

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ
ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ
ΚΡΗΤΗΣ

ΤΜΗΜΑ Τεχνολόγων Γεωπόνων



TECHNOLOGICAL
EDUCATIONAL
INSTITUTE *of* CRETE
DEPARTMENT *of* Agriculture

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

«ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΗΣ
XYLELLA FASTIDIOSA ΣΤΗΝ ΚΡΗΤΗ»



ΝΙΚΟΛΕΤΑ ΣΤΑΦΥΛΑΡΑΚΗ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΓΚΟΥΜΑΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ

ΑΠΡΙΛΙΟΣ, 2018

ΚΑΘΗΓΗΤΕΣ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

ΚΑΘ. ΓΚΟΥΜΑΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ

ΚΑΘ. ΓΚΑΤΖΙΛΑΚΗΣ ΧΡΗΣΤΟΣ

ΚΑΘ. ΓΟΥΤΟΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ

**ΤΟ ΕΡΓΟ ΑΥΤΟ ΥΛΟΠΟΙΗΘΗΚΕ ΣΤΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ-
ΒΑΚΤΗΡΙΟΛΟΓΙΑΣ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΩΝ ΓΕΩΠΟΝΩΝ ΤΗΣ ΣΧΟΛΗΣ
ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΤΟΥ ΤΕΙ ΚΡΗΤΗΣ.**

Αφιερώνεται στην οικογένεια μου, στον καθηγητή μου Δ. Γκούμα και στην ομάδα του εργαστηρίου Μαριάνθη, Βαγγελιώ για την πολύτιμη βοήθεια τους και στον φίλο μου Δημήτρη.

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διατριβή ξεκίνησε και ολοκληρώθηκε στο εργαστήριο Φυτοπαθολογίας-Βακτηριολογίας του τμήματος Τεχνολόγων Γεωπόνων, της Σχολής Γεωπονίας, του ΤΕΙ Κρήτης με την επιστημονική υποστήριξη του εργαστηρίου αυτού. Αυτή τη στιγμή που το έργο έχει ολοκληρωθεί, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή Δημήτριο Γκούμα για την ευκαιρία που μου έδωσε να εργαστώ στο εργαστήριό του και να προσπαθήσω να φέρω σε πέρας ένα, όπως αποδείχθηκε, δύσκολο έργο.

Πίνακας Περιεχομένων

ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....	III
ΛΙΣΤΑ ΣΥΝΤΟΜΕΥΣΕΩΝ.....	0
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	1
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	2
1.1. <i>Εισαγωγικά στοιχεία για το βακτήριο Xylella fastidiosa</i>	2
1.3. <i>ΟΙ ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ ΠΟΥ ΠΡΟΚΑΛΟΥΝΤΑΙ ΑΠΟ ΤΟ ΒΑΚΤΗΡΙΟ XYLELLA FASTIDIOSA</i>	6
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	11
2.1. <i>ΦΥΤΙΚΑ ΕΙΔΗ ΣΤΑ ΟΠΟΙΑ ΔΙΕΡΕΥΝΗΘΗΚΕ Η ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΤΟΥ ΒΑΚΤΗΡΙΟΥ XYLELLA FASTIDIOSA</i>	11
2.2. <i>Καθαρισμός ολικού DNA και απομόνωση νουκλεϊκών οξέων από φυτικούς ιστούς</i>	14
2.3. <i>ΕΙΔΗ ΕΝΤΟΜΩΝ, ΣΤΑ ΟΠΟΙΑ ΔΙΕΡΕΥΝΗΘΗΚΕ Η ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΤΟΥ ΒΑΚΤΗΡΙΟΥ XYLELLA FASTIDIOSA</i>	20
2.4. <i>ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΝΟΥΚΛΕΪΚΩΝ ΟΞΕΩΝ ΑΠΟ ΕΝΤΟΜΑ</i>	22
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ- ΣΥΖΗΤΗΣΗ	24
3.1. <i>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΤΟΥ XYLELLA FASTIDIOSA ΣΕ ΦΥΤΙΚΟΥΣ ΙΣΤΟΥΣ</i>	24
3.2. <i>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΤΟΥ XYLELLA FASTIDIOSA ΣΕ ΕΝΤΟΜΑ</i>	26
4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ - ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ	29
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	32

ΛΙΣΤΑ ΣΥΝΤΟΜΕΥΣΕΩΝ

Πίνακας 1: Οι συντομεύσεις που χρησιμοποιούνται μέσα στο κείμενο και στις Εικόνες / Σχήματα

Σύντμηση	Πλήρες όνομα
ΔΑΟΚΔ	Διεύθυνση Αγροτικής Οικονομίας και Κτηνιατρικής Δράμας
ΕΕ	Ευρωπαϊκή Ένωση
EFSA	European Food Safety Authority
EPPO	European and Mediterranean Plant Protection Organization
ΠΚΜ	Περιφέρεια Κεντρικής Μακεδονίας
ΥΠΑΑΤ	Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων

Περίληψη

Η φυτοπαθολογία αποτελεί ένα πολύ σημαντικό κλάδο της Γεωπονίας, καθώς οι φυτοπαθογόνοι οργανισμοί έχουν πολυάριθμες επιπτώσεις στα φυτά και στην γεωργική οικονομία. Στον τομέα των βακτηρίων που προσβάλλουν τα φυτά, ένα νέο φυτοπαθογόνο για την Ευρώπη η *Xylella fastidiosa*, έχει κάνει την εμφάνιση του τα τελευταία χρόνια με καταστροφικές συνέπειες σε διάφορα είδη φυτών. Η έξαρση της μόλυνσης με το βακτήριο αυτό, όταν παρατηρήθηκε για πρώτη φορά σε ελαιοκαλλιέργειες στην Ιταλία, προκάλεσε - και ακόμα προκαλεί - πολλούς προβληματισμούς, ιδιαίτερα στην Ελλάδα που είναι μια ελαιοκομική χώρα. Η συνεχής παρακολούθηση της *Xylella fastidiosa*, κρίνεται λοιπόν απαραίτητη όπως άλλωστε και οι διαδικασίες ανίχνευσης του, προκειμένου να αποφευχθεί τυχόν προσβολή που μπορεί να καταλήξει σε μορφή επιδημίας.

Έτσι, η πτυχιακή αυτή εργασία πραγματοποιήθηκε προκειμένου να διερευνηθεί η παρουσία του βακτηρίου στην Ελλάδα και ιδιαίτερα στην Κρήτη, που διακρίνεται για το καλής ποιότητας ελαιόλαδο, τις επιτραπέζιες ελιές και τα προϊόντα αμπέλου που παράγει. Ωστόσο, καθώς το βακτήριο αυτό έχει ένα σχετικά μεγάλο εύρος φυτών ξενιστών που προσβάλλει, για τους σκοπούς της εργασίας, πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανίχνευσης του όχι μόνο σε διάφορα φυτά αλλά και σε έντομα που βιβλιογραφικά έχουν αναφερθεί ως φορείς του εν λόγω μικροοργανισμού.

Τα αποτελέσματα της έρευνας αυτής, έδειξαν ότι προς το παρόν τουλάχιστον, η *Xylella fastidiosa* δεν έχει κάνει την εμφάνιση του στην Κρήτη, πιθανότητα λόγω των μέτρων καραντίνας που λαμβάνονται προκειμένου να αποφευχθεί η εξάπλωση του.

1. Εισαγωγή

1.1.Εισαγωγικά στοιχεία για το βακτήριο *Xylella fastidiosa*

Η *Xylella fastidiosa* είναι ένα αερόβιο, αρνητικό κατά Gram φυτοπαθογόνο βακτήριο, το οποίο ανήκει στην οικογένεια *Xanthomonadaceae* (EFSA, 2015). Η ανάπτυξη του, λαμβάνει χώρα στα ξυλώδη αγγεία των φυτών-ξενιστών του. Οι ιδανικές θερμοκρασίες ανάπτυξης του βακτηρίου αυτού, κυμαίνονται μεταξύ 26-28 °C. Η κίνηση του στα ξυλώδη αγγεία των φυτών, μπορεί να είναι είτε ανοδική είτε καθοδική. Αποτέλεσμα της μόλυνσης ενός φυτού με την *Xylella fastidiosa*, είναι ο περιορισμός της μετακίνησης του νερού μέσα στον ξυλώδη ιστό του φυτού. Θεωρείται μάλιστα, ότι η ανάπτυξη των συμπτωμάτων της ασθένειας, σχετίζεται άμεσα με το ποσοστό των φραγμένων αγγείων του φυτού (ΔΑΟΚΔ, 2016).

Ο φυτοπαθογόνος αυτός οργανισμός, χαρακτηρίζεται όχι μόνο από μεγάλη ποικιλομορφία αλλά και από ένα μεγάλο φάσμα ξενιστών, που έχει καταμετρηθεί να είναι 309 είδη φυτών (EFSA, 2015).

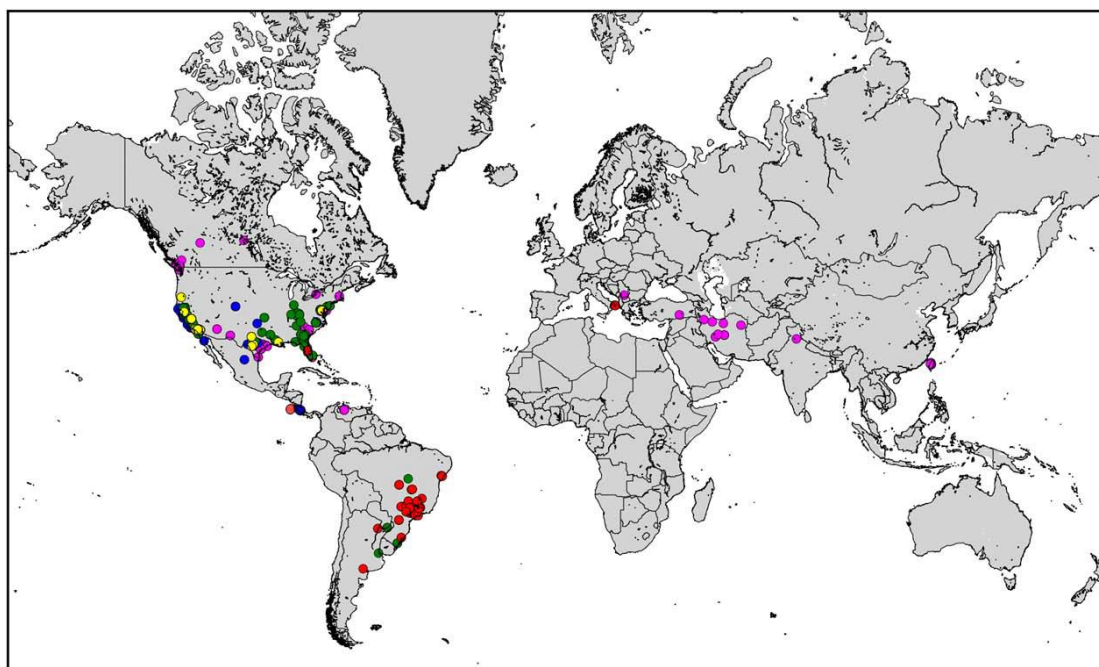
Τα πρώτα κρούσματα προσβολών του βακτηρίου *Xylella fastidiosa* στην επικράτεια της Ευρωπαϊκής Ένωσης, αναφέρθηκαν το 2013 την Επαρχία Lecce που ανήκει στην Περιφέρεια Απουλίας της Ιταλίας. Δυο χρόνια αργότερα (το 2015), το παθογόνο είχε εξαπλωθεί σε όλη την περιφέρεια της Απουλίας, ενώ σε πιο πρόσφατες ενημερώσεις του ΥΠΑΑΤ αναφέρεται η εξάπλωση της ασθένειας και στην επαρχία Μπρίντιζι, δηλαδή εκτός της οριοθετημένης περιοχής. Προοδευτικά μάλιστα, επεκτείνεται προς βορειότερες περιοχές Ιταλίας (στην Περιφέρεια Λιγυρίας και στην Τοσκάνη), ενώ παράλληλα έχει κάνει την εμφάνιση του στη Γαλλία (στην Κορσική και τις μεσογειακές ακτογραμμές της χώρας) αλλά και σε θερμοκήπιο στη Γερμανία όπου καλλιεργούνταν καλλωπιστικά φυτά (ΔΑΟΚΔ, 2016).

Υπάρχουν τέσσερα ταυτοποιημένα υποείδη του *Xylella fastidiosa*, στοιχεία για τα οποία δίνονται στον Πίνακα 2.

Πίνακας 2: Υποείδη του *Xylella fastidiosa* και αριθμός οικογενειών, γενών και ειδών των φυτών που έχει ανιχνευθεί να προσβάλλει (Πηγή: EFSA, 2015)

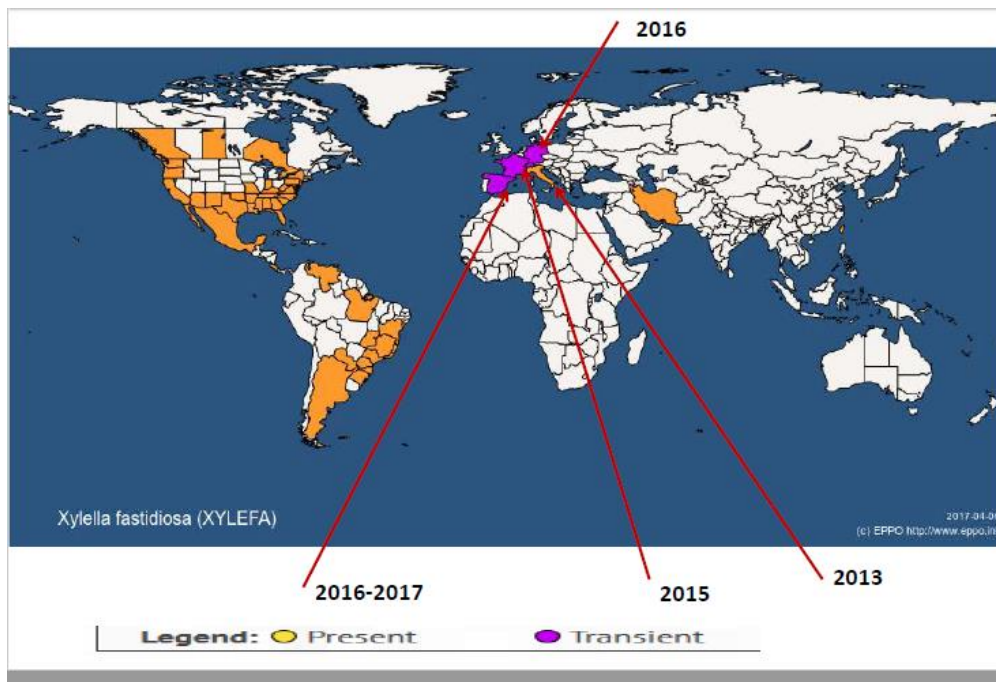
Υποείδη του <i>Xylella fastidiosa</i>	Οικογένειες φυτών	Γένη φυτών	Είδη φυτών
<i>fastidiosa</i>	42	138	164
<i>multiplex</i>	28	69	84
<i>pauca</i>	16	30	36
<i>sandyi</i>	5	6	5
Σύνολο	63	193	309

Η γεωγραφική εξάπλωση των διάφορων υποειδών του *Xylella fastidiosa*, παρουσιάζεται στην Εικόνα 1.



Εικόνα 1: Γεωγραφική κατανομή του *Xylella fastidiosa*. Οι χρωματικοί κωδικοί για την υπόδειξη των υποειδών του βακτηρίου είναι οι εξής: Μπλέ: *X. fastidiosa* subsp. *Fastidiosa*, Πράσινο: *X. fastidiosa* subsp. *Multiplex*, Κόκκινο: *X. fastidiosa* subsp. *pauca*, Κίτρινο: *X. fastidiosa* subsp. *sandyi*, Φούξια: *X. fastidiosa* subsp. μη ταυτοποιημένο (Πηγή: EFSA, 2015).

Ωστόσο, από το 2016 έως σήμερα, η *Xylella fastidiosa* έχει εξαπλωθεί κι άλλο γεωγραφικά, κάτι το οποίο διαφαίνεται μέσω της Εικόνας 2. Σύμφωνα λοιπόν με την Εικόνα αυτή, το παθογόνο έχει κάνει πια την παρουσία του αισθητή και στην Ισπανία – και συγκεκριμένα στις Βαlearίδες νήσους (Μαγιόρκα και Ίμπιζα), όπου είχε διακινηθεί πολλαπλασιαστικό υλικό από την ηπειρωτική Ισπανία (Tarragona) και από την Ολλανδία (Παπαχρήστος, 2017)



Εικόνα 2: Γεωγραφική εξάπλωση της *Xylella fastidiosa* (Πηγή: EPPO, όπως υιοθετήθηκε από Παπαχρήστο, 2017).

1.2. Ξενιστές του βακτηρίου *Xylella fastidiosa* και συμπτωματολογία

Το *Xylella fastidiosa*, προσβάλλει διάφορα φυτά μεγάλης οικονομικής σημασίας όπως είναι η ελιά στην οποία προκαλεί το σύνδρομο της ταχείας παρακμής της ελιάς (EFSA, 2015), η άμπελος (στην οποία προκαλεί την ασθένεια του Pierce) (EPPO, 2016) και διάφορα οπορωφόρα δέντρα. Στην Ιταλία, κάνει την εμφάνιση του πρωτίστως σε ελιές αλλά και σε αμυγδαλιές, πικροδάφνες και βελανιδιές, προκαλώντας ξηράνσεις στα φύλλα αλλά και αποπληξία (σε γρήγορους ρυθμούς), στις περιόδους του έτους που είναι ζεστές. Μεταξύ άλλων, έχει επίσης παρατηρηθεί να προσβάλλει τα εσπεριδοειδή, τη μηδική, τη ροδακινιά, τη βερικοκιά, τις δαμασκηνιές αλλά και διάφορα ζιζάνια, όπως για παράδειγμα το βέλιουρα. Το 2015, ανακοινώθηκε ότι άλλα ευπαθή φυτά είναι η κερασιά, το δενδρολίβανο, η μυρτιά, το σπάρτιο και ο ράμνος ενώ το 2016 στη λίστα αυτή προστέθηκαν και άλλα φυτά, δυο από τα γνωστότερα των οποίων, είναι η τομάτα και η μελιτζάνα (ΔΑΟΚΔ, 2016). Τα συμπτώματα της παρουσίας του βακτηρίου αυτού στην ελιά, φαίνονται στην Εικόνα 3.



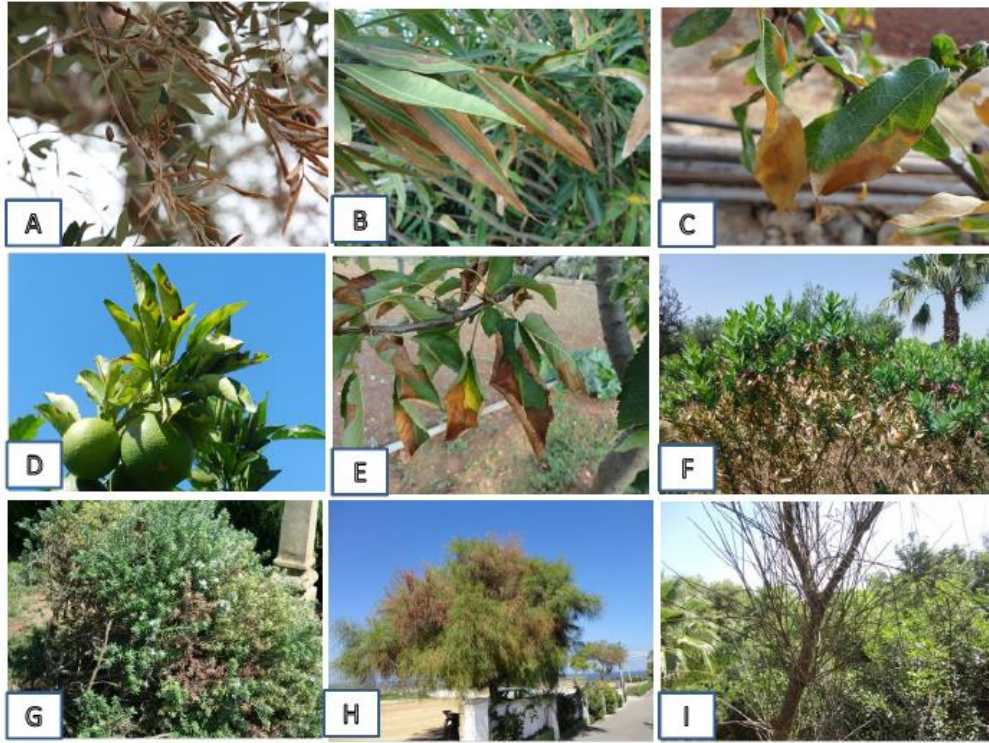
Εικόνα 3: Συμπτώματα προσβολής από το βακτήριο *Xylella fastidiosa* σε ελιά (Πηγή: ΔΑΟΚΔ, 2016).



Εικόνα 4: Συμπτώματα προσβολής από το βακτήριο *Xylella fastidiosa* σε άμπελο (Πηγή: OST, 2005).

Στην άμπελο η μόλυνση με το βακτήριο αυτό προκαλεί ξήρανση που περιβάλλεται από κίτρινη ή κοκκινωπή ζώνη (Εικόνα 4). Αφού το φύλλο πέσει, ο μίσχος παραμένει προσκολλημένος στην κληματίδα. Οι κληματίδες, ωριμάζουν ανομοιόμορφα και επίσης παρατηρείται μικροφυλλία και χλώρωση με συμπτώματα δηλαδή, ανάλογα της τροφοπενίας ψευδαργύρου.

Συμπτώματα και στην ελιά αλλά και σε άλλα είδη φυτών, δίνονται επίσης μέσω της Εικόνας 5.



Εικόνα 5: Συμπτώματα του *Xylella fastidiosa* σε διάφορα είδη φυτών. (Α) Ελαιόδεντρα (Β) Πικροδάφνη (C) Αδροβακτηρίωση των πυρηνοκάρπων (σε αμυγδαλιά) (D) Ποικιλοχρωματική χλώρωση εσπεριδοειδών (E) Κερασιά (F) *Polygala myrtifolia* (G) *Westringia fruticosa* (H) *Acacia saligna* (I) (Πηγή: EFSA, 2015).

1.3. Οι ασθένειες που προκαλούνται από το βακτήριο Xylella fastidiosa

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, το παθογόνο προσβάλλει διάφορους φυτικούς οργανισμούς και η προκαλούμενη ασθένεια ονοματίζεται ανάλογα με το φυτό ξενιστή. Οι δημοφιλέστερες από αυτές είναι οι ακόλουθες:

- Στο αμπέλι: Ασθένεια του Pierce
- Στα εσπεριδοειδή: Ποικιλοχρωματική χλώρωση
- Στη ροδακινιά: Βακτηρίωση της ροδακινιάς
- Στη μηδική: Νανισμός της μηδικής
- Στα πυρηνόκαρπα, τα δασικά, τα καφέα, τα καλλωπιστικά, τη μουριά και το πεκάν: Ασθένειες καυαλίσματος ή εγκαύματος των φύλλων
- Στα ελαιόδεντρα: Σύνδρομο της ταχείας παρακμής της ελιάς (Παπαχρήστος, 2017).

1.4. Έντομα-φορείς της *Xylella fastidiosa*

Περιοδικά, παρατηρούνται επιδημικές εξάρσεις των ασθενειών που προκαλούνται από τη *Xylella fastidiosa*, οι οποίες οφείλονται κυρίως στην αύξηση των πληθυσμών των εντόμων-φορέων του βακτηρίου τα οποία αφού τραφούν από μολυσμένα με το βακτήριο φυτά τρέφονται και από υγιή στα οποία το μεταδίδουν (ΠΚΜ, 2017).

Τα έντομα που είναι φορείς του βακτηρίου *Xylella fastidiosa*, ανήκουν στα Ημίπτερα που είναι μυζητικά και τρέφονται με τον χυμό των ξυλωδών αγγείων των φυτών (Redak et al., 2004) και τα οποία είναι γνωστά και ως τσιτζίκακια. Οι οικογένειες στις οποίες ανήκουν τα κυριότερα έντομα φορείς του βακτηρίου είναι η Cicadellidae, η Aphrophoridae, και η Cercopidae. Τα έντομα αυτά, έχουν την ικανότητα να μεταδίδουν το βακτήριο σε υγιή φυτά πάρα πολύ γρήγορα, αρκεί αυτά να έχουν τραφεί από μολυσμένο με το παθογόνο φυτό, για δυο τουλάχιστον ώρες (ΔΑΟΚΔ, 2016).

Η μετάδοση του βακτηρίου μέσω εντόμου-φορέα πραγματοποιείται με παραλαβή της *Xylella fastidiosa* από μολυσμένα με αυτό αγγεία του ξενιστή από το έντομο. Αφού το βακτήριο εγκατασταθεί στον τροφικό σωλήνα του εντόμου, αρχίζει να πολλαπλασιάζεται έως το στάδιο έκδυσης του εντόμου. Το έντομο μετέπειτα καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής του ως ακμαίο μπορεί να μεταδίδει το βακτήριο σε υγιή φυτά. Η αποτελεσματικότητα της μετάδοσης του παθογόνου εξαρτάται κυρίως από είδος του εντόμου, το φυτό-ξενιστή και το γονότυπο του βακτηρίου (Γκούμας, 2014).

Θεωρείται μάλιστα ότι δεν μεσολαβεί περίοδος επώασης στο έντομο-φορέα και ότι το έντομο μπορεί να παραμείνει μολυσματικό καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής του, χωρίς όμως να μπορεί να το μεταδώσει στους απογόνους του. Ο λόγος που το έντομο μπορεί να παραμείνει μολυσματικό για όλη τη διάρκεια της ζωής του, είναι επειδή το βακτήριο μπορεί να πολλαπλασιαστεί στο έντερο του ενήλικου εντόμου. Τέλος, θεωρείται ότι όλα τα μυζητικά έντομα που τρέφονται με τον χυμό των ξυλωδών αγγείων των φυτών μπορούν δυνητικά να γίνουν φορείς της *Xylella fastidiosa*, αλλά η θεωρία αυτή δεν έχει αποδειχθεί ως σήμερα (Almeida et al., 2005).

Αξίζει μάλιστα να αναφερθεί, ότι επειδή το *Xylella fastidiosa*, έχει την ικανότητα να μολύνει ένα μεγάλο εύρος φυτικών ειδών, που όμως, κάποια από τα οποία μπορεί να μην είναι συμπτωματικά, πιθανότατα τα φυτά αυτά να αποτελούν πηγές μολυσμάτων για τα έντομα-φορείς του παθογόνου (ΔΑΟΚΔ, 2016).

Αντιστοίχως, σε περίπτωση που ένα φυτό είναι μολυσμένο με μικρό αριθμό βακτηρίων *Xylella fastidiosa*, είναι πιθανόν να μην μπορεί να αποτελέσει επαρκή «αποθηκευτικό χώρο» μολύσματος, ικανό για να μπορεί ένα έντομο να το μεταδώσει μετά (Almeida et al., 2005).

Όσον αφορά την ελιά, στην Ιταλία θεωρείται ότι ένα από κυριότερα έντομα - φορείς του *Xylella fastidiosa* είναι τα *Philaenus spumarius* (Ημίπτερα). Συγκεκριμένα στην Απουλία της Ιταλίας, από όπου και ξεκίνησε το πρόβλημα που δημιούργησε η εμφάνιση του βακτηρίου τον Οκτώβριο του 2013, έρευνα έδειξε ότι το 67% του συνολικού αριθμού των ατόμων που ανήκαν στο είδος *Philaenus spumarius* ήταν φορείς του παθογόνου (Saronari et al., 2014).

Στην Αμερική, υπάρχουν διάφορα είδη εντόμων που θεωρούνται φορείς του βακτηρίου και αυτά ανήκουν στις οικογένειες Cicadellidae και Cercopidae (Ημίπτερα). Ειδικά στους αμπελώνες της Καλιφόρνιας, οι σημαντικότεροι φορείς του *Xylella fastidiosa* θεωρείται ότι είναι τα έντομα των ειδών *Homalodisca vitripennis* (συνώνυμο: *Homalodisca coagulata*), *Carneocephala fulgida*, *Draeculacephala minerva*, και *Graphocephala atropunctata*. Στα εσπεριδοειδή, τα έντομα που θεωρείται ότι λειτουργούν ως φορείς του *Xylella fastidiosa* – στη Βραζιλία τουλάχιστον- είναι εκείνα που ανήκουν στα είδη *Acrogonia terminalis*, *Dilobopterus costalimai* και *Oncometopia fascialis* (EPPO, 2017).

Τα ήδη γνωστά έντομα φορείς του βακτηρίου αλλά και εκείνα που πιθανόν να είναι φορείς του στην Ευρώπη, δίνονται στον Πίνακα 3.

Πίνακας 3: Ταυτοποιημένα έντομα-φορείς της *Xylella fastidiosa* και πιθανοί φορείς του.

Ομάδες εντόμων	Επικρατέστερα είδη	Γεωγραφική κατανομή	Πιθανότητα ρόλου ως φορέα	Πιθανόν ρόλος ως φορέας: κριτήρια
<i>Cicadellidae, Cicadellinae:</i> 7 είδη	<i>Cicadella viridis</i>	Σε όλη την Ευρώπη	Μέτρια έως μεγάλη	Πολύ συνηθισμένο, ευρύ φάσμα ξενιστών αλλά υδρόφιλο
<i>Cercopoidea:</i> 34 είδη	<i>Aphrophora alni</i>	Σε όλη την Ευρώπη	Μέτρια έως μεγάλη	Συνηθισμένο, ευρύ φάσμα ξενιστών
	<i>Aphrophora salicina</i>	Σε όλη την Ευρώπη	Μέτρια	Συνηθισμένο, πολυφάγα
	<i>Philaenus spumarius</i> (L.)	Σε όλη την Ευρώπη	Μεγάλη	Πολύ συνηθισμένο και άφθοно σε διάφορα οικοσυστήματα. Αναγνωρίζεται ως φορέας στην Απουλία
	<i>Cercopis vulnerata</i>	Απών στην Βόρεια Ευρώπη	Μέτρια	Πολλά φυτά ξενιστές αλλά κυρίως συσχετιζόμενα με ποώδη φυτά
<i>Cicadas (Cicadoidea):</i> 54 είδη	<i>Cicada orni</i>	Απών στην Βόρεια Ευρώπη	Αμφίβολη	Έλλειψη πληροφοριών σχετικά με την ικανότητα μετάδοσης
	<i>Cicadatra atra</i>	Βαλκάνια, Ιταλία και Γαλλία	Αμφίβολη	Έλλειψη πληροφοριών σχετικά με την ικανότητα μετάδοσης
	<i>Lyristes plebejus</i>	Απών στην Βόρεια Ευρώπη	Αμφίβολη	Έλλειψη πληροφοριών σχετικά με την ικανότητα μετάδοσης
	<i>Cicadivetta tibialis</i>	Απών στην Βόρεια Ευρώπη	Αμφίβολη	Έλλειψη πληροφοριών σχετικά με την ικανότητα μετάδοσης
	<i>Tibicina haematodes</i>	Απών στην Βόρεια Ευρώπη	Αμφίβολη	Έλλειψη πληροφοριών σχετικά με την ικανότητα μετάδοσης

Cicadellidae: Cicadellinae



Aphrophoridae και Cercopidae



Cicadidae



Ιταλία: φορέας το είδος *Philaenus spumarius* της οικογένειας των Aphrophoridae



Εικόνα 6: Έντομα-φορείς του βακτηρίου *Xylella fastidiosa* (Πηγή: Παπαχρήστος, 2017).

1.5. Σκοποί και διάρθρωση της εργασίας

Η σοβαρότητα του συγκεκριμένου παθογόνου και η σημασία του για την καλλιέργεια των φυτών ξενιστών του στην Ελλάδα είναι μεγάλη, με αποτέλεσμα να ενταχθεί από το 2014 στο ετήσιο πρόγραμμα επισκοπήσεων επιβλαβών οργανισμών. Σκοπός, της πράξης αυτής ήταν να διαπιστωθεί η παρουσία του ή η απουσία του στη χώρα μας αλλά και η τυχόν διασπορά του.

Έτσι, σκοπός της εργασίας αυτής, είναι να διερευνηθεί η παρουσία του βακτηρίου *Xylella fastidiosa* στη χώρα μας, συνδράμοντας ταυτόχρονα στην προσπάθεια αποφυγής εισόδου σε αυτή.

Στο 1^ο Κεφάλαιο της εργασίας γίνεται βιβλιογραφική αναφορά στη σημαντικότητα του παθογόνου για τη γεωργία, στα φυτά-ξενιστές του και τη συμπτωματολογία που προκαλεί σε αυτά καθώς επίσης στα έντομα-φορείς που διευκολύνουν την εξάπλωση του. Στο 2^ο Κεφάλαιο, αναφέρονται τα υλικά και οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση του παθογόνου στα έντομα-φορείς του και σε διάφορα είδη φυτών. Στο 3^ο Κεφάλαιο, συζητούνται τα αποτελέσματα της έρευνας και τέλος, στο 4^ο Κεφάλαιο εξάγονται τα συμπεράσματα της έρευνας και παραθέτονται προτάσεις για τον περιορισμό της ασθένειας που προκαλεί.

2. Υλικά και μέθοδοι

2.1. Φυτικά είδη στα οποία διερευνήθηκε η παρουσία του βακτηρίου *Xylella fastidiosa*

Για την ανίχνευση της *Xylella fastidiosa*, χρησιμοποιήθηκαν 6 διαφορετικά είδη φυτών (μάνγκο, ελιά, πορτοκαλιά, χαρουπιά, καφεόδεντρο και αβοκάντο), εκ των οποίων συλλέχθηκαν δείγματα φυτικών ιστών και από τους τέσσερεις Νομούς της Κρήτης (στο σύνολο από 49 τοποθεσίες). Τα στοιχεία που αφορούν τη συλλογή των φυτικών ιστών (φυτικό είδος, Νομός, τοποθεσία, συντεταγμένες και ημερομηνία δειγματοληψίας) δίνονται στον Πίνακα 4.

Πίνακας 4: Φυτικό είδος, Νομός, τόπος και ημερομηνία δειγματοληψίας για την ανίχνευση του βακτηρίου *Xylella fastidiosa*.

A/a	ΕΙΔΟΣ	ΠΕΡΙΟΧΗ	ΤΟΠΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑΣ (ΣΥΝΤΕΤΑΓΜΕΝΕΣ)	ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑΣ	
1	Μάνγκο	Χανιά	Αλικιανός	°N35.453008	08/10/2016
				°E23.915131	
2	Ελιά	Χανιά	Αλικιανός	°N35.451696	08/10/2016
				°E23.917664	
3	Πορτοκαλιά	Χανιά	Αλικιανός	°N35.452376	08/10/2016
				°E23.917657	
4	Πορτοκαλιά	Χανιά	Βατόλακος	°N35.453993	08/10/2016
				°E23.902206	
5	Χαρουπιά	Χανιά	Βατόλακος	°N35.45400	08/10/2016
				°E23.903054	
6	Πορτοκαλιά	Χανιά	Επισκοπή Αγιάς	°N35.467780	08/10/2016
				°E23.923940	
7	Ελιά	Χανιά	Αρμένιοι Αποκορώνου	°N35.4286	09/10/2016
				8°E24.1679	
8	Πορτοκαλιά	Χανιά	Αρμένιοι Αποκορώνου	°N35.4286	09/10/2016
				°E24.1679	
9	Καφεόδεντρο	Χανιά	Βοτανικό Πάρκο	°N35.418134	09/10/2016

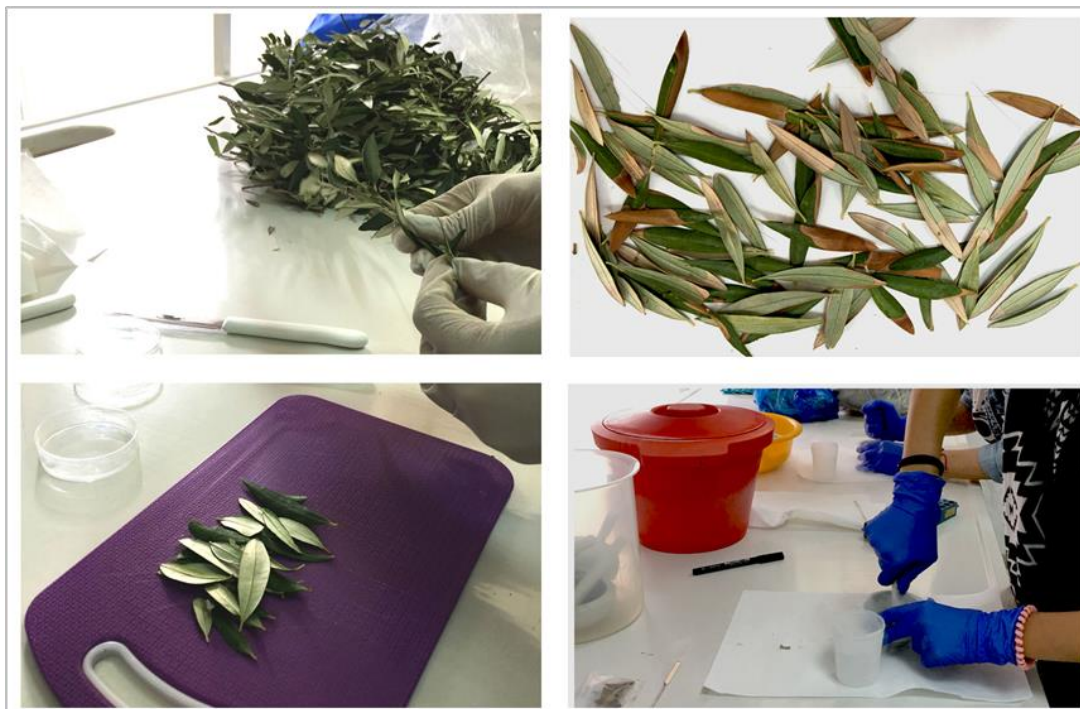
				°E23.940001	
10	Ελιά	Χανιά	Νικηφόρου Φωκά, Αγιά Μαρίνα	°N35.5184	19/11/2016
				°E23.9296	
11	Ελιά	Χανιά	Μαλαθούτου, Άγιοι Απόστολοι	°N35.5073	19/11/2016
				°E23.9811	
12	Ελιά	Χανιά	Παρηγοριάς, Μακρύς Τοίχος	°N35.5079	19/11/2016
				°E23.9911	
13	Ελιά	Χανιά	Νέας Κυδωνίας	°N35.5079	19/11/2016
				°E23.9496	
14	Ελιά	Χανιά	Μαρίνου Αντύπα	°N35.5087	19/11/2016
				°E23.9997	
15	Ελιά	Χανιά	2 ^η Πάροδος, Αναγνώστου Γογονή 1-5	°N35.5036	19/11/2016
				°E24.0101	
16	Ελιά	Χανιά	Αμπέλας, Αγιά Μαρίνα	°N35.5181	19/11/2016
				°E23.9332	
17	Ελιά	Χανιά	Γαλατάς	°N35.4995	19/11/2016
				°E23.9605	
18	Ελιά	Χανιά	Αρκαδίου	°N35.5058	19/11/2016
				°E23.9984	
19	Ελιά	Χανιά	Γαλατάς-Αγιά	°N35.4957	19/11/2016
				°E23.9586	
20	Ελιά	Χανιά	Θερίσου	°N35.4787	18/11/2016
				°E23.9671	
21	Αβοκάντο	Χανιά	Θερίσου	°N35.4787	18/11/2016
				°E23.9671	
22	Ελιά	Χανιά	Αθανασίου Διάκου, Χαλέπα	°N35.5191	17/11/2016
				°E24.0452	
23	Ελιά	Χανιά	Λυγιδές	°N35.4832	18/11/2016
				°E23.9685	
24	Ελιά	Χανιά	Βαρύπετρο	°N35.4686	18/11/2016
				°E23.9625	
25	Ελιά	Χανιά	Χανίων-Ομαλού, Μουσούρων	°N35.4579	20/11/2016
				°E23.9206	
26	Ελιά	Χανιά	Πλατανιά-Αλικιανού, Πατελλάρι	°N35.4884	20/11/2016
				°E23.9088	

27	Ελιά	Χανιά	Γεράνι	°N35.5168	20/11/2016
				°E23.8809	
28	Ελιά	Χανιά	Κυρτωμάδος	°N35.4831	20/11/2016
				°E23.9200	
29	Ελιά	Χανιά	Προς Πλατανιά	°N35.5136	20/11/2016
				°E23.8878	
30	Ελιά	Χανιά	Βρύσες (Πλατανιά)	°N35.4911	20/11/2016
				°E23.8900	
31	Ελιά	Χανιά	Νέας Κυδωνίας	°N35.5023	20/11/2016
				°E23.9196	
32	Ελιά	Ρέθυμνο	Εθνική οδός Ρεθύμνου, Πετρές	°N35.3537	14/11/2016
				°E24.3660	
33	Ελιά	Ρέθυμνο	Νικηφόρου Φωκά	°N35.3542	14/11/2016
				°E24.4042	
34	Ελιά	Ρέθυμνο	Ρεθύμνου-Σπηλίου	°N35.3428	14/11/2016
				°E24.4665	
35	Ελιά	Ρέθυμνο	Μάρκου Αβάντζου, Ατσιπόπουλο	°N35.3556	14/11/2016
				°E24.4394	
36	Ελιά	Ρέθυμνο	Βάμος	°N35.4089	14/11/2016
				°E24.2613	
37	Ελιά	Ρέθυμνο	Εθνική οδός Ρεθύμνου, Νικηφόρου Φωκά	°N35.3579	14/11/2016
				°E24.3720	
38	Ελιά	Ρέθυμνο	Επισκοπή Αργουρούπολεως	°N35.3368	14/11/2016
				°E24.3363	
39	Ελιά	Ρέθυμνο	Πανόρμου-Περάματος Γεροποτάμου	°N35.4131	21/11/2016
				°E24.6938	
40	Ελιά	Ρέθυμνο	Βλυχάδα	°N35.3984	21/11/2016
				°E24.7826	
41	Ελιά	Ρέθυμνο	Εθνική οδός Ρεθύμνου- Γεροποτάμου	°N35.4170	21/11/2016
				°E24.6519	
41	Ελιά	Ρέθυμνο	Εθνική οδός Ρεθύμνου- Αρκαδίου	°N35.3799	21/11/2016
				°E24.5806	
43	Ελιά	Ρέθυμνο	Ρεθύμνης	°N35.3634	21/11/2016
				°E24.4965	
44	Ελιά	Ρέθυμνο	Μπαλί	°N35.4091	21/11/2016

				°E24.7822	
45	Ελιά	Ρέθυμνο	Γεροποτάμου	°N35.3978	21/11/2016
				°E24.7820	
46	Ελιά	Ρέθυμνο	Ρουμελή	°N35.4032	21/11/2016
				°E24.7039	
47	Ελιά	Ρέθυμνο	Αρκαδίου	°N35.3995	21/11/2016
				°E24.6329	
48	Ελιά	Ηράκλειο	ΤΕΙ Κρήτης	°N35.3163	06/10/2016
				°E25.1060	
49	Ελιά	Λασιθί	Μακρύς Γιαλός	°N35.0695	20/11/2016
				°E25.9708	

2.2. Καθαρισμός ολικού DNA και απομόνωση νουκλεϊκών οξέων από φυτικούς ιστούς

Για την εκχύλιση του ολικού φυτικού DNA, χρησιμοποιήθηκαν φυτικοί ιστοί μήκους 2-3 cm, από τη βάση των φύλλων των υπό εξέταση φυτών. Αφού έγινε επέμβαση τους ιστούς αυτούς με υγρό άζωτο, οι ιστοί (0.5-1g) λειοτριβήθηκαν μέχρι να κονιορτοποιηθούν μέσα σε πορσελάνινο γουδί με τη βοήθεια γουδοχειριού, προκειμένου να γίνει απομόνωση του DNA. Έπειτα, μια ποσότητα 100 mg από κάθε δείγμα κονιορτοποιημένου φυτικού ιστού, μεταφέρθηκε σε Eppendorf 1,5mL, μέχρι να εξατμιστεί όλο το υγρό άζωτο (Εικόνα 7). Αφού εξατμίστηκε το υγρό άζωτο, στο κάθε δοχείο με τα 100mg ιστού, προστέθηκαν 400μl ρυθμιστικού διαλύματος AP1 και 4μl RNase A (από stock διάλυμα 100 mg/ml). Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε έντονη ανάδευση (vortex), μέχρι σε σημείο που οι μάζες ιστού δεν ήταν πια ορατές.



Εικόνα 7: Φωτογραφίες από τα διαδοχικά βήματα που ακολουθήθηκαν για την επιλογή των φύλλων (σε αυτή την περίπτωση από ελαιόδεντρα) από τα οποία πραγματοποιήθηκε η απομόνωση DNA για το έλεγχο της παρουσίας του *Xylella fastidiosa*, καθώς επίσης και στιγμιότυπο από την λειοτρίβηση των ιστών σε γουδί με την βοήθεια υγρού αζώτου.

Για να πραγματοποιηθεί η εκχύλιση των νουκλεϊκών οξέων, χρησιμοποιήθηκε το DNeasy Plant Mini Kit (250) της εταιρείας Qiagen (Hilden, Germany) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (Εικόνα 8). Πριν την εκκίνηση των διαδικασιών της απομόνωσης ελέγχθηκε εάν στα συμπυκνωμένα ρυθμιστικά διαλύματα AP1 και AW1 διαλύματα είχε δημιουργηθεί ίζημα. Στις περιπτώσεις που αυτό είχε συμβεί, τα διαλύματα αυτά θερμαίνονταν στους 65°C μέχρι να ομογενοποιηθούν ξανά. Επίσης, επειδή τα ρυθμιστικά διαλύματα AW2 και AW1 παρέχονται ως συμπυκνώματα, πριν από την πρώτη χρήση, γινόταν προσθήκη της απαραίτητης ποσότητας αιθανόλης (96-100%), όπως αυτή αναφερόταν από τον κατασκευαστή.



Εικόνα 8: Το DNeasy Plant Mini Kit (250) της εταιρείας Qiagen.

Έπειτα, για κάθε δείγμα πραγματοποιήθηκε επώαση σε υδατόλουτρο, διάρκειας 10 min στους 65°C. Κατά το χρονικό αυτό διάστημα της επώασης των δειγμάτων πραγματοποιούνταν και αναδεύσεις (2-3 φορές), με αναστροφή των δοχείων. Στο στάδιο αυτό της απομόνωσης των νουκλεϊκών οξέων πραγματοποιήθηκε και η λύση των κυττάρων (Εικόνα 9).



Εικόνα 9: Υδατόλουτρο επώασης των δειγμάτων στους 65°C.

Ακολούθως στο κάθε δείγμα, προστέθηκαν 130μl ρυθμιστικού διαλύματος P3 και πραγματοποιήθηκε ομογενοποίηση, και επώαση για 5 min στον πάγο. Στο στάδιο αυτό, έγινε η συσσωμάτωση των ανεπιθύμητων προς εξέταση στοιχείων όπως είναι οι

πρωτεΐνες και οι πολυσακχαρίτες των οποίων η απομάκρυνση επιτεύχθηκε με φυγοκέντρηση των δειγμάτων για 5 min στα 20.000 g (14.000 rpm).

Στη συνέχεια, τα διαλύματα που υπήρχαν πάνω από τα ίζηματα που προέκυψαν με την φυγοκέντρηση, μεταφέρθηκαν με τη χρήση πιπέτας, σε στήλες QIAshredder Mini spin (Εικόνα 10). Οι στήλες αυτές, ήταν τοποθετημένες σε κατάλληλους σωλήνες συλλογής των 2ml. Μετά, για μια ακόμα φορά, πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση για 2 min στα 20.000g (14.000 rpm). Αν και οι QIAshredder Mini spin στήλες έχουν την ιδιότητα να αφαιρούν την πλειοψηφία των ιζημάτων και των κυτταρικών υπολειμμάτων, υπάρχει η πιθανότητα κάποια μικρά ποσά αυτών να περάσουν μέσα από τις στήλες και να σχηματίσουν ίζημα στο δοχείο συλλογής. Στο επόμενο στάδιο της διαδικασίας απομόνωσης των νουκλεϊκών οξέων, το ίζημα αυτό έγινε προσπάθεια να μην διαταραχθεί.



Εικόνα 10: Οι στήλες Qiagen QIAshredder Mini spin που χρησιμοποιήθηκαν για το πρώτο στάδιο καθαρισμού των δειγμάτων.

Το κλάσμα που πέρασαν από τις στήλες και σχημάτισαν ίζημα στο δοχείο συλλογής, χωρίς το τελευταίο να διαταραχθεί, μεταφέρθηκαν σε νέους σωλήνες συλλογής. Εν τέλει, ανακτήθηκαν περίπου 450μl της λύσης των κυττάρων ανά δείγμα, στα οποία προστέθηκε ρυθμιστικό διάλυμα AW1, του οποίου ο όγκος ήταν 1,5 φορά ο όγκος (δηλαδή 675μl) του κάθε δείγματος. Η προσθήκη αυτή του

ρυθμιστικού διαλύματος, γινόταν απευθείας πάνω στο καθαρό προϊόν λύσης και αναμίχθηκε αμέσως. Το νέο μείγμα, αναμίχθηκε με τη βοήθεια πιπέτας. Έτσι, στη περίπτωση που είχαν ανακτηθεί σε ένα δείγμα ακριβώς 450μl προϊόντος λύσης, γινόταν 675 μl ρυθμιστικού διαλύματος AW1, ενώ αν είχε ανακτηθεί μικρότερος όγκος προϊόντος λύσης, τότε η ποσότητα του ρυθμιστικού διαλύματος AW1, μειωνόταν αναλόγως. Στο σημείο αυτό αξίζει να σημειωθεί ότι σύμφωνα με τους κατασκευαστές του kit που χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση των νουκλεϊκών οξέων από φυτικούς ιστούς, ακόμα και αν σχηματιστεί ίζημα μετά την προσθήκη του ρυθμιστικού διαλύματος AW1, αυτό δεν επηρεάζει την ορθότητα της όλης διαδικασίας.



Εικόνα 11: Κολονάκια Qiagen DNeasy Mini spin που χρησιμοποιήθηκαν για τον βασικό καθαρισμό των νουκλεϊκών οξέων από τα φυτικά δείγματα.

Τα νέα διαλύματα, μεταφέρθηκαν με πιπέτα στις στήλες DNeasy Mini spin, οι οποίες ήταν τοποθετημένες σε δοχεία συλλογής των 2ml (Εικόνα 11). Οι στήλες αυτές, είναι κατασκευασμένες από οξειδίο του πυριτίου (SiO_2) και δεσμεύουν το DNA. Έπειτα, γινόταν φυγοκέντρηση για 1 min σε $>6.000g$ (>8000 rpm για τις περισσότερες μικροφυγόκεντρους) και το σχηματιζόμενο ίζημα απορρίπτετο. Στις περιπτώσεις, που το διάλυμα είχε όγκο μεγαλύτερο των 650 μl διοχετευόταν σε διαδοχικές δόσεις μέχρι να ολοκληρωθεί η διαδικασία, προσέχοντας να αδειάζει το δοχείο συλλογής κάθε φορά.

Μετά το τέλος της διαδικασίας αυτής οι DNeasy Mini spin στήλες, τοποθετήθηκαν σε νέους σωλήνες συλλογής των 2ml στους οποίους προστέθηκαν 500 μl ρυθμιστικού διαλύματος AW2. Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 1 min σε $\geq 6000g$ (≥ 8000 rpm). Αφού απορρίφθηκε το ίζημα που προέκυψε από την

φυγοκέντρωση, προστέθηκαν στη στήλη 500 μl ρυθμιστικού διαλύματος AW2 και ακολούθησε φυγοκέντρωση για 2 min στα 20.000g (14.000 rpm) προκειμένου να απομακρυνθούν τα υπολείμματα από την μεμβράνη. Επειδή υπολειμματική αιθανόλη μπορεί να αλληλεπιδράσει στις βιοχημικές αντιδράσεις που ακολουθούν, στο στάδιο αυτό η μεμβράνη αφέθηκε να στεγνώσει. Μετά την φυγοκέντρωση, οι DNeasy Mini spin στήλες αφαιρέθηκαν προσεκτικά από τα δοχεία συλλογής και επανατοποθετήθηκαν σε νέα δοχεία, δηλαδή τα δοχεία της έκλουσης.

Για την διαδικασία της έκλουσης, οι στήλες μεταφέρθηκαν σε δοχείο μικροφυγοκέντρωσης τύπου erpendorf 1.5 ή 2ml και προστέθηκαν 50μl ρυθμιστικού διαλύματος AE. Ακολούθησε επώαση για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου (15 - 25°C), και κατόπιν φυγοκέντρωση για 1 min σε $\geq 6000g$ (≥ 8000 rpm). Η έκλουση επαναλήφθηκε με 50μl.

Στη συνέχεια έγιναν αντιδράσεις multiplex-PCR χρησιμοποιώντας ένα τροποποιημένο πρωτόκολλο των Minsavage et al. (1994) και των Weisburg et al. (1991). Οι primers που χρησιμοποιήθηκαν για την multiplex-PCR ήταν οι (Fd2: CCG AAT TCG TCG ACA ACA GAG TTT GAT CAT GGC TCA G / RP1: CCC GGG ATC CAA GCT TAC GGT TAC CTT GTT ACG ACT T και RST31: GCG TTA ATT TTC GAA GTG ATT CGA TTG C / RST33: CAC CAT TCG TAT CCC GGT G). Οι primers Fd2, Fd1 είναι γενικοί για βακτήρια και οι RST31,RST33 είναι εξειδικευμένοι για το *Xylella*. Τα στοιχεία της αντίδρασης δίνονται στον Πίνακα 5.

Πίνακας 5: Στοιχεία multiplex-PCR που χρησιμοποιήθηκαν για τους σκοπούς της πειραματικής διαδικασίας ανίχνευσης του *Xylella fastidiosa* σε φυτικούς ιστούς.

Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για τις αντιδράσεις PCR
2 μL DNA από κάθε απομόνωση
2x KapaTaq ReadyMix: 10 μL
10 μM RST31/RST33 μείγμα: 1 μL
10 μM FD2/RP1 μείγμα: 1 μL
H ₂ O: 6 μL

Το πρόγραμμα της PCR που ακολουθήθηκε ήταν αρχική αποδιάταξη 95°C για 1 min, 30 κύκλοι (94°C για 45 sec, 55°C για 30 sec, 72°C για 1 min 30 sec), 1 κύκλος στους 72°C για 10 min και τέλος 1 κύκλος 25°C για 1 min.

2.3. *Είδη εντόμων, στα οποία διερευνήθηκε η παρουσία του βακτηρίου Xylella fastidiosa*

Για την ανίχνευση του παθογόνου *Xylella fastidiosa* σε έντομα, χρησιμοποιήθηκαν 10 διαφορετικά είδη εντόμων (από Αθήνα και Χανιά). Η δειγματοληψία, η αναγνώριση των εντόμων και η διάθεσή τους στο εργαστήριο Βακτηριολογίας του ΤΕΙ Κρήτης πραγματοποιήθηκε από την ερευνήτρια Δρ. Αργυρώ Καλαϊτζάκη του Ινστιτούτο Ελιάς, Υποτροπικών Φυτών & Αμπέλου Χανίων, ΕΛΓΟ ‘Δήμητρα’, (Αγροκήπιο, 73100, Χανιά). Οι σχετικές πληροφορίες δειγματοληψίας (είδος εντόμου, ξενιστής, τόπος και ημερομηνία δειγματοληψίας) δίνονται στον Πίνακα 6.

Πίνακας 6. Αποτελέσματα εργαστηριακών αναλύσεων για τον έλεγχο της παρουσίας του βακτηρίου *Xylella fastidiosa* σε δείγματα ακμαίων εντόμων* που συλλέχθηκαν από το Νομό Χανίων και την περιοχή της Αθήνας το διάστημα Οκτώβριος 2015 – Μάιος 2016

a/a	ΕΝΤΟΜΟ	ΑΡΙΘΜΟΣ	ΞΕΝΙΣΤΗΣ	ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΣΥΛΛΟΓΗΣ	ΠΕΡΙΟΧΗ ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑΣ	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ PCR
1	<i>Euscelis</i> sp.	3	Ελαιόδενδρο	18 Μαΐου 2016	Χανιά	Αρνητικό
2	<i>Euscelis</i> sp.	3	Ελαιόδενδρο	28 Μαΐου 2016	Χανιά	Αρνητικό
3	<i>Eupteryx</i> sp.	5	Ελαιόδενδρο	18 Μαΐου 2016	Χανιά	Αρνητικό
4	<i>Empoasca</i> sp.	4	Ελαιόδενδρο	18 Μαΐου 2016	Χανιά	Αρνητικό
5	<i>Empoasca</i> sp.	5	Ελαιόδενδρο	18 Μαΐου 2016	Χανιά	Αρνητικό
6	<i>Empoasca</i> sp.	5	Ελαιόδενδρο	25 Μαΐου 2016	Χανιά	Αρνητικό
7	<i>Colobotettix</i> sp.	5	Ελαιόδενδρο	7 Οκτωβρίου 2015	Χανιά	Αρνητικό
8	<i>Colobotettix</i> sp.	3	Ελαιόδενδρο	15 Οκτωβρίου 2015	Χανιά	Αρνητικό
9	<i>Colobotettix</i> sp.	4	Ελαιόδενδρο	18 Νοεμβρίου 2015	Χανιά	Αρνητικό
10	<i>Colobotettix</i> sp.	5	Ελαιόδενδρο	25 Νοεμβρίου 2015	Χανιά	Αρνητικό
11	<i>Colobotettix</i> sp.	5	Ελαιόδενδρο	2 Δεκεμβρίου 2015	Χανιά	Αρνητικό
12	<i>Cicadula</i> sp.	5	Ελαιόδενδρο	3 Δεκεμβρίου 2015	Χανιά	Αρνητικό
13	<i>Cicadula</i> sp.	3	Ελαιόδενδρο	13 Ιανουαρίου 2016	Χανιά	Αρνητικό
14	<i>Cicadula</i> sp.	3	Ελαιόδενδρο	3 Φεβρουαρίου 2016	Χανιά	Αρνητικό
15	<i>Issus muscaeformis</i>	4	Ελαιόδενδρο	18 Νοεμβρίου 2015	Χανιά	Αρνητικό
16	<i>Empoasca</i> sp.	4	Αμπέλι	13 Μαΐου 2016	Χανιά	Αρνητικό
17	<i>Empoasca</i> sp.	5	Εσπεριδοειδές	21 Απριλίου 2016	Χανιά	Αρνητικό
18	<i>Empoasca</i> sp.	5	Εσπεριδοειδές	5 Μαΐου 2016	Χανιά	Αρνητικό
19	<i>Empoasca</i> sp.	5	Εσπεριδοειδές	10 Μαΐου 2016	Χανιά	Αρνητικό
20	<i>Empoasca</i> sp.	5	Εσπεριδοειδές	19 Μαΐου 2016	Χανιά	Αρνητικό
21	<i>Psammotettix</i> sp.	5	Εσπεριδοειδές	12 Μαΐου 2016	Χανιά	Αρνητικό
22	<i>Psammotettix</i> sp.	5	Εσπεριδοειδές	19 Μαΐου 2016	Χανιά	Αρνητικό
23	<i>Euscelis</i> sp.	3	Εσπεριδοειδές	26 Μαΐου 2016	Χανιά	Αρνητικό
24	<i>Euscelis</i> sp.	3	Εσπεριδοειδές	19 Μαΐου 2016	Χανιά	Αρνητικό
25	<i>Eupteryx</i> sp.	5	Πικροδάφνη	12 Μαΐου 2016	Χανιά	Αρνητικό
26	<i>Empoasca</i> sp.	5	Πικροδάφνη	12 Μαΐου 2016	Χανιά	Αρνητικό
27	<i>Neophilaenus campestris</i>	4	Ελαιόδενδρο	13 Μαΐου 2016	Αθήνα	Αρνητικό
28	<i>Euscelis stictopterus</i>	4	Ελαιόδενδρο	13 Μαΐου 2016	Αθήνα	Αρνητικό
29	<i>Philaenus spumarius</i>	4	Ελαιόδενδρο	10 Μαΐου 2016	Αθήνα	Αρνητικό
30	<i>Neophilaenus campestris</i>	5	Ελαιόδενδρο	10 Μαΐου 2016	Αθήνα	Αρνητικό

2.4. Απομόνωση νουκλεϊκών οξέων από έντομα

Ένα έως πέντε έντομα από κάθε είδος εντόμου τοποθετήθηκαν σε erpendorf δοχεία, όπου προστέθηκαν και 500 μl CTAB buffer (2% Hexadecyl trimethylammonium bromide, 0,1 M Tris HCl Ph 8.0, 20Mm EDTA, 1,4 M NaCl). Με τη βοήθεια ειδικών γουδοχειριών (pestles), ακολούθησε σπάσιμο των εντόμων.

Έπειτα, τα δείγματα τοποθετήθηκαν στους 65 °C για 30 min. Σε αυτό το χρονικό διάστημα, γινόταν ανακίνηση (vortex) των δειγμάτων περιοδικά (κάθε 10 min). Ακολούθησε προσθήκη 500 μl χλωροφορμίου/ισοπροπανόλης, σε αναλογία 24/1 μετά από την οποία τα δείγματα αναδεύτηκαν ξανά και φυγοκεντρήθηκαν (16.000 g για 10 min). Από το υπερκείμενο ογκομετρήθηκαν 400 μl διαλύματος και μεταφέρθηκαν σε νέο δοχείο Eppendorf όπου και προστέθηκαν 280 μl παγωμένης ισοπροπανόλης (2-propanol).

Αφού τα δείγματα επώαστηκαν στους -20 °C για 20 min, πραγματοποιήθηκε νέα φυγοκέντρηση (16.000 g για 20 min, στους 4 °C). Στη συνέχεια, τα δείγματα εκκλύθηκαν δυο φορές με 1ml αιθανόλης (70%) και ψυχόμενη φυγοκέντρηση στα 16.000 g για 10 λεπτά. Η πελέτα που σχηματίστηκε, αφέθηκε να στεγνώσει στους 50 °C για περίπου 15 λεπτά προκειμένου να εξατμιστούν τα τυχόν υπολείμματα αιθανόλης. Τέλος, προστέθηκαν 50 μl ρυθμιστικού διαλύματος έκλουσης (elution buffer, TE) και τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους -20°C, μέχρι να πραγματοποιηθούν οι PCR αντιδράσεις.

Στη συνέχεια, όπως και στην περίπτωση των φυτικών ιστών, πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις multiplex-PCR χρησιμοποιώντας ένα τροποποιημένο πρωτόκολλο των Minsavage et al. (1994) και των Weisburg et al. (1991).

Οι primers που χρησιμοποιήθηκαν για την multiplex-PCR ήταν οι (fD2: CCG AAT TCG TCG ACA ACA GAG TTT GAT CAT GGC TCA G / RP1: CCC GGG ATC CAA GCT TAC GGT TAC CTT GTT ACG ACT T και RST31: GCG TTA ATT TTC GAA GTG ATT CGA TTG C / RST33: CAC CAT TCG TAT CCC GGT G). Τα στοιχεία της αντίδρασης αυτής, δίνονται στον Πίνακα 7.

Πίνακας 7: Στοιχεία multiplex-PCR που χρησιμοποιήθηκαν για τους σκοπούς της πειραματικής διαδικασίας ανίχνευσης του *Xylella fastidiosa* σε έντομα.

Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για τις αντιδράσεις PCR
2 μ L DNA από κάθε απομόνωση
10x Platinum buffer: 2,5 μ L
Platinum Taq: 0,15 μ L
50mM MgCl ₂ : 0,75 μ L
10mM dNTPs: 0,5 μ L
10 μ M RST31/RST33 μείγμα: 0,75 μ L
10 μ M FD2/RP1 μείγμα: 0,75 μ L
H ₂ O: 17,6 μ L

Το πρόγραμμα της PCR που ακολουθήθηκε ήταν αρχική αποδιάταξη 95⁰ C για 1 min, 40 κύκλοι (95⁰C για 30 sec, 55⁰C για 30 sec, 72⁰C για 1 min 30 sec), 1 κύκλος στους 72⁰C για 5 min και τέλος 1 κύκλος 25⁰C για 1 min.

3. Αποτελέσματα- Συζήτηση

3.1. Αποτελέσματα ανίχνευσης του *Xylella fastidiosa* σε φυτικούς ιστούς

Οι πειραματικές διαδικασίες για την ανίχνευση του βακτηρίου *Xylella fastidiosa*, στα δείγματα των φυτικών ιστών που εξετάστηκαν, υπέδειξαν την απουσία του παθογόνου σε όλα τα υπό εξέταση φυτικά είδη ανεξαρτήτως της τοποθεσίας από όπου προέρχονταν.

Στην Εικόνα 12, δίνεται αντιπροσωπευτικά δείγματα των αποτελεσμάτων από την προσπάθεια ανίχνευσης του *Xylella fastidiosa* όπως αποτυπώθηκαν κατά τη διαδικασία πραγματοποίησης της PCR αντίδρασης.

Είναι πολύ ενθαρρυντικό ότι σε κανένα δείγμα δε διαπιστώθηκε η παρουσία της *Xylella*, αν και κάποια από τα δείγματα είχαν συλλεχθεί από φυτά που εμφάνιζαν συμπτώματα που ομοίαζαν με εκείνα της που εκδηλώνονται από την ασθένεια της ταχείας παρακμής των ελαιόδεντρων.

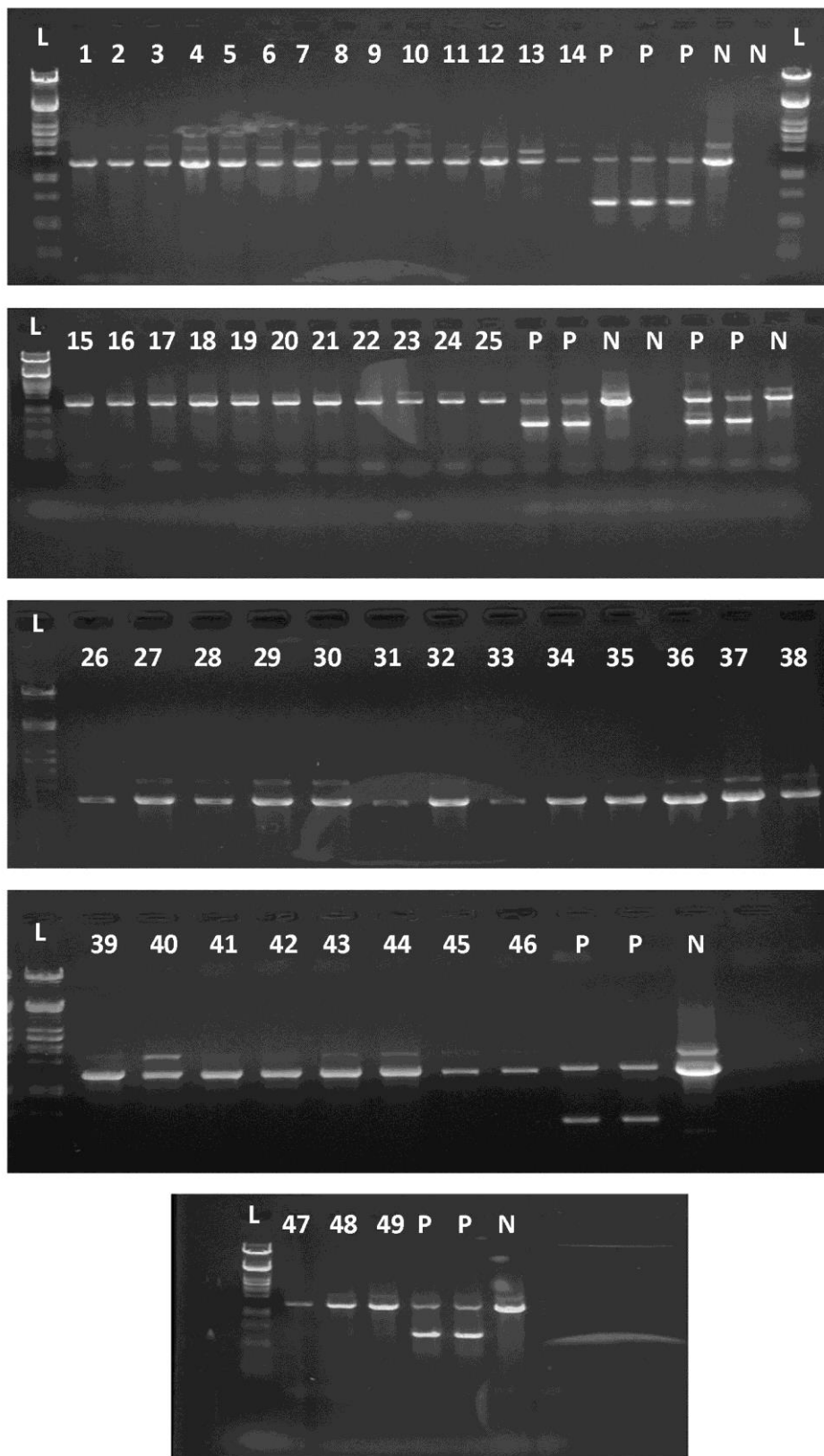
Η πρόληψη της εισόδου του παθογόνου σε μια νέα περιοχή αποτελεί βασικό στοιχείο των φυτοϋγειονομικών υπηρεσιών στη χώρα μας. Η προσπάθεια αυτή κατηγοριοποιείται στην εφαρμογή των ακόλουθων:

- αυστηρών μέτρων καραντίνας
- φυτοϋγειονομικού ελέγχου
- και διενέργεια επισκοπήσεων (surveys) στις εγκαταστημένες καλλιέργειες.

Ωστόσο, η απόδειξη της παρουσίας του *Xylella fastidiosa* μέσω μακροσκοπικών μεθόδων δεν είναι πάντοτε δυνατή, καθώς πολλά από τα είδη που προσβάλλει είναι μη συμπτωματικά. Μέσω της παρούσας μελέτης πάντως, καθώς η ανίχνευση του παθογόνου πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας έγκυρη εργαστηριακή μέθοδο (PCR), εξακριβώθηκε η απουσία του – τουλάχιστον στα φυτά από τα οποία αναλύθηκαν εργαστηριακά (Εικόνα 12).

Καθώς η Κρήτη είναι νησί, η μεταφορά του παθογόνου σε φυτικές καλλιέργειες αυτής, θα μπορούσε να γίνει μόνο με τη εισαγωγή ήδη μολυσμένων φυτών προς φύτευση ή και των φορέων του παθογόνου. Μπορεί λοιπόν να ειπωθεί ότι

οι φυτοϋγειονομικές απαιτήσεις διακίνησης πολλαπλασιαστικού υλικού εφαρμοζόντουσαν με επιτυχία, εφόσον δεν έχει εισέλθει το παθογόνο σε αυτή.

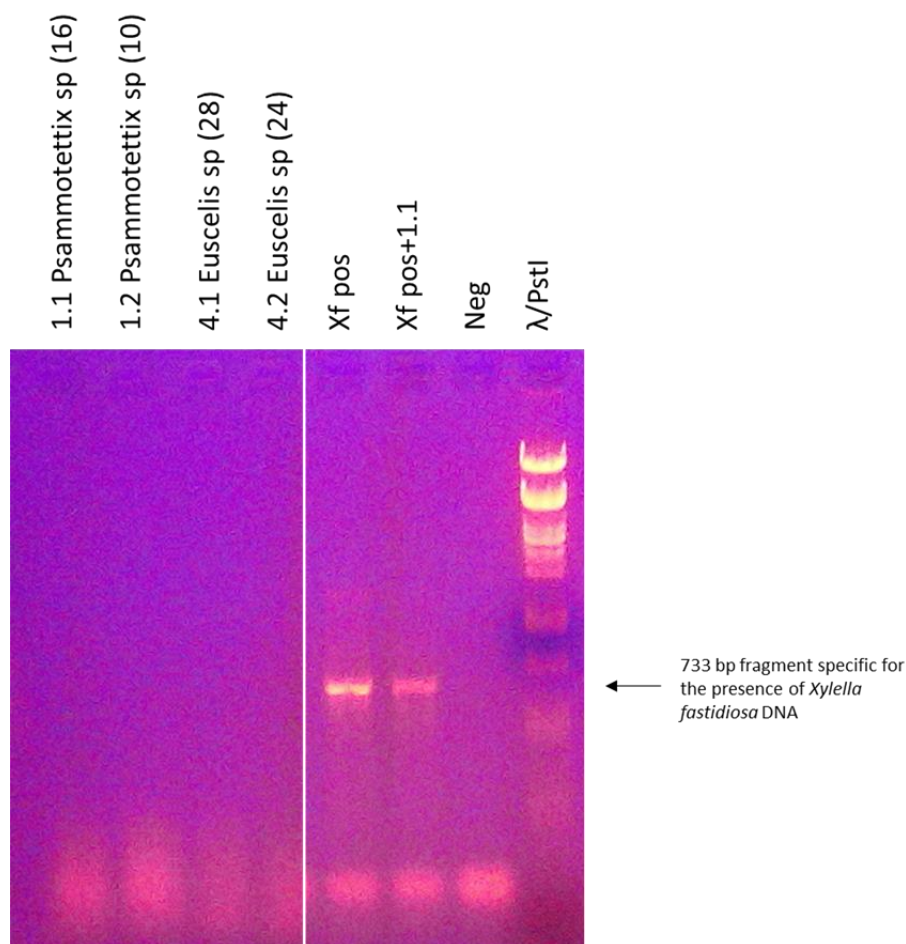


Εικόνα 12: PCR-αντίδραση σε δείγματα προερχόμενα από φυτικούς ιστούς. **P:** Positive control, **N:** Negative control, **L:** Ladder (λ /PSTI)

Οι απαιτήσεις αυτές, έχουν οριστεί βάσει της Εκτελεστικής Απόφασης της Επιτροπής με αριθμό 2014/497/ΕΕ, όπου αναγράφονται οι όροι και οι προϋποθέσεις που πρέπει να εφαρμόζονται για την εισαγωγή φυτών-ξενιστών προς φύτευση από τρίτες χώρες προς την Ε.Ε.. Όροι και προϋποθέσεις ορίζονται βάσει της ίδιας απόφασης και για τη διακίνησή τους εντός της Ε.Ε.

3.2. Αποτελέσματα ανίχνευσης του *Xylella fastidiosa* σε έντομα

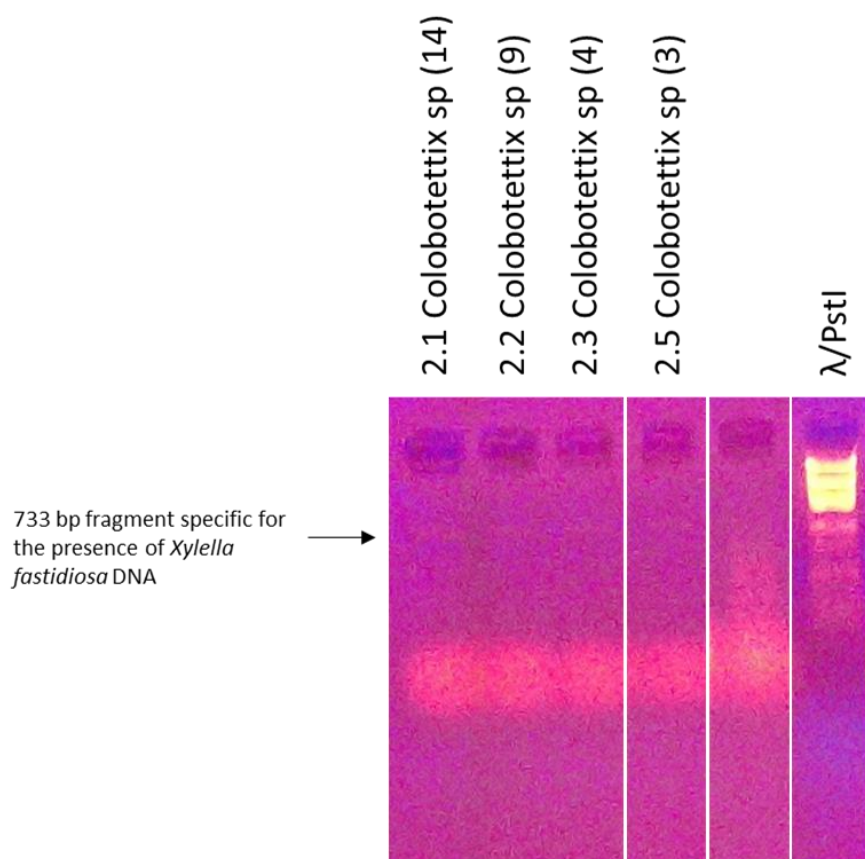
Οι πειραματικές διαδικασίες για την ανίχνευση του βακτηρίου *Xylella fastidiosa*, στα δείγματα των εντόμων που εξετάστηκαν, όπως και στην περίπτωση των φυτικών ιστών, υπέδειξαν την απουσία του παθογόνου σε όλα τα υπό εξέταση έντομα, ανεξαρτήτως της τοποθεσίας από όπου προέρχονταν (Εικόνα 13 & 14).



Εικόνα 13: PCR-αντίδραση σε δείγματα προερχόμενα από έντομα. Όλα τα αποτελέσματα ήταν αρνητικά καθώς το DNA τμήμα στα 733bp δεν ήταν παρόν σε κανένα από τα δείγματα.

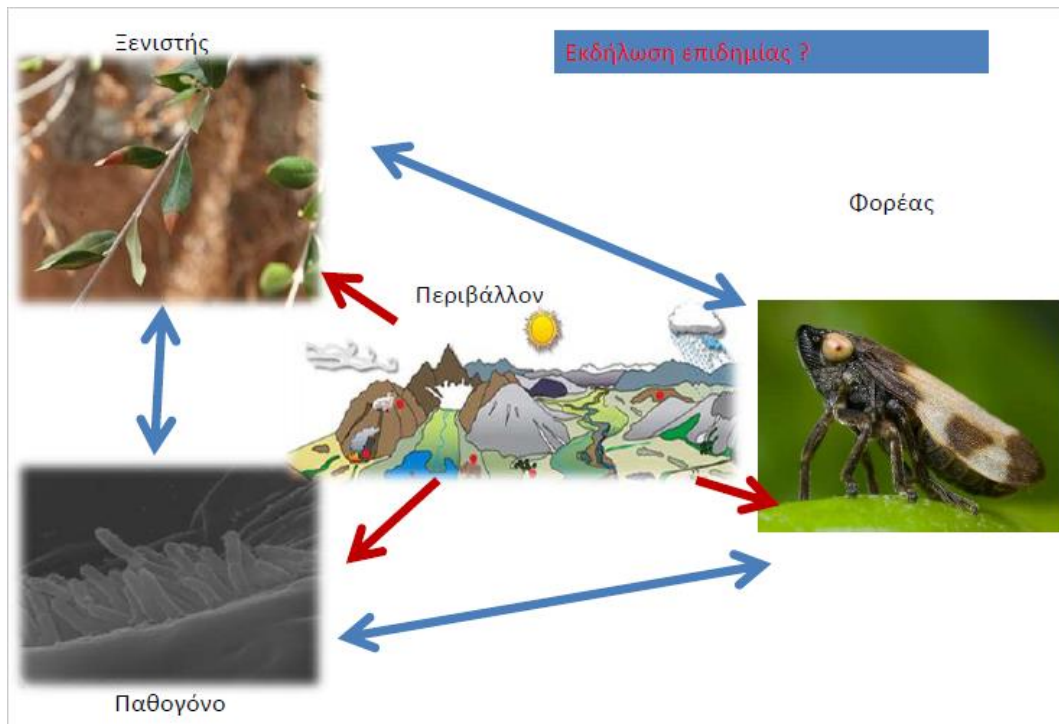
Καθώς κάποια από τα είδη εντόμων που επιλέχθηκαν για τους σκοπούς της εργασίας αυτής, είναι γνωστά για την ιδιότητα που έχουν να λειτουργούν ως φορείς

της *Xylella fastidiosa*, γίνεται εμφανές ότι η πιθανότητα να υπάρχουν άλλα είδη εντόμων που φέρουν το βακτήριο είναι μειωμένη.



Εικόνα 14: PCR-αντίδραση σε δείγματα προερχόμενα από έντομα. Όλα τα αποτελέσματα ήταν αρνητικά καθώς το DNA τμήμα στα 733bp δεν ήταν παρόν σε κανένα από τα δείγματα.

Το βακτήριο *Xylella fastidiosa*, έχει κηρυχτεί παθογόνο καραντίνας (Quarantine pest). Σύμφωνα με το N 3495 (Α' 215) με θέμα την «Κύρωση του νέου αναθεωρημένου κειμένου της Διεθνούς Σύμβασης Προστασίας Φυτών. Αυτό σημαίνει ότι είναι «επιβλαβής οργανισμός με ενδεχόμενη οικονομική σημασία για την περιοχή η οποία κινδυνεύει από αυτόν και στην οποία δεν είναι ακόμη παρών, ή είναι παρών αλλά δεν έχει εξαπλωθεί ευρέως και βρίσκεται υπό αποτελεσματικό επίσημο έλεγχο».



Εικόνα 15: Προϋποθέσεις για την εκδήλωση της ασθένειας (Παπαχρήστος, 2017).

Στην Εικόνα 15, φαίνονται οι προϋποθέσεις ανάπτυξης της ασθένειας (συμπεριλαμβανομένων των εντόμων-φορέων) (Παπαχρήστος, 2017). Αν και βασικές καλλιέργειες στην Κρήτη (ελιά, αμπέλι) αποτελούν δυνητικούς ξενιστές του παθογόνου, τα είδη εντόμων που μπορεί να γίνουν φορείς του, υπάρχουν όπως και οι συνθήκες που επικρατούν φαίνεται να είναι ευνοϊκές, το παθογόνο απουσιάζει και κατά συνέπεια και η ασθένεια.

4. Συμπεράσματα - Προτάσεις

Στην εργασία αυτή, παρουσιάζονται, αναλυτικά τα αποτελέσματα των εργαστηριακών αναλύσεων ενός μέρους των επισκοπήσεων, που πραγματοποιήθηκαν το έτος 2017 για την ανίχνευση της παρουσίας του βακτηρίου καραντίνας *Xylella fastidiosa* στις τέσσερις Περιφερειακές Ενότητες της Κρήτης. Η ανίχνευση του βακτηρίου βασίστηκε στη μεθοδολογία της PCR βάσει Ευρωπαϊκού πρωτοκόλλου (EPPO, 2016). Συνολικά ελέγχθησαν διάφορα φυτικά είδη, όπως ελαιόδενδρα, καρποφόρα δένδρα και τροπικά φυτά (49 φυτικά δείγματα). Επίσης, ελέγχθησαν και έντομα - φορείς (30 δείγματα) του βακτηρίου από τους Νομούς Χανίων και Αττικής. Όπως προέκυψε από τις μοριακές αναλύσεις, σε κανένα από τα 49 φυτά και τα 30 δείγματα εντόμων που αναλύθηκαν στην παρούσα εργασία που πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Βακτηριολογίας του ΤΕΙ Κρήτης, δεν διαπιστώθηκε η παρουσία του βακτηρίου *Xylella fastidiosa* στην Κρήτη. Ένα σημαντικό αποτέλεσμα που προέκυψε είναι ότι, σε κανένα από τα φυτά με συμπτωματολογική εικόνα παρόμοια με εκείνη που προκαλεί η *Xylella*, δεν ανιχνεύτηκε η παρουσία του βακτηρίου. Όλα τα δείγματα φυτών αλλά και εντόμων-φορέων, βρέθηκαν αρνητικά. Όπως προέκυψε από συμπληρωματικά στοιχεία, τα συμπτώματα αυτά συχνά συνδέονται ή συγχέονται με έλλειψη νερού – ξηρασία, με την παρουσία άλλων φυτοπαθογόνων (*Verticillium*, *Fomitiporia*, *Phoma* κ.ά) καθώς και εντομολογικών προσβολών (κηκιδόμυγα των φύλλων της ελιάς, *Dasyneura oleae*). Επίσης, μπορεί να συγχέονται και με την τοξικότητα από άλατα ή τις ζημιές από αστοχίες (φυτοφάρμακα και ζιζανιοκτόνα).

Στις χώρες που ήδη υπάρχει το βακτήριο *Xylella fastidiosa*, οι ζημιές που προκαλεί στις καλλιέργειες είναι πολύ σημαντικές από οικονομικής άποψης. Για το λόγο αυτό, σε εκείνες τις χώρες προωθείται η χρησιμοποίηση ανθεκτικών στο βακτήριο ποικιλιών, η εφαρμογή κατάλληλων καλλιεργητικών μέτρων και υγιεινής που παρεμποδίζουν την εξάπλωση του και η αντιμετώπιση (χημική και βιολογική) των εντόμων φορέων του.

Επίσης καθώς δεν έχει αποδειχθεί η θεωρία ότι όλα τα μυζητικά έντομα που τρέφονται με τον χυμό των ξυλωδών αγγείων των φυτών μπορούν δυνητικά να γίνουν φορείς του *Xylella fastidiosa* (Almeida et al., 2005), καλό θα ήταν να γίνουν οι

σχετικές έρευνες που θα αποδείξουν ή θα απορρίψουν τη θεωρία αυτή.

Ωστόσο, επειδή δεν είναι δυνατή η χημική αντιμετώπιση του βακτηρίου, θα πρέπει να αντιμετωπίζονται όταν κρίνεται απαραίτητο με χημικά μέσα τα έντομα-φορείς του. Σημαντικό είναι επίσης, οι Ιταλοί να προσδιορίσουν με ακρίβεια το μέγεθος της έκτασης των μολυσμένων περιοχών, να εντοπίσουν νέες εστίες μόλυνσης και να ταυτοποιήσουν τα έντομα-φορείς του βακτηρίου. Πρέπει επίσης, να ταυτοποιήσουν τους ξενιστές που λειτουργούν ως πηγές μόλυσματος και να υπολογίσουν την πιθανότητα δευτερογενούς μετάδοσης στην ελιά. Η διασπορά και η διακύμανση του πληθυσμού της *Xylella fastidiosa* ανά εποχή πρέπει να παρακολουθούνται. Η αναγνώριση του γονότυπου του βακτηρίου είναι επίσης απαραίτητη (Γκούμας, 2014).

Η συμβολή εξειδικευμένων εργαστηρίων στον έλεγχο του βακτηρίου είναι απαραίτητη. Παράδειγμα τέτοιας περίπτωσης αποτελεί το Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας – Βακτηριολογίας του Τμήματος Τεχνολογίας Γεωπονίας του ΤΕΙ Κρήτης το οποίο είναι το επίσημο εργαστήριο για τον έλεγχο φυτοπαθογόνων βακτηρίων καραντίνας στην Κρήτη. Άλλοι σημαντικοί φορείς της Ελλάδας που συμβάλλουν στο έργο αυτό είναι τα Περιφερειακά Κέντρα Προστασίας Φυτών και Ποιοτικού Ελέγχου, το Μπενάκειο Φυτοπαθολογικό Ινστιτούτο, και οι Διευθύνσεις Αγροτικής Ανάπτυξης των Νομαρχιακών Αυτοδιοικήσεων των Περιφερειών. Στο σημείο αυτό, κρίνεται απαραίτητο να τονισθεί ότι είναι προτιμότερο να λαμβάνονται μέτρα πρόληψης εισόδου του παθογόνου στη Ελλάδα, παρά μέτρα αντιμετώπισης του σε περίπτωση που αυτό εισέλθει στις Ελληνικές καλλιέργειες.

Σε όλα τα προαναφερθέντα πρέπει να προστεθεί ότι η συμβολή των αγροτών στο ζήτημα της μη εξάπλωσης του *Xylella fastidiosa* είναι μεγάλη, επειδή μπορούν να προλάβουν επικίνδυνες καταστάσεις εξάπλωσης, αναγνωρίζοντας άμεσα τα συμπτώματα που μπορεί να προκαλέσει το βακτήριο στις καλλιέργειες τους.

Ωστόσο, πρέπει πάντα να λαμβάνεται υπόψη ότι το γεγονός ότι η *Xylella fastidiosa*, όχι μόνο έχει μεγάλο εύρος ξενιστών και την ικανότητα να επιβιώνει σε λανθάνουσα κατάσταση σε μη συμπτωματικούς ξενιστές αλλά και ότι η διακίνηση του φυτικού υλικού στις μέρες μας ευνοεί την εξάπλωση γενικότερα επικίνδυνων παθογόνων, με αποτέλεσμα να είναι πολύ δύσκολη η αποφυγή εισόδου τους σε μια χώρα.

Τέλος, η δημιουργία Ευρωπαϊκών και Εθνικών προγραμμάτων για την εκρίζωση και την απομόνωση του παθογόνου, μπορεί να παίξει σημαντικό ρόλο στην

εξάλειψη του προβλήματος. Ένα τέτοιο πρόγραμμα είναι και το «XF- actors», το οποίο δημιουργήθηκε στα πλαίσια του προγράμματος «Ορίζοντας 2020» και το οποίο είναι Πανερωπαϊκά το πρώτο πρόγραμμα που έχει αφιερωθεί αποκλειστικά στην έρευνα για της *Xylella fastidiosa*. Χρηματοδοτείται από την Ευρωπαϊκή Επιτροπή και απαρτίζεται από 29 εταίρους, όπου και συμμετέχουν και Έλληνες επιστήμονες (XF-actors, 2016). Κρίνεται λοιπόν απαραίτητο να λαμβάνονται όλα τα δυνατά μέτρα αποφυγής εισόδου στις καλλιέργειες οι οποίες δεν έχουν προσβληθεί από το παθογόνο αλλά και τα μέτρα αποφυγής της εξάπλωσης του εκεί όπου ήδη έχει εγκατασταθεί. Σε αντίθετη περίπτωση, πολύ σημαντικές από οικονομικής άποψης καλλιέργειες (ειδικά στις Μεσογειακές χώρες), όπως είναι η ελιά, το αμπέλι, τα πυρηνόκαρπα και τα εσπεριδοειδή, θα υποστούν πιθανόν καταστροφικές συνέπειες.

Βιβλιογραφία

- Almeida, R.P.P., Blua, M.J., Lopes, J.R., and Purcell, A.H., 2005. Vector transmission of *Xylella fastidiosa*: applying fundamental knowledge to generate disease management strategies. *Annals of the Entomological Society of America*, 98, 775–786.
- Γκούμας, Δ., 2014. “*Xylella fastidiosa*. Ένα αναδύομενο παθογόνο για την χώρα μας; “SAGE10: Το Έργο που αποτιμά το αποτύπωμα της Ελαιοκαλλιέργειας στο περιβάλλον” *Galaxy*, 27 Ιουνίου 2014, Ηράκλειο Κρήτης. Διαθέσιμο online: <http://www.bicofcrete.gr/wp-content/uploads/2017/03/XYLELLA-goumas.pdf>
- Γκούμας, Δ., 2017 ΑΓΡΟΤΥΠΟΣ ???
- Διεύθυνση Αγροτικής Οικονομίας και Κτηνιατρικής Δράμας, Τμήμα Ποιοτικού και Φυτοϋγειονομικού Ελέγχου, 2016. Ενημερωτικό Φύλλο: Ο επιβλαβής οργανισμός *Xylella fastidiosa* (βακτήριο). επικαιροποίηση Φύλλου αρ. 10 – 11/07/2016, Δράμα.
- European and Mediterranean Plant Protection Organization, 2016. Country Consultation 16- 21486, PM 7/24 (2) *Xylella fastidiosa*. EPPO.
- European and Mediterranean Plant Protection Organization, 2017. First reports of *Xylella fastidiosa* in the EPPO region - Special Alert. Available online: http://www.eppo.int/QUARANTINE/special_topics/Xylella_fastidiosa/Xylella_fastidiosa.htm
- European Food Safety Authority, PLH Panel, 2015. Scientific Opinion on the risks to plant health posed by *Xylella fastidiosa* in the EU territory, with the identification and evaluation of risk reduction options. *EFSA Journal* 2015;13(1):3989.
- European Food Safety Authority, 2015. Scientific Opinion on the risk to plant health posed by *Xylella fastidiosa* in the EU territory, with the identification and evaluation of risk reduction options. Parma, Italy.
- Minsavage G.V., Thompson C.M., Hopkins, D.L., Leite R.M.V.B. and Stall R.E., 1994. Development of polymerase chain reaction protocol for the detection of *Xylella fastidiosa* in plant tissue. *Phytopathology* 84, 456–461.
- Jepson, S. B., 2005. Pierce’s Disease of Grape. Oregon State University Extension Plant Pathology. Available online:

http://www.science.oregonstate.edu/bpp/Plant_Clinic/Disease_sheets/Pierce%27s%20disease%20of%20grapevine.pdf

- Περιφέρεια Κεντρικής Μακεδονίας, Γενική Διεύθυνση Αγροτικής Οικονομίας και Κτηνιατρικής, 2017. «*Xylella fastidiosa*: Ενδοκοινοτική διακίνηση φυτών-ξενιστών του *X. fastidiosa* με φυτοϋγειονομικό διαβατήριο, σύμφωνα με την Εκτελεστική Απόφαση 2015/789/ΕΕ της Επιτροπής της 18ης Μαΐου 2015 όπως τροποποιήθηκε και ισχύει». Αριθ. πρωτ.: οικ. 3966, Θεσσαλονίκη, 20 Μαρτίου 2017.
- Redak, R. A., Purcell, A. H., Lopes J. R. S., Blua, M. J., Mizell R. F., and Andersen, P. C., 2004. The biology of xylem fluid-feeding insect vectors of *Xylella fastidiosa* and their relation to disease epidemiology. *Annual Review of Entomology* 49, 243–270.
- Saponari, M., Loconsole, G., Cornara, D., Yokomi, R.K., De Stradis, A., Boscia, D., Bosco, D., Martelli, G.P., Krugner, R., Porcelli, F., 2014. Infectivity and transmission of *Xylella fastidiosa* by *Philaenus spumarius* (Hemiptera: Aphrophoridae) in Apulia, Italy. *J Econ Entomol*, 107, 1316–1319.
- Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A., Lane, D.J., 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* 173, 697–703
- XF-actors, 2016. *Xylella fastidiosa* Active Containment Through a multidisciplinary-Oriented Research Strategy. Project funded by H2020 programme – SFS-09-2016, XF-ACTORS, grant agreement 727987. <http://www.xfactorsproject.eu/>