση του γονιδίου *rpoB*, ύστερα από σύγκριση των 18 στελεχών με τα στελέχη της βάσης δεδομένων έδωσε ομολογία 98-99%.

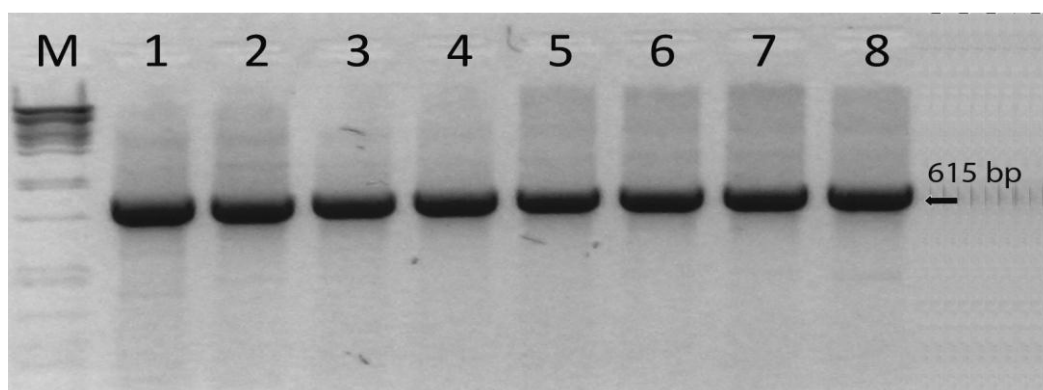
Τα αποτελέσματα της αλληλούχισης και των τριών γονιδίων για τα στελέχη του *Pseudomonas viridiflava* υπάρχουν καταχωρημένα στη βάση δεδομένων του National Center for Biotechnology Information (NCBI) και οι κωδικοί για κάθε ένα στέλεχος παρουσιάζονται αναλυτικά στον Πίνακα 11. Στις Εικόνες 11, 12 και 13 παρουσιάζονται τα δένδρογράμματα που κατασκευάστηκαν σύμφωνα με τις ακολουθίες των γονιδίων *gyrB*, *rpoD* και *rpoB*.



Εικόνα 8. Πήκτωμα αγαρόζης με τα προϊόντα *gyrB*-PCR μοριακό δείκτη τον λ /PstI και DNA των βακτηριακών στελεχών: 1) PV271, 2) PV272, 3) PV272α, 4) PV273, 5) PV273α, 6) PV274, 7) PV276, 8) PV612



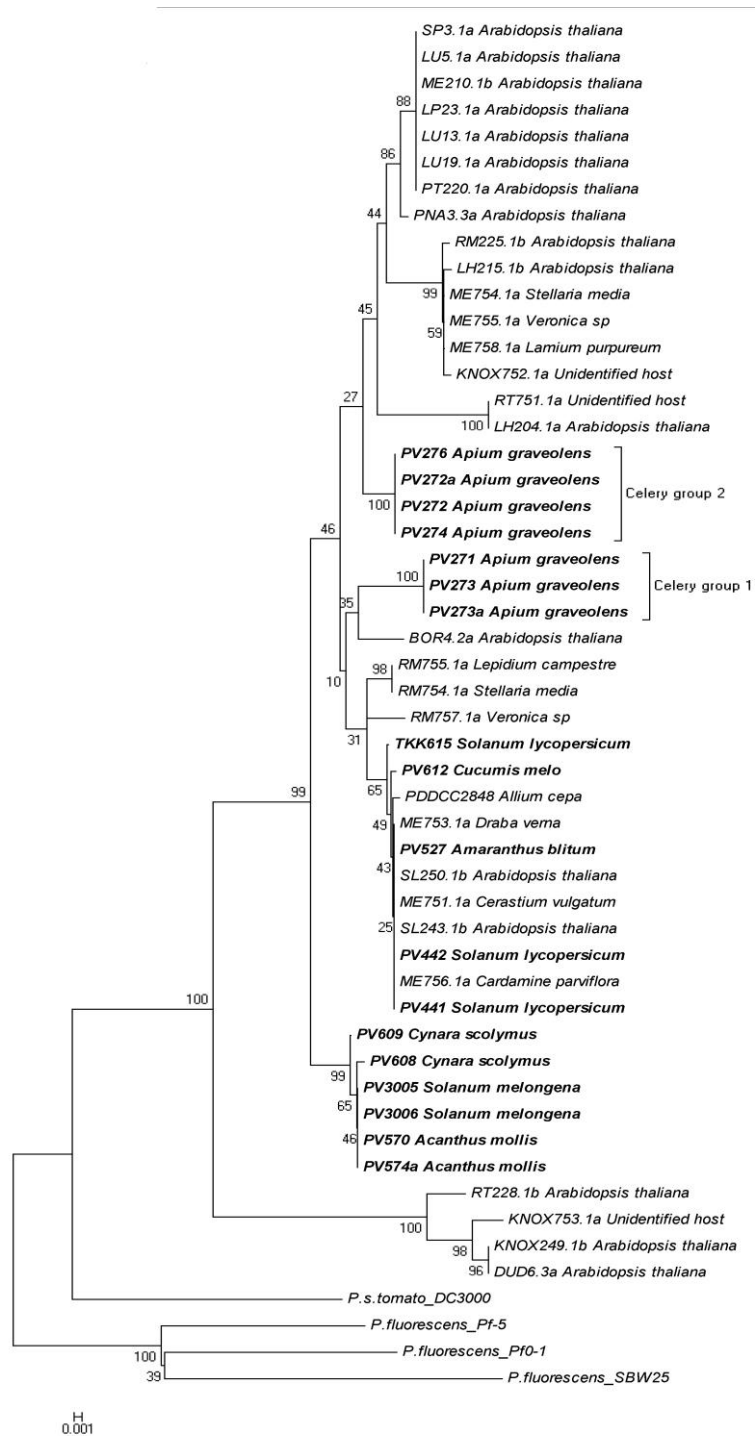
Εικόνα 9. Πήκτωμα αγαρόζης με τα προϊόντα *rpoB*-PCR μοριακό δείκτη τον λ /PstI και DNA των βακτηριακών στελεχών: 1) PV271, 2) PV272, 3) PV272α, 4) PV273, 5) PV273α, 6) PV274, 7) PV276.



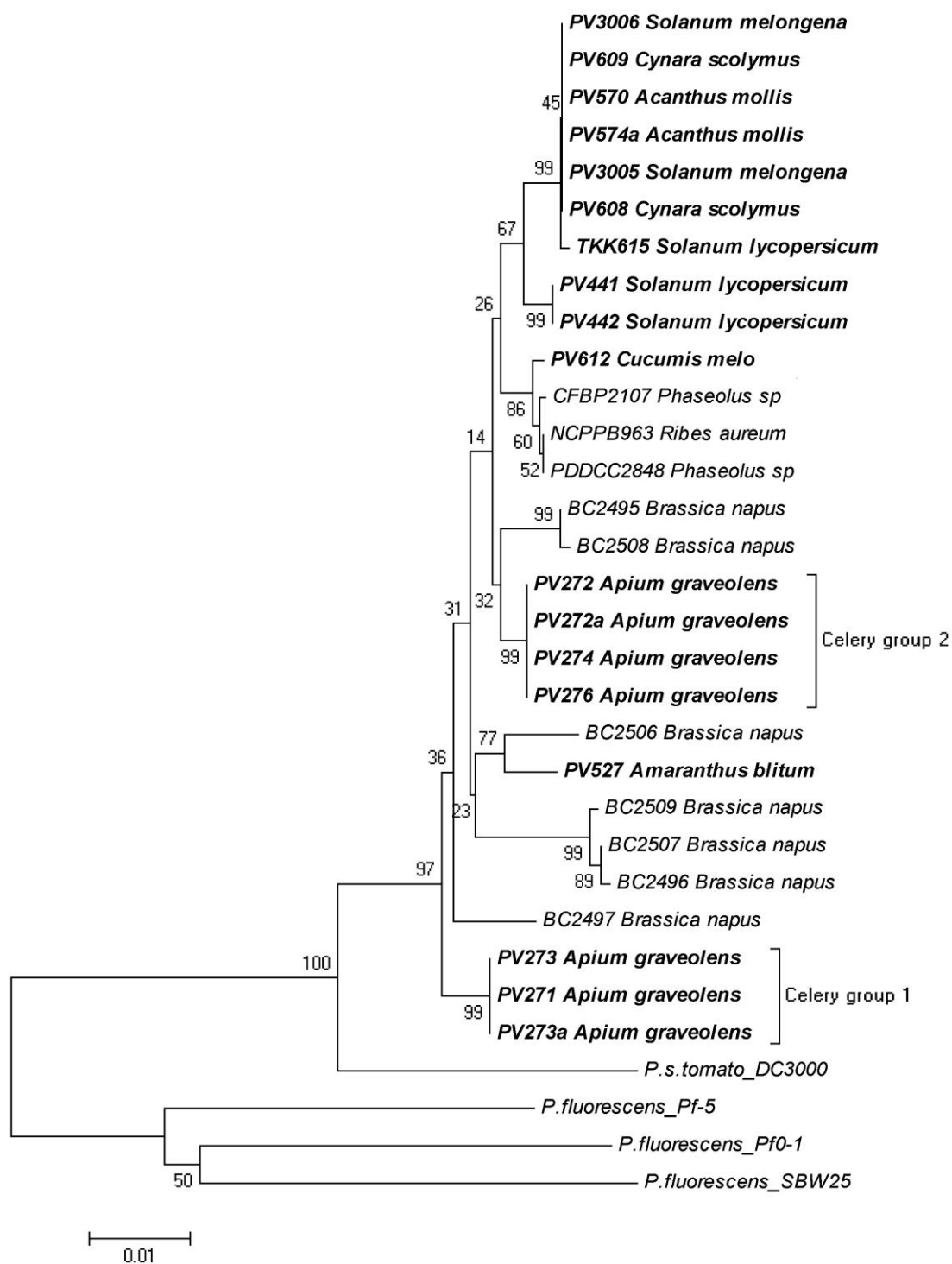
Εικόνα 10. Πήκτωμα αγαρόζης με τα προϊόντα *rpoD*-PCR μοριακό δείκτη τον λ /EcoRI-Hind III και DNA των βακτηριακών στελεχών: 1) PV271, 2) PV272, 3) PV272α, 4) PV273, 5) PV273α, 6) PV274, 7) PV276, 8) PV612

Πίνακας 11. Κωδικοί καταχώρισης στη βάση δεδομένων NCBI

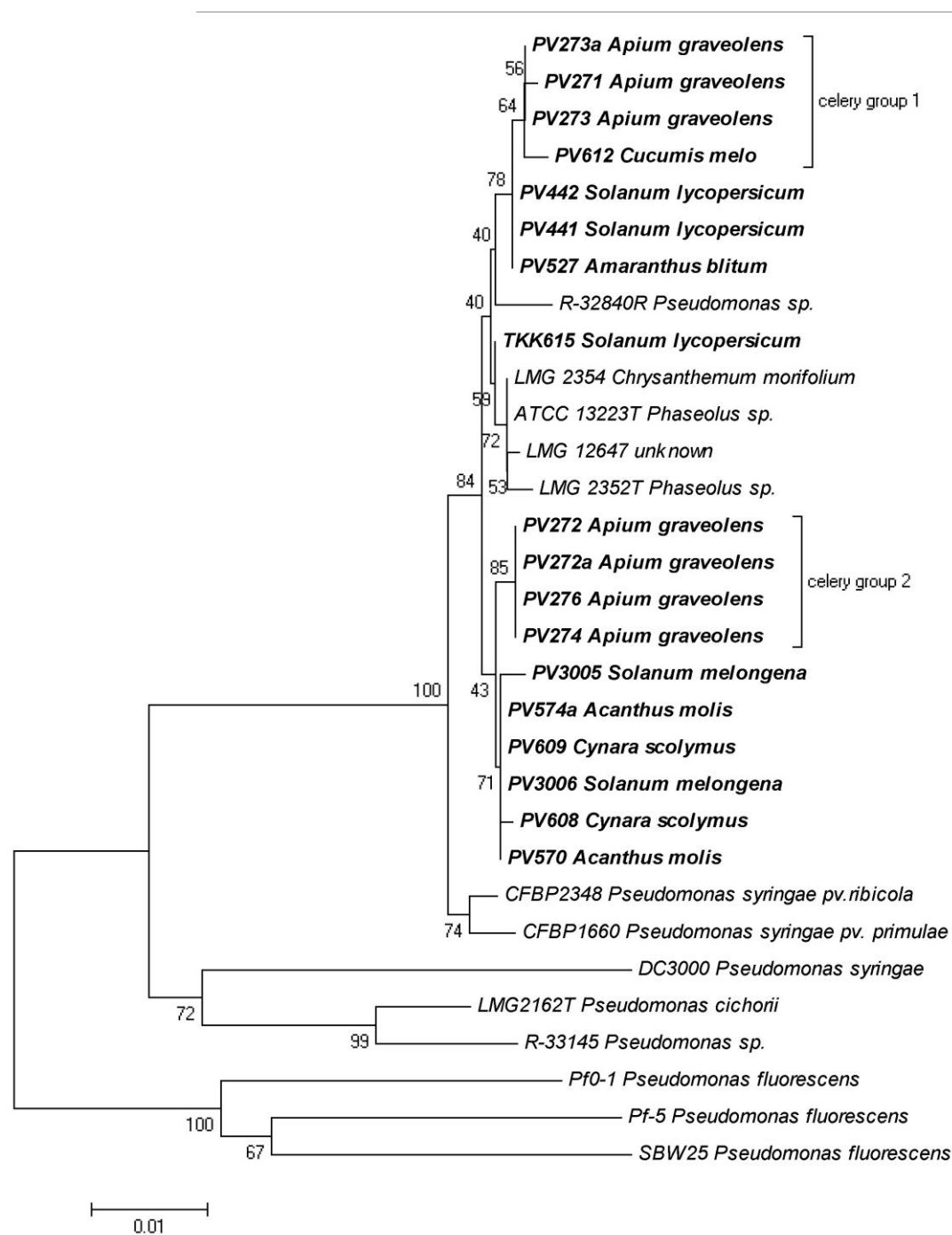
Κωδικός στελέχους	Ξενιστής	Κωδικός στη GeneBank για το γονίδιο <i>gyrB</i>	Κωδικός στη GeneBank για το γονίδιο <i>rpoD</i>	Κωδικός στη GeneBank για το γονίδιο <i>rpoB</i>
PV271	<i>Apium graveolens L.</i>	JN383377	JN383347	JQ267553
PV272	<i>Apium graveolens L.</i>	JN383378	JN383348	JQ267548
PV272a	<i>Apium graveolens L.</i>	JN383379	JN383349	JQ267555
PV273	<i>Apium graveolens L.</i>	JN383380	JN383350	JQ267550
PV273a	<i>Apium graveolens L.</i>	JN383381	JN383351	JQ267552
PV274	<i>Apium graveolens L.</i>	JN383382	JN383352	JQ267557
PV276	<i>Apium graveolens L.</i>	JN383365	JN383353	JQ267556
PV612	<i>Cucumis melo cv. Naudin</i>	JN383366	JN383354	JQ267551
PV527	<i>Amaranthus blitum L.</i>	JN383367	JN383355	JQ267560
PV3005	<i>Solanum melongena L.</i>	JN383368	JN383356	JQ267559
PV3006	<i>Solanum melongena L.</i>	JN383369	JN383357	JQ267561
PV570	<i>Acanthus mollis L.</i>	JN383370	JN383358	JQ267558
PV574a	<i>Acanthus mollis L.</i>	JN383371	JN383359	JQ267554
TKK615	<i>Solanum lycopersicum</i>	JN383372	JN383360	JQ267549
PV441	<i>Solanum lycopersicum</i>	JN383373	JN383361	JQ267544
PV442	<i>Solanum lycopersicum</i>	JN383374	JN383362	JQ267545
PV608	<i>Cynara scolymus L.</i>	JN383375	JN383363	JQ267546
PV609	<i>Cynara scolymus L.</i>	JN383376	JN383364	JQ267547



Εικόνα 11. Δενδρόγραμμα που κατασκευάστηκε χρησιμοποιώντας *gvrB* αλληλουχίες στελεχών αυτού του έργου και άλλων κατατεθειμένων στη βάση δεδομένων GeneBank.



Εικόνα 12. Δενδρόγραμμα που κατασκευάστηκε χρησιμοποιώντας *rpoD* αλληλουχίες στελεχών αυτού του έργου και άλλων κατατεθειμένων στη βάση δεδομένων GeneBank.



Εικόνα 13. Δενδρόγραμμα που κατασκευάστηκε χρησιμοποιώντας *rpoB* αλληλουχίες στελεχών αυτού του έργου και άλλων κατατεθειμένων στη βάση δεδομένων GeneBank.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΕΤΑΡΤΟ

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην εργασία αυτή, αναλύθηκαν εργαστηριακά οι μορφολογικοί, βιοχημικοί και μοριακοί χαρακτήρες δεκαοκτώ (18) βακτηριακών απομονώσεων από διάφορα προσβεβλημένα φυτά από διάφορες καλλιέργειες της Κρήτης. Πρωταρχικός στόχος της μελέτης ήταν η μοριακή ταυτοποίηση των απομονώσεων. Με βάση το μορφολογικό, φυσιολογικό και βιοχημικό φαινοτυπικό προφίλ αλλά και με τις δοκιμές παθογένειας που εμφάνισαν, βεβαιώθηκε ότι όλα τα βακτηριακά στελέχη είναι μέλη της ομάδας II των δοκιμών LOPAT (- - + - +) και ανήκουν στο βακτήριο *Pseudomonas viridiflava* (Goumas *et al*, 1998, 1999). Συμπερασματικά, δεν παρατηρήθηκε διαφοροποίηση σε σχέση με τον ξενιστή τον οποίο προσβάλλουν ή την περιοχή από την οποία απομονώθηκαν. Στο ίδιο συμπέρασμα κατέληξαν και άλλες παρόμοιες μελέτες όταν ορισμένα από τα παραπάνω στελέχη μαζί με άλλα εξετάστηκαν με πολύ μεγαλύτερο αριθμό βιοχημικών δοκιμών (Γκούμας, προσωπική επικοινωνία).

Για επιβεβαίωση της ταυτοποίησης με τα μορφολογικά χαρακτηριστικά και τις βιοχημικές δοκιμές, αλλά την εκτίμηση των γενετικών σχέσεων μεταξύ των απομονώσεων, απομονώθηκε DNA και εφαρμόστηκαν μοριακοί δείκτες rep-PCR αλλά και MLST ανάλυση. Τα αποτελέσματα από τις BOX και ERIC-PCR, έδειξαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των αποτυπωμάτων. Φάνηκε δηλαδή, πως υπάρχει σημαντική γενετική παραλλακτικότητα μεταξύ των στελεχών του *Pseudomonas viridiflava*, τόσο ανάμεσα σε στελέχη από διαφορετικούς ξενιστές, όσο και μεταξύ στελεχών από τον ίδιο ξενιστή. Το γεγονός αυτό, καταδεικνύει ότι οι BOX και ERIC-PCR μοριακοί δείκτες, δεν είναι σε θέση να ταυτοποιήσουν τα βακτηριακά στελέχη της εργασίας μας, σε επίπεδο είδους.

Από την άλλη μεριά, είναι γνωστό ότι η ανάλυση χρησιμοποιώντας την αλληλουχία του 16S rRNA των βακτηριακών στελεχών δεν είναι αρκετός 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*, *rpoD* και *rpoB*. Αρχικά, από την σύγκριση των αλληλουχιών αυτών των γονιδίων από όλα τα στελέχη με στελέχη που είναι καταχωρημένα στη βάση δεδομένων GeneBank, επιβεβαιώθηκε το αποτέλεσμα των βιοχημικών δοκιμών, δηλαδή ότι όλα τα εξετασμένα στελέχη ανήκουν στο είδος *Pseudomonas. viridiflava*. Οι αλληλουχίσεις από τα τρία

διαφορετικά γονίδια έδειξαν πολύ υψηλή ομολογία με τις αντίστοιχες αλληλουχίες άλλων στελεχών του *P. viridiflava* που είναι καταχωρημένες στη βάση δεδομένων GeneBank. Η ανάλυση για το γονίδιο *gyrB* έδειξε ότι τα στελέχη έχουν ομολογία 97-100%, για το γονίδιο *proD* η ομολογία κυμάνθηκε 96-99% ενώ για το γονίδιο *proB* η ομολογία ήταν 98-99%. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της σύγκρισης δημιουργήθηκαν τα δένδρογράμματα των Εικόνων 11, 12 και 13.

Στο δένδρογράμμα για το γονίδιο *gyrB* (Εικ. 11), τα δεκαοκτώ στελέχη διαχωρίζονται σε τρεις ομάδες. Στην πρώτη και δεύτερη ομάδα κατατάσσονται τα στελέχη που έχουν απομονωθεί από σέλινο (PV271, PV272, PV272a, PV273, PV273a, PV274, PV276) τα οποία διαχωρίζονται σε δύο υποομάδες. Στην τρίτη ομάδα συναντάμε τα στελέχη που έχουν απομονωθεί από μελιτζάνα (PV3005, PV3006), από άκανθο (PV570, PV574a) και από αγκινάρα (PV608, PV609). Ωστόσο, τα απομονωμένα στελέχη από τομάτα (TKK615, PV441, PV442), από βλήτο (PV527) και από πεπόνι (PV612), δεν περιλαμβάνονται σε καμία από τις τρεις ομάδες. Αυτά τα στελέχη συνδέονται στενά με στελέχη αναφοράς που απομονώθηκαν από φασολιά (PDDCC2848 και CFBP2107), από *Arabidopsis thaliana* (SL243.1b, SL2501b), από *Cerastium vulgatum* (ME751.1a), από *Draba verna* (ME753.1a) και από *Cardamine parviflora* (ME756.1a).

Ομοίως, ένα άλλο δένδρογράμμα δημιουργήθηκε χρησιμοποιώντας της γονιδιακές ακολουθίες του γονιδίου *proD* (Εικ. 12) και οι οποίες είναι κατατεθειμένες στη βάση δεδομένων NCBI. Οι ακολουθίες *proD* που ήταν κατατεθειμένες στη βάση δεδομένων ήταν λιγότερες από αυτές που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή του δένδρογράμματος του γονιδίου *gyrB*. Στο δένδρογράμμα του *proD* σχηματίζονται τρεις ομάδες. Η πρώτη ομάδα περιλαμβάνει όλα τα βακτηριακά στελέχη που έχουν απομονωθεί από τομάτα (TKK615, PV441, PV442), μελιτζάνα (PV3005, PV3006), αγκινάρα (PV608, PV609) και άκανθο (PV570, PV574a). Οι δύο άλλες ομάδες αποτελούνται από τις απομονώσεις του σέλινου (PV271, PV272, PV272a, PV273, PV273a, PV274, PV276), οι οποίες χωρίζονται σε δύο υποομάδες, όπως και στην περίπτωση του δένδρογράμματος για το γονίδιο *gyrB*. Ωστόσο, τα βακτηριακά στελέχη από το βλήτο και από την πεπονιά ομαδοποιούνται ξεχωριστά από τα άλλα στελέχη. Το στέλεχος από το βλήτο (PV527) ομαδοποιείται με το στέλεχος BC2506 απομονωμένο

από *Brassica napus*, ενώ το στέλεχος από την πεπονιά (PV612) ομαδοποιείται με το στέλεχος PDDCC2848 απομονωμένο από φασόλι και με το στέλεχος NCPPB 963 απομονωμένο από το φυτό *Ribes aureum*.

Το δενδρόγραμμα που δημιουργήθηκε για το γονίδιο *rpoB* (Εικ. 13), μας αποκάλυψε λιγότερες πληροφορίες, λόγω της έλλειψης κατατεθειμένων αλληλουχιών του γονιδίου στη βάση δεδομένων NCBI. Παρόλα αυτά, η ανάλυση του δενδρογράμματος είναι παρόμοια με εκείνη που προκύπτει από την ανάλυση των *gyrB* και *rpoD*. Δεν παρατηρούμε συγκεκριμένο πρότυπο ομαδοποίησης ανά ξενιστή, ακόμα και στην περίπτωση του σέλινου. Εντούτοις, η έλλειψη κατατεθειμένων αλληλουχιών του γονιδίου καθιστά αναξιόπιστη την περαιτέρω ανάλυση.

Επιπρόσθετα, από τη μελέτη διαπιστώθηκε ότι από τα δενδρογράμματα, που δημιουργήθηκαν για κάθε γονίδιο ξεχωριστά και παρουσιάζονται στο παράρτημα της εργασίας, εκείνο που κατασκευάστηκε για το γονίδιο *gyrB*, σε σχέση με τα άλλα δύο (*rpoD* και *rpoB*), έχει τις περισσότερες ομοιότητες με το δενδρόγραμμα που κατασκευάστηκε για τους μοριακούς δείκτες BOX και ERIC. Το γεγονός αυτό, μας οδηγεί στο συμπέρασμα - πρόταση πως η χρήση της αλληλούχισης του γονιδίου *gyrB*, με σκοπό την ταυτοποίηση, αλλά και ολόκληρη τη φυλογενετική ανάλυση του βακτηρίου *Pseudomonas viridiflava*, είναι η πλέον αποτελεσματική και ενδεδειγμένη. Σε παρόμοιο σκεπτικό καταλήγει η εργασία του Yamamoto (2000) που αναφέρεται στην φυλογενετική ανάλυση του γένους *Pseudomonas*.

Από τη μελέτη αυτή προέκυψε πρώτον η επιβεβαίωση της ταυτοποίηση των δεκαοκτώ στελεχών ως *Pseudomonas viridiflava* με βάση τη μοριακή τους ανάλυση και δεύτερον η δυνατότητα χρήσης της αλληλούχισης του γονιδίου *gyrB* ως εργαλείο ταυτοποίησης, αλλά και ως μέσο της φυλογενετικής τους μελέτης.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Γκούμας, Δ.Ε., Γκατζιλιάκης, Χ.Ξ., Ναβρούζογλου, Κ.Η., 2006. Άκανθος (*Acanthus mollis*): Ένας νέος ξενιστής του *Pseudomonas viridiflava*. 13^ο Πανελλήνιο Φυτοπαθολογικό Συνέδριο, Αθήνα 17/10/06. Περιλήψεις Ανακοινώσεων, σελ 112.
- Γκούμας, Δ.Ε. 2006. Επιλεγμένα Θέματα Ειδικής Φυτοβακτηριολογίας. Έκδοση: ΤΕΙ Κρήτης, Ηράκλειο 2006. Σελ. 9, 13, 15, 36.
- Λαλλά Π. 2003. Μελέτη μιας νέας ασθένειας του σέλινου. Πτυχιακή Μελέτη, ΤΕΙ Κρήτης, Ηράκλειο 2003. Σελ.12.
- Λουλακάκης, Κ. Α., 2006. Βιοτεχνολογία Φυτών, Σημειώσεις. ΤΕΙ Κρήτης., Ηράκλειο 2006. Σελ. 150.
- Παγουλάτου, Μ., 2011, Μοριακή ταυτοποίηση απομονώσεων του βακτηρίου *Dickeya spp* από πατάτα. Πτυχιακή εργασία. ΤΕΙ Κρήτης, Ηράκλειο 2011, Σελ. 15, 17.
- Ταμπακάκη Α., Βερβερίδης Φ., 2003. Εργαστηριακές Ασκήσεις Βιοτεχνολογίας Φυτών. ΤΕΙ Κρήτης., Ηράκλειο 2003. Σελ. 109.
- Χαλακατεβάκη, Α., 2008, Συγκόνιο (*Syngonium podophyllum*): Ένας νέος ξενιστής του *Pseudomonas viridiflava* στην Ελλάδα. Πτυχιακή εργασία. ΤΕΙ Κρήτης, Ηράκλειο 2008, Σελ. 8.

ΞΕΝΟΓΛΩΣΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- 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
- Alivizatos AS., 1986. Tomato pith necrosis caused by *Pseudomonas viridiflava*. *Ann Inst Phytopathol Benaki (N.S.)* 15: 41-47
- Billing E., 1970, *Pseudomonas viridiflava* (Burkholder, 1930; Clara, 1934). *J Appl Bacteriol* 33: 492-500
- Bradbury JF., 1986. *Guide to Plant Pathogenic Bacteria*. CAB International, Farnham Royal p.240
- Burkholder WH., 1930. The bacterial disease of the bean. A comparative study. *Cornell University Agric Exp Stat Mem* 127: 1-88
- Conzalez, A.J., Rodicio, M.R., Mendoza, M.C., 2003. Identification of an Emergent and Atypical *Pseudomonas viridiflava* Lineage Causing Bacteriosis in Plants of Agronomic Importance in a Spanish Region. *Applied and Environmental Microbiology*, 2936-2941
- George, M. L. C., Nelson, R. J., Zeigler, R. S., Leung, H., 1998. Rapid Population Analysis of *Magnaporthe grisea* by Using rep-PCR and Endogenous Repetitive DNA Sequences. *Phytopathology*, 88(3), 223-229.
- Goss EM, Kreitman M, Bergelson J., 2005. Genetic diversity, recombination and cryptic clades in *Pseudomonas viridiflava* infecting natural populations of *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* 169: 21-35.
- Goumas D.E., Gatzilakis C.X. and S.E. Gouma S.E., 2008. *Pseudomonas viridiflava* is the causal agent of a new bacterial disease of artichoke. *Phytopathologia Mediterranea*, 47 (2), 146.
- Goumas. D.E., C.X. Gatzilakis and K.H. Navrouzoglou, 2008. *Acanthus mollis*: a new host of *Pseudomonas viridiflava*. *Phytopathologia Mediteranea*, 47 (2), 146-147.
- Goumas DE, Chatzaki AK., 1998. Characterization and host range evaluation of *Pseudomonas viridiflava* from melon, blite, tomato, chrysanthemum and eggplant. *Eur J Plant Pathol* 104: 181-188.

- Goumas D.E., A.-M. Kaselaki, C.X. Gatzilakis and A. Chalakatevaki, 2009. *Pseudomonas viridiflava*: causal agent of a bacterial disease of *Syngonium podophyllum*. *Phytopathologia Mediterranea*, 48 (2), 317
- Goumas D.E., LALLA P., 2006. *Pseudomonas syringae* pv. *apii*: causal agent of bacterial leaf spot of celery in Greece. *Phytopathologia Mediterannea*, 45 (2),170
- Goumas DE and Malathrakis NE., 1985. Bacterial rot of eggplant in plastic greenhouses in Crete. 3rd National Phytopathological Conference, 1985. Summaries of invited and research paper, Greece, Volos, p 23 (abstract)
- Goumas DE and Malathrakis NE., 1987. A new bacterial disease of cucumber grown in greenhouses in Greece. 4th National Phytopathological Conference, 1987. Summaries of invited and research paper, Greece, Athens, p 57 (abstract)
- Lelliott RA, Billing E and Hayward AC., 1966. A determinative scheme for fluorescent plant pathogenic pseudomonads. *J Appl Bacteriol* 29: 470–489
- 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.
- 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
- Wilkie JP, Dye DW and Watson DRM., 1973. Further hosts of *Pseudomonas viridiflava*. *N Zealand J Agric Res* 16: 315–322
- 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.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Α.1 Φωτογραφικό υλικό (προσφορά Δρ Δημήτρης Γκούμας)



Εικόνα 14, 15. Βακτηριακή κηλίδωση φύλλων πεπονιάς (αριστερά) και αγγουριάς (δεξιά) που οφείλετε σε προσβολή από το βακτήριο *Pseudomonas viridiflava*



Εικόνα 16. Βακτηριακή κηλίδωση. Έντονη προσβολή φύλλων αγγουριάς από το βακτήριο *Pseudomonas viridiflava*



Εικόνα 17. Νέκρωση της εντεριώνης σε στέλεχος φυτού τομάτας, προσβολή από το βακτήριο *Pseudomonas viridiflava*



Εικόνα 18, 19. Βακτηριακή κηλίδωση καρπών τομάτας που οφείλετε σε προσβολή από το βακτήριο *Pseudomonas viridiflava*



Εικόνα 20, 21. Βακτηριακή κηλίδωση φύλλων μελιτζάνας, προσβολή από το βακτήριο *Pseudomonas viridiflava*



Εικόνα 22, 23. Κηλίδωση βρακτίων φύλλων αγκινάρας, προσβολή από το βακτήριο *Pseudomonas viridiflava*



Εικόνα 24, 25. Βακτηριακή κηλίδωση άκανθου, προσβολή από το βακτήριο *Pseudomonas viridiflava*



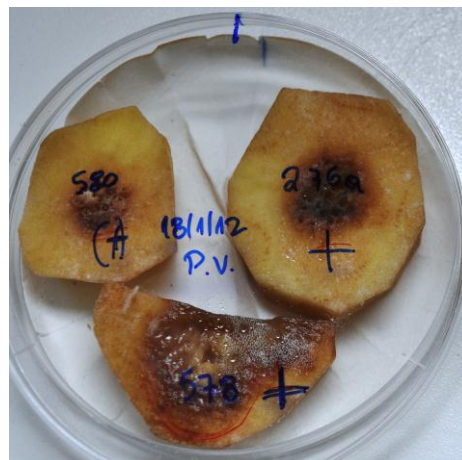
Εικόνα 26, 27. Βακτηριακή κηλίδωση συγκόνιου, προσβολή από το βακτήριο *Pseudomonas viridiflava*



Εικόνα 28, 29. Βακτηριακή κηλίδωση σέλινου, προσβολή από το βακτήριο *Pseudomonas viridiflava*



Εικόνα 30. Τεχνητές μολύνσεις σε φύλλα μαρουλιού (σήψη) με το βακτηριακό στελέχος PV273 του *Pseudomonas viridiflava*



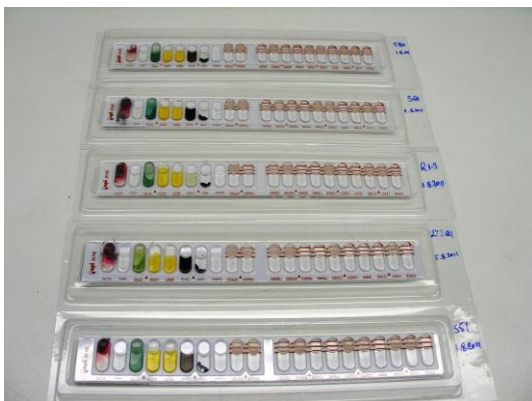
Εικόνα 31. Τεχνητές μολύνσεις σε ροδέλες πατάτας (σήψη) με βακτηριακά στελέχη του *Pseudomonas viridiflava*



Εικόνα 32. Τεχνητές μολύνσεις σε λοβούς φασολιού με βακτηριακά στελέχη του *Pseudomonas viridiflava* (574α), & *Pseudomonas syringae* pv. *apii* (255α)



Εικόνα 33, 34. Τεχνητές μολύνσεις σε φυτά τομάτας με βακτηριακά στελέχη του *Pseudomonas viridiflava*. Σήψη φυτού (αριστερά) & μάρανση (δεξιά).



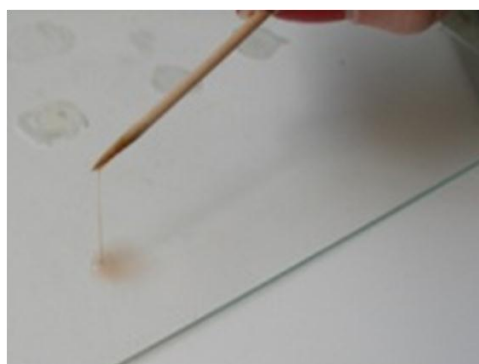
Εικόνα 35. Ταυτοποίηση βακτηριακών στελεχών με τις δοκιμές αρί ZONE



Εικόνα 36. Αποικίες του *Pseudomonas viridiflava* σε θρεπτικό υπόστρωμα NAG

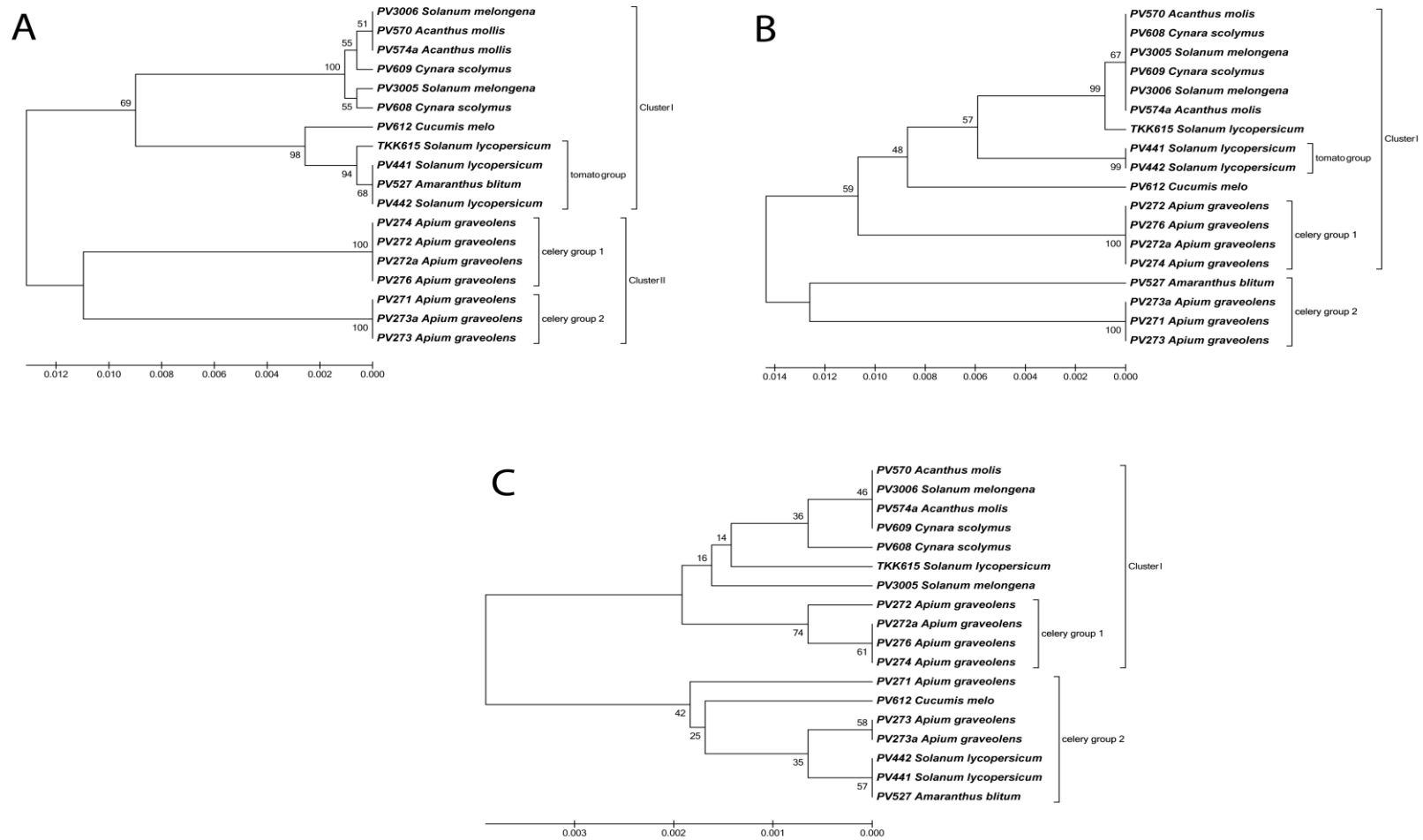


Εικόνα 37. Τυπική αντίδραση υπερευαισθησίας σε φύλλο καπνού με βακτηριακά στελέχη του *Pseudomonas viridiflava*



Εικόνα 38. Δοκιμή σε 3% KOH (Gram αρνητικό, επάνω)

Εικόνα 39. Έλεγχος φθορισμού σε θρεπτικό υπόστρωμα King B.



Εικόνα 40. Δενδρογράμματα βασισμένα στην αλληλούχιση των γονιδίων *gyrB*(A), *rpoD*(B), *rpoB*(C)

A.2 Εργασίας προς δημοσίευση στο περιοδικό PLoS ONE.

Title

Pseudomonas viridiflava, a Multi Host Plant Pathogen with Significant Genetic Variation at the Molecular Level

Authors and Affiliations

Panagiotis F. Sarris^{§*}, Emmanouil A. Trantas[§], Evaggelia Mpalantinaki, Filippos Ververidis, Dimitrios E. Goumas*

Department of Plant Sciences, School of Agricultural Technology, Technological Educational Institute of Crete, P.O. Box 1939, Heraklion, GR 71004, Greece

§ *These authors contributed equally in this article*

* *Corresponding author*

Abstract

The pectinolytic species *Pseudomonas viridiflava* has a wide host range among plants, causing foliar and stem necrotic lesions and basal stem and root rots. However, little is known about the molecular evolution of this species. In this study we investigated the intraspecies genetic variation of *P. viridiflava* amongst local (Cretan), as well as international isolates of the pathogen. The genetic and phenotypic variability were investigated by molecular fingerprinting (rep-PCR) and partial sequencing of three housekeeping genes (*gyrB*, *rpoD* and *rpoB*), and by biochemical and pathogenicity profiling. The biochemical tests and pathogenicity profiling did not reveal any variability among the isolates studied. However, the molecular fingerprinting patterns and housekeeping gene sequences clearly differentiated among them. In a broader phylogenetic comparison of housekeeping gene sequences deposited in the GenBank, significant genetic variability at the molecular level was found between isolates of *P. viridiflava* originated from different host species as well as among isolates from the same host. Our results provide a basis for more comprehensive understanding of the biology, sources and shifts in genetic diversity and evolution of *P. viridiflava* populations and should support the development of molecular identification tools and epidemiological studies in diseases caused by this species.

(Η παραπάνω εργασία έχει γίνει δεκτή από το περιοδικό και επίκειται η δημοσίευση)